

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

DOUTORADO

**ASPECTOS VETORIAIS DA *Lutzomyia longipalpis*:
RESPOSTA COMPORTAMENTAL A COMPOSTOS
ORGÂNICOS VOLÁTEIS E USO NA AVALIAÇÃO DE
INFECTIVIDADE DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

JAIRO TORRES MAGALHÃES JUNIOR

SALVADOR - BAHIA

JUNHO/ 2015

JAIRO TORRES MAGALHÃES JUNIOR

Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde animal

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Stella Maria Barrouin Melo

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara Cristina Pinto

SALVADOR – BA

JUNHO – 2015

Sistemas de Bibliotecas - UFBA

Magalhães Junior, Jairo Torres.

Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães infectados por *Leishmania infantum* / Jairo

Torres Magalhães Junior. - 2015.

88 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Stella Maria Barrouin Melo.

Co-orientadora: Prof.^a, Dr.^a. Mara Cristina Pinto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares, principalmente aos meus pais Jairo Torres e Zilda Alves, e minha irmã, Jarilene Souza, que acreditaram em meu potencial e lutaram sempre ao meu lado para a realização desse sonho;

À minha companheira Leidiane Bailon, pelo amor e carinho compartilhado, além de todo apoio prestado, que sem dúvida, foram indispensáveis a essa conquista.

À Prof.^a Stella Maria Barrouin Melo, pela orientação, confiança, amizade e apoio tantas vezes demonstrados nesses vários anos de trabalho, muito obrigado mesmo.

Ao Prof. Carlos Roberto Franke pela amizade, orientação, inspirações, ideias, conversas, enfim muito obrigado.

A Prof.^a Mara Pinto, pela oportunidade de realizar parte dos experimentos em seu laboratório, pela amizade e todo apoio.

Ao prof. Jailson de Andrade Bittencourt por ter acreditado no projeto apresentado e por ter aberto as portas do mundo da química.

Aos amigos Paulo Mesquita e Frederico Rodrigues, não só pelo indispensável apoio nos experimentos de ecologia química e análises químicas, mas também pelas inestimáveis discussões científicas, políticas, econômicas, sociais e todas as outras travadas entre um experimento e outro.

Aos colegas do Laboratório de Infectologia Veterinária pelo aprendizado e companheirismo prestado em prol do desenvolvimento científico, sobretudo ao pessoal do insetário. São várias as pessoas me ajudaram ao longo destes vários anos de laboratório, por isso não citarei nomes, mas meu sincero agradecimento a todos vocês.

Aos estagiários e colegas da EBDA que auxiliaram nos testes no túnel de vento e análises químicas, em especial Hugo, Geisel, Jânio, Wyllian e Estéfane, muito obrigado.

A todos os amigos e amigas que direta ou indiretamente me ajudaram nesta caminhada;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro concedido a essa pesquisa e pela bolsa de estudo;

MAGALHÃES-JUNIOR, J.T. **Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***. Salvador, Bahia, 2015, 95 pg. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia

RESUMO

Leishmaniose Visceral é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. O controle da doença é bastante complexo, sendo que atualmente sugere-se a necessidade de redirecionamento nas medidas de controle, sobretudo no que se refere à identificação de cães verdadeiramente transmissores e à necessidade de um refinamento no controle vetorial. Neste trabalho foi avaliada a infectividade de cães naturalmente infectados com *L. infantum* para a *L. longipalpis*, bem como a capacidade atrativa de diferentes compostos orgânicos voláteis para o mesmo vetor. A partir de testes xenodiagnósticos, foi observado que cães com maior manifestação de sinais clínicos são mais infectivos ao vetor que cães com pouco ou nenhum sinal clínico, entretanto não houve diferença na taxa de transmissibilidade quando diferentes protocolos de xenodiagnóstico foram confrontados. Sendo que, para cães infectados com *L. infantum* e agrupados conforme a presença de anormalidades clínicas e patológicas, a taxa de infectividade nos flebotomíneos foi significativamente menor ($p=0,0098$), quando estes se alimentaram de cães com doença moderada (0,01%), comparativamente aos cães com doença severa (38,2%). Demonstrou-se também que machos e fêmeas de *L. longipalpis* são atraídos por compostos aldeídos e alcanos (octanal, decanal e heptadecano) identificados no

pelo canino e álcoois (heptanol, octanol, octenol e nonanol) encontrados em plantas. Esses compostos químicos podem ser utilizados como iscas em armadilhas para captura dos insetos ou ainda associados com inseticidas de efeito residual. Mais estudos são necessários sobre a biologia e comportamento da *L. longipalpis* e sua relação com cães infectados com *L. infantum*, buscando melhor entender essa interface e identificar novas alternativas de controle para a leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: Flebotomíneos; Leishmaniose visceral; Xenodiagnóstico; Atração; COVs.

MAGALHÃES-JUNIOR, J.T. **Vector aspects of *Lutzomyia longipalpis*: behavioral response the volatile organic compounds and use in evaluation of infectivity of dogs naturally infected by *L. infantum*.** Salvador, Bahia, 2015, 95 pg. Thesis (Doctorate of Animal Science in Tropics) – School of Veterinary Medicine and Livestock, Federal University of Bahia, 2015.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by the phlebotominae sand fly *Lutzomyia longipalpis*. The control of the disease is quite complex, being suggested presently the necessity to redirect the control measures, especially concerning the identification of dogs truly transmitters and the necessity of a refinement of the vector control. This work was evaluated the infectivity of dogs naturally infected with *L. infantum* to *L. longipalpis* as well as the attractive ability of different volatile organic compounds to same vector. It was observed, by xenodiagnosis, that dogs with higher manifestation of clinical signs are more infective to the vector than dogs with few or no clinical signs, however there was no difference in the transmission rate when different xenodiagnosis methodologies were compared. Therefore for dogs infected with *L. infantum* and grouped according to presence of clinical and pathological abnormalities in the infectivity rate sandflies was significantly lower ($p = 0.0098$), when these were fed dogs with moderate disease (0,01%) compared to dogs with severe disease (38.2%). It was also demonstrated that males and females of *L. longipalpis* are attracted by aldehyde and alkane (octanal, decanal and heptadecane) compounds identified on the canine hair and alcohols found in plants (octenol, octanol, heptanol and nonanol). These chemical compounds can be used as

bait in traps to capture insects and even be associated with insecticides with residual effect. More studies are necessary about the biology and behavior of *L. longipalpis* and its relationship to dogs infected with *L. infantum*, searching to better understand this interface and identify new alternatives to control visceral leishmaniasis.

Keywords: Sandflies; Visceral leishmaniasis; Xenodiagnosis; Attraction; VOCs.

LISTA DE FIGURAS

Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* Página

Figura 1. Foto ilustrativa do sistema de túnel de vento com luz vermelha, destacando o filtro de carvão ativado (A), plataforma de liberação de odor (B), 20
caixa de liberação dos insetos (C) e exaustor com controlador de fluxo (D).

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Número e porcentagem de flebotomíneos infectados a partir do xenodiagnóstico realizado em cães com doença clínica moderada e severa (G2).	39
 Capítulo 2	
Tabela 1. Porcentagem de ativação e atração de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> para compostos químicos identificados no pelo de cães infectados com <i>L. infantum</i> .	60

LISTA DE SIGLAS

COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Immune Sorbent Assay</i>)
LV	Leishmaniose visceral
LVZ	Leishmaniose visceral zoonótica
MS	Ministério da Saúde – Brasil
OMS	Organização mundial da saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Reação da Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês T helper-1)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês T helper-2)

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral	04
2.2. Reservatórios, vetores e controle da doença	06
2.3. Fisiopatologia da leishmaniose visceral canina	09
2.4. Parâmetros indicadores de transmissibilidade do parasito ao vetor	11
2.5. Atração de flebotomíneos a compostos orgânicos voláteis	13
2.5.1. Ecologia química de insetos	14
2.5.2. Ecologia química de flebotomíneos	16
2.5.3. Atratividade de flebotomíneos em laboratório	19
2.5.4. Aplicação da ecologia química no controle do vetor	21
3. HIPÓTESES DO TRABALHO	23
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo geral	24
4.2. Objetivos específicos	24

Capítulo 1

Xenodiagnóstico em cães com leishmaniose visceral: aspectos caninos e dos flebotomíneos relacionados à transmissibilidade parasitária

Resumo	25
Abstract	26
Introdução	28
Material e métodos	30
Animais e aspectos éticos	30
Delineamento experimental	31
Exame físico e coleta de amostras biológicas	32
ELISA indireto para sorodiagnóstico de LVZ	33
Diagnóstico parasitológico de <i>L. infantum</i>	34
Colônia de flebotomíneos	34

Xenodiagnóstico	35
PCR para detecção de DNA de <i>L. infantum</i>	36
Análise dos dados	37
Resultados	37
Discussão	40
Agradecimentos	46
Referências	46

Capítulo 2

Atração de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) para compostos químicos exalados do pelo de cães

Resumo	52
Abstract	53
Introdução	54
Material e métodos	56
Insetos	57
Experimentos no Túnel de vento	57
Análise Estatística	59
Resultados	59
Discussão	61
Agradecimentos	64
Referências	64

Capítulo 3

Uma avaliação laboratorial de álcoois como atrativos para flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

Artigo publicado	69
<i>A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)</i>	72

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), uma doença zoonótica causada pela *Leishmania infantum*, é considerada um importante problema de saúde pública no mundo (WHO, 2011). A LV tem o cão doméstico como principal hospedeiro e é transmitida através da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. A LV acomete milhares de pessoas em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento. No Brasil, a doença está distribuída por todas as regiões, apesar de ainda existir uma concentração maior do número de casos na região Nordeste (BRASIL, 2014).

Mesmo com os esforços na tentativa de se controlar a doença, os casos humanos e caninos vêm aumentando nos últimos anos, evidenciando uma expansão das áreas de ocorrência e uma crescente urbanização (LAINSON e RANGEL, 2005; ALVAR *et al.*, 2012). Por esses motivos, têm se discutido possíveis alterações nas medidas preconizadas no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), que atualmente são centradas e dirigidas para o controle do hospedeiro canino (inquérito sorológico e eutanásia de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*), bem como a investigação entomológica para a aplicação de inseticidas, e o diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos (BRASIL, 2014).

As ações voltadas aos cães são as que enfrentam maior resistência, seja pelos aspectos éticos e legais decorrentes da eliminação dos cães, ou pela possível ineficácia

dessa medida em reduzir a expansão da doença. Nesse sentido, um ponto fundamental na discussão é definir critérios mínimos para a eutanásia dos cães. Todos os cães infectados com *L. infantum* teriam capacidade de transmiti-la ao vetor? Quais as características de um cão que não transmite o parasito ao vetor? Quais as implicações epidemiológicas em manter um cão infectado em área endêmica, desde que este animal não transmita o parasito?

As respostas para estas perguntas podem somente ser obtidas a partir da realização de avaliações de infectividade e transmissibilidade nos cães, que são realizadas necessariamente com o uso do exame xenodiagnóstico. No presente trabalho, aspectos relacionados à infecção canina são discutidos, assim como aspectos da execução da técnica de xenodiagnóstico que contribuem para os esforços de identificação do cão com perfil de resistência ou de susceptibilidade à doença.

Outro aspecto discutido no PCLV-Brasil é o controle vetorial. Atualmente a investigação entomológica visa levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre os flebotomíneos transmissores da LV. Para tal, a metodologia mais empregada é a captura dos insetos com armadilhas luminosas e, quando necessário, proceder à pulverização das residências com inseticida residual. Os principais problemas enfrentados por essa metodologia são: (1) baixa especificidade das armadilhas, que capturam várias espécies sem interesse na saúde pública; (2) Ocorrência de investigações falso-negativas, sobretudo em áreas com pouca densidade vetorial; e (3) Problemas de

intoxicação, contaminação ambiental e identificação de resistência dos insetos aos produtos, resultantes do uso de inseticidas sem a associação com uma estratégia de controle integrado. A manipulação do comportamento de resposta do vetor a partir de compostos químicos possivelmente atrativos surge como uma possível solução para estes problemas. Diversos estudos têm evidenciado a importância de compostos químicos na atratividade para insetos transmissores de diferentes doenças, inclusive a LV. Esses compostos podem ser utilizados como isca em armadilhas luminosas, ou ainda em associação com o uso de inseticida residual, potencializando a eficácia dessas ações.

Dessa forma, esta tese visa contribuir com dados para esclarecimento de alguns aspectos da relação hospedeiro-parasito-vetor na leishmaniose visceral e discutir as implicações desses achados na prevenção e controle da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

A LV é uma doença crônica e frequentemente letal quando não tratada, causada pela espécie *L. infantum*, protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (PALATNIK-DE-SOUSA e DAY, 2011). A doença afeta principalmente crianças e adultos imunodeprimidos em cerca de 80 países, os quais estão distribuídos pela América, Europa, Ásia Central, Américas, China e Mediterrâneo, sendo na maioria nações consideradas subdesenvolvidas (ALVAR, 2012). Sugere-se que a *L. infantum* tenha sido introduzida nas Américas durante a colonização por portugueses e espanhóis, tendo se adaptado aos hospedeiros e vetores que aqui encontrou (LAINSON e RANGEL, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 200 a 400 mil casos da doença ocorrem por ano, dos quais 90% em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia. Como o grau de subnotificação para a taxa de mortalidade também é bastante alto, estima-se que ocorrem entre 20 e 40 mil mortes de LV a cada ano em todo o mundo (WHO, 2011).

O crescente número de ocorrências é devido principalmente ao aumento gradual de casos nos centros urbanos, ao deslocamento das populações, à exposição de pessoas não imunes à LV, à deterioração das condições sociais e econômicas das periferias das grandes cidades, à má nutrição e a coinfeções com o HIV (WHO, 2007).

No Brasil, apesar da expansão da doença para as regiões sudeste e centro-oeste, aproximadamente 60% dos casos ocorrem nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Em todo o país, entre 1990 e 2010 o coeficiente médio de incidência foi de 1,8 casos por 100.000 habitantes, enquanto a taxa média de letalidade foi de 6,5% no período de 2000 a 2010 (BRASIL, 2012).

A Bahia é atualmente um dos estados brasileiros que apresenta os maiores números assinalados de casos humanos da LV, com notificação de 14.503 casos de LV humana entre os anos de 1984 e 2002 (BRASIL, 2014). A distribuição geográfica da doença concentrou a maioria dos casos na Chapada Diamantina, região central do estado. Entretanto, a área de ocorrência da LV tem aumentado no estado, especialmente na região semiárida, onde a doença já era conhecida (FRANKE *et al.*, 2002).

2.2. Reservatórios, vetores e controle da doença

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório na área urbana, devido à sua alta susceptibilidade ao patógeno, o intenso parasitismo cutâneo e a observação de que os casos caninos precedem os casos humanos (MONTEIRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

No ambiente silvestre, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o gambá (*Didelphis albiventris*) e a raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) são tidos como reservatórios naturais da infecção, sendo comum encontrar animais positivos em áreas de habitações humanas que possuem alguma relação com o ambiente silvestre. O homem é considerado hospedeiro acidental da LV pelo Ministério da Saúde (SHERLOCK, 1996; BRASIL, 2014).

A única forma de transmissão comprovada até o momento é através da picada da fêmea do flebotomíneo, que quando se alimenta de um hospedeiro mamífero infectado com *L. infantum*, ingere formas amastigotas do parasito junto com o repasto sanguíneo (QUINNELL e COURTENAY, 2009). Logo que chega ao tubo gastrointestinal dos flebotomíneos, as formas amastigotas, que são aflageladas, transformam-se em promastigotas. As formas promastigotas da *Leishmania*, que são flageladas e, portanto móveis, possuem distintas formas morfológicas (procíclicas, nectomonodas, leptomonodas, haptomonodas e metacíclicas). Toda essa metamorfose ocorre dentro do

tubo intestinal do inseto e dura em média de 8 a 10 dias. Assim, após sofrerem estas sucessivas transformações, o parasito é transmitido para outros hospedeiros na forma promastigota metacíclica em uma próxima alimentação do inseto (KAMHAWI, 2006).

A *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é considerado o principal vetor da LV no novo mundo. (RANGEL e VILELA, 2008). A *L. longipalpis* é um díptero da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Esses insetos flebotomíneos medem aproximadamente de 2 a 3 mm, tem o corpo bastante piloso, coloração clara (castanho claro ou cor de palha) e são facilmente reconhecidos por seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (LAINSON, 2003; BRASIL, 2014). Como todo díptero, *L. longipalpis* são insetos holometábolos e apresentam as fases de ovos, larvas com quatro estádios, pupas e alados no seu ciclo de vida. Tanto os machos como as fêmeas adultas alimentam-se de seivas vegetais, mas somente as últimas são hematófagas, necessitando de pelo menos um repasto sanguíneo para o amadurecimento dos ovos (SOARES e TURCO, 2003).

A *L. longipalpis* tem hábito crepuscular e noturno, em laboratório reproduz-se melhor à temperatura entre 23 a 28° C e umidade relativa (UR) entre 70 a 100 %, sendo 25° C e 80 % as condições consideradas ideais (MODI e TESH, 1983). A duração do ciclo de desenvolvimento em laboratório é bem variável e depende das condições de manutenção, assim como a quantidade de ovos colocados por fêmea (RANGEL *et al.*, 1986).

Em relação ao controle da doença no Brasil, as estratégias dos órgãos de saúde incluem: (1) o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, (2) a identificação e eliminação dos reservatórios, (3) o controle de vetores e (4) a educação em saúde. Para a definição das medidas a serem desenvolvidas, deve-se considerar o grau de risco em diferentes áreas, com a ocorrência de casos humanos como o principal indicador de gravidade (BRASIL, 2014).

Vários métodos podem ser utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, mas nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (MELO, 2004). Na rotina clínica médica veterinária, a suspeita clínica é baseada em sinais clínicos e alterações de patologia clínica. Entretanto, o diagnóstico da infecção só é possível com exames complementares imunológicos, parasitológicos e moleculares. O exame microscópico direto de esfregaços a partir de aspirado de baço, linfonodo ou medula óssea permite visualização do agente etiológico e consiste no exame parasitológico considerado padrão ouro no diagnóstico da LV. Contudo, testes imunológicos e de biologia molecular têm sido utilizados como instrumentos de orientação nas tomadas de decisões em saúde pública (BARROUIN-MELO et al., 2006).

Dentre as ações para vigilância e controle da LV, as relacionadas ao cão são consideradas, do ponto de vista social e ético, as mais polêmicas, devido à indicação da eutanásia de cães infectados e à contraindicação ao tratamento quimioterápico canino (BRASIL, 2009a). Além disso, é possível que os métodos atuais de controle da doença

não estejam funcionando, pois apesar das tentativas, a LV continua em constante expansão no país. Assim, tem sido sugerida a necessidade de se refinar e aprimorar o controle da doença canina no Brasil (ROMERO e BOELAERT, 2010).

No Brasil existe uma vacina canina autorizada para comercialização, entretanto, apesar de ser rotineiramente utilizada por clínicos veterinários em áreas endêmicas, seu uso em saúde pública não é recomendado pelo Ministério da Saúde, pois não existem dados conclusivos de sua eficácia em nível populacional (BRASIL, 2009b). Um método considerado eficiente é a utilização de coleiras para cães, impregnadas com o inseticida; essas coleira são consideradas protetoras em até 96% contra picadas dos flebotomíneos. Entretanto, seu uso em massa ainda é limitado devido ao alto custo e o pequeno período do efeito residual (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 2008; QUINNELL e COURTENAY, 2009).

2.3. Fisiopatologia da leishmaniose visceral canina

As consequências, evolução e severidade da leishmaniose visceral canina, dependem da resposta imunológica expressa pelo animal, especialmente do tipo de citocinas predominantes (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; PINELLI *et al.*, 1994). O perfil dessas proteínas varia de acordo com fatores ambientais, nutricionais, genéticos e

aspectos inerentes ao parasito, como espécie, cepa e tamanho do inóculo (GRIMALDI e TESH, 1993).

Nos períodos iniciais pós-infecção, ocorre modificação nas populações de linfócitos T, já tendo sido demonstrado que há uma relação entre o padrão de citocinas produzido e a manifestação de sinais clínicos (PINELLI *et al.*, 1994). Esta associação é resultado da maior intensidade de carga parasitária, quando há uma menor produção de citocinas do tipo Th1 (Linfócito T *helper* tipo I) nos diversos órgãos, como nos linfonodos (ALVES *et al.*, 2009), baço (KENNEY *et al.*, 1998), medula óssea (DE ABREU *et al.*, 2011) e pele (SOUZA *et al.*, 2011).

Animais que produzem resposta do tipo Th1 desenvolvem imunidade do tipo celular contra o parasita, resultando no combate eficiente ao parasito e consequente resistência à infecção (PINELLI *et al.*, 1994). Por outro lado, animais que produzem uma resposta do tipo Th2 (Linfócito T *helper* tipo II) são caracterizados por uma resposta imunológica do tipo humoral e consequente susceptibilidade à doença. Os anticorpos produzidos via resposta humoral são incapazes de debelar a infecção, resultando em altas cargas parasitárias e aparecimentos de sinais clínicos da doença (PINELLI *et al.*, 1994). Os sinais clínicos encontrados são vários, podendo levar desde lesões oculares, perioculares e cutâneas; hipertrofia de órgãos linfoides e desordens hematológicas; e até nefropatia, disfunções respiratórias, digestivas, cardiovasculares e musculoesqueléticas

(BLAVIER *et al.*, 2001; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006; PALIS-AGUIAR *et al.*, 2007; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

2.4. Parâmetros indicadores de transmissibilidade do parasito ao vetor

A definição de parâmetros que permitam identificar entre os cães infectados, aqueles que realmente transmitem o parasito ao vetor é importante para o controle da doença (COURTENAY *et al.*, 2002). A infectividade canina ao vetor pode ser determinada de maneira direta por xenodiagnóstico ou através de métodos indiretos. Meios indiretos consistem em exames realizados em biópsias de pele, e incluem métodos histopatológicos ou imunoquímicos, para visualização microscópica do parasito, ou moleculares, como a PCR e suas variações na pesquisa de DNA parasitário. Autores têm se debruçado em estudos para definir outros marcadores relacionados aos cães, que estejam associados à transmissão da *Leishmania* para o vetor.

Dentre os poucos estudos disponíveis que objetivam estabelecer parâmetros indiretos de transmissibilidade, já foi demonstrado que a taxa de infectividade está associada positivamente à (1) carga parasitária do animal nos diferentes órgãos, sobretudo pele e linfonodos (MICHALSKY *et al.*, 2007); (2) intensidade de sinais clínicos (TRAVI *et al.*, 2001); (3) altos valores de absorvância no ELISA para

determinação de IgG total (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007); e (4) baixa porcentagem de linfócitos do tipo T (GUARGA *et al.*, 2000b).

O xenodiagnóstico é a única técnica disponível que avalia, de forma direta, se um determinado hospedeiro ao está infectado com um agente etiológico, o transmite durante a alimentação sanguínea do seu vetor potencial. Entre as principais desvantagens do método, está a necessidade de cultivo dos insetos em laboratório, a demora na obtenção do resultado, limitação de uso devido ao incômodo das picadas e possibilidade de reação alérgica nos hospedeiros e sua baixa sensibilidade analítica (GUARGA *et al.*, 2000a; QUINNELL e COURTENAY, 2009)

Apesar da importância comprovada na avaliação da transmissibilidade da LV em cães, o uso do xenodiagnóstico na rotina não é factível e até na pesquisa seu uso é limitado, sobretudo devido às dificuldades de criação dos flebotomíneos em laboratório (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007).

Estudos realizados com cães comprovadamente positivos na Colômbia (TRAVI *et al.*, 2001) e Brasil (VERÇOSA *et al.*, 2008) demonstraram que animais sem sinais clínicos da doença não transmitiram o parasito ao vetor. Alguns autores de estudos realizados no Brasil ponderam que, mesmo apresentando menor taxa de infectividade em comparação aos cães com sinais clínicos da doença, os animais com infecção subclínica podem ter capacidade de transmitir e, portanto, sua importância deve ser considerada nos

programas de controle da doença (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007). Já em estudos realizados na Europa, concluiu-se que cães positivos para LV transmitiam praticamente na mesma proporção e intensidade, independentemente do seu estado clínico (MOLINA *et al.*, 1994; GUARGA *et al.*, 2000b).

Contrariando a maior parte dos estudos reportados na literatura, Laurenti *et al.* (2013), em estudo realizado no Brasil, concluíram que cães “assintomáticos” tiveram maior capacidade de infectividade quando comparados aos cães sintomáticos. Tal controvérsia em relação aos estudos anteriores gerou dúvidas e críticas quanto à metodologia de classificação clínica dos cães (DANTAS-TORRES e OTRANTO, 2013).

Há problemas enfrentados na comparação de dados sobre infectividade, como a variação nas metodologias utilizadas para avaliação da transmissibilidade parasitária por cães aos vetores, e, sobretudo, a grande diversidade na maneira de classificar os cães em diferentes perfis clínicos. Essas diferenças dificultam qualquer tipo de comparação entre os estudos. Entretanto, percebe-se uma tendência de aumento da infecciosidade na medida em que há maior gravidade da doença clínica (QUINNELL e COURTENAY, 2009).

As diferenças nos materiais e métodos utilizados podem interferir nos resultados do xenodiagnóstico. A depender da técnica utilizada para promoção do repasto sanguíneo no hospedeiro, pode haver diferenças na taxa de alimentação. Essas diferenças,

consequentemente, resultarão em maior ou menor taxa de infecção, e, por conseguinte, diagnóstico ou quantificação de “infectividade” ou “infecciosidade”.

2.5. Atração de flebotomíneos a compostos orgânicos voláteis

Sabe-se que os insetos utilizam estímulos olfativos e visuais durante vários estágios do seu ciclo de vida como na busca por uma fonte alimentar ou local adequado para oviposição (LOGAN e BIRKETT, 2007). As moléculas responsáveis pelas respostas olfativas são substâncias orgânicas voláteis que se dispersam segundo as leis dos gases, formando plumas de odores e são as responsáveis pela comunicação química existente entre o inseto vetor e o hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2008).

2.5.1. Ecologia química de insetos

A comunicação química ocorre quando um indivíduo (emissor) emite substâncias químicas, que são transmitidas através de um meio (ar, água, substrato) e são captadas por outro indivíduo (receptor) (DICKE; SABELIS, 1988).

A comunicação é considerada intraespecífica, quando COV's denominados feromônios são secretadas por um indivíduo e lançados para o ambiente, provocando em outro indivíduo da mesma espécie uma reação comportamental específica (VILELA e

DELLA LÚCIA, 2001). No caso da comunicação interespecífica, as substâncias envolvidas são chamadas de aleloquímicos e são divididas com base nos prejuízos e benefícios que cada organismo terá na relação. O cairomônio é um tipo de aleloquímico que evoca uma resposta adaptativa, desfavorável para o emissor, mas favorável pelo receptor (VILELA e DELLA LÚCIA, 2001). Exemplo típico de cairomônio são os compostos orgânicos voláteis produzidos por hospedeiros e que são detectados por receptores das antenas dos insetos hematófagos durante o processo de procura e localização da fonte alimentar (KELLY *et al.*, 1997). A capacidade de detecção destes compostos voláteis específicos facilita o reconhecimento do hospedeiro e aumenta o raio de busca de alimento por parte do vetor (CORRÊA e SANT'ANA, 2007).

A importância de alguns compostos químicos na orientação de insetos hematófagos tem sido extensamente demonstrada. O dióxido de carbono, principal composto liberado na respiração de hospedeiros, é um semioquímico muito estudado e seu efeito atrativo já foi reportado no *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e algumas espécies de mosca tsé-tsé (*Glossina* ssp). Outro composto muito estudado é o 1-octen-3-ol, que foi inicialmente identificado a partir de voláteis da expiração de bovinos e já teve seu efeito atrativo avaliado em diversas espécies de insetos hematófagos (LOGAN e BIRKETT, 2007). O ácido láctico é o principal componente do suor humano e também já teve seu efeito avaliado, sendo considerado atrativo quando usado em conjunto com CO₂ (KLINE, 1990).

Esses compostos químicos são produzidos em grande escala por diversas espécies de animais, por isso podem ser considerados como cairomônios universais. Eles atraem os insetos que possuem hábito alimentar oportunista por indicarem a presença de vertebrados vivos, porém de maneira inespecífica (BRAY; WARD; HAMILTON, 2010).

2.5.2. Ecologia química de flebotomíneos

Entre os estudos realizados na tentativa de identificar os COVs envolvidos na comunicação química de flebotomíneos, a maior parte utiliza a *L. longipalpis* como espécie-alvo, razão pela qual pouco se sabe a respeito da comunicação química de outras espécies de flebotomíneos.

No final da década de 80, foi descoberto o feromônio sexual da *L. longipalpis* e desde então diversos trabalhos vêm sendo realizados. O feromônio sexual é produzido no tecido glandular localizado no abdômen de machos (MORTON e WARD, 1989; HAMILTON *et al.*, 1999) e mostrou-se atrativo tanto para fêmeas, quanto para outros machos desta espécie (SPIEGEL *et al.*, 2005), o que demonstra que o feromônio da *L. longipalpis*, além de sexual, também tem função de agregação.

Apesar da comprovada eficácia do feromônio sexual na atração da *L. longipalpis* em estudos em laboratório (JONES e HAMILTON, 1998) e em testes a campo (BRAY *et al.*, 2010; BRAY *et al.*, 2014), o seu uso em diferentes regiões é limitado, pois existe variação na sua composição química de acordo com a localização geográfica do macho

de *L. longipalpis* que o produz (HAMILTON *et al.*, 2005). Essa limitação prática no uso do feromônio aumenta a importância do estudo dos caïromônios na ecologia química de flebotomíneos. Adicionalmente, Bray e Hamilton (2007) ao realizarem estudos comportamentais em laboratório, encontraram que a atratividade exercida sobre fêmeas de *L. longipalpis* praticamente dobrou quando o odor de hospedeiros foi adicionado ao feromônio.

Ainda assim, são poucos os estudos encontrados na literatura que avaliam a atratividade de flebotomíneos a odores de hospedeiros. Hamilton e Ramsoondar (1994) encontraram que fêmeas e machos de *L. longipalpis* foram atraídos por COVs exalados da pele humana, sendo que houve diferença na resposta à atratividade exercida pelos diferentes voluntários. Da mesma forma Rebollar-Tellez; Hamilton; Ward (1999) encontraram diferentes níveis de respostas à atratividade por voluntários humanos, sugerindo que essa variação pode ser devido a diferentes COVs exalados pelos voluntários. Observou-se ainda que as fêmeas de *L. longipalpis* preferiam picar a orelha dos humanos em detrimento de outras partes do corpo, isso quando levado em consideração o número de picadas em relação à área exposta. Os autores demonstraram também que os insetos eram atraídos pelos odores extraídos de orelha humana, evidenciando que essa preferência deve estar relacionada aos COVs exalados dessa região (REBOLLAR-TELLEZ; HAMILTON; WARD, 1999).

Em relação aos COVs produzidos por outras espécies hospedeiras, demonstrou-se que dezesseis compostos químicos presentes na glândula anal de raposas (*Vulpes vulpes*) exerceram ação eletrofisiológica e comportamental sobre *L. longipalpis*, sugerindo que existe uma complexidade de componentes que pode atuar na comunicação química entre flebotomíneos e hospedeiros (DOUGHERTY *et al.*, 1999).

Já se observou que no caso da LV canina, os flebotomíneos são mais atraídos para alimentar-se em cães infectados do que em cães saudáveis (KNOLS e MEIJERINK, 1997), sendo essa preferência possivelmente relacionada aos diferentes odores exalados pelos animais infectados. Estudando a atratividade de *L. longipalpis* a hamsters, O'Shea *et al.* (2002) observaram que o vetor foi mais atraído por indivíduos infectados por *L. infantum* em comparação aos saudáveis. Alguns autores consideram a possibilidade do perfil de COVs exalados ser uma estratégia de sobrevivência da *L. infantum* em atrair o vetor para se alimentar no animal infectado, favorecendo sua disseminação para outros hospedeiros (KNOLS e MEIJERINK, 1997).

Recentemente, identificou-se uma associação entre a presença e a intensidade de manifestação de sinais clínicos nos cães infectados e o perfil de COVs exalados por esses animais, da mesma forma que o perfil exalado variou de acordo com presença ou não de infecção (MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2014). No mesmo estudo, os autores identificaram alguns COVs exalados por pelo e pele caninos, concluindo que esses COVs podem ser utilizados como possíveis atrativos para flebotomíneos (MAGALHÃES-

JUNIOR *et al.*, 2014). A hipótese então levantada é que a presença de *L. infantum* nos cães infectados resulta em uma produção peculiar e proporcional de COVs, que é diferente dos odores exalados por cães saudáveis.

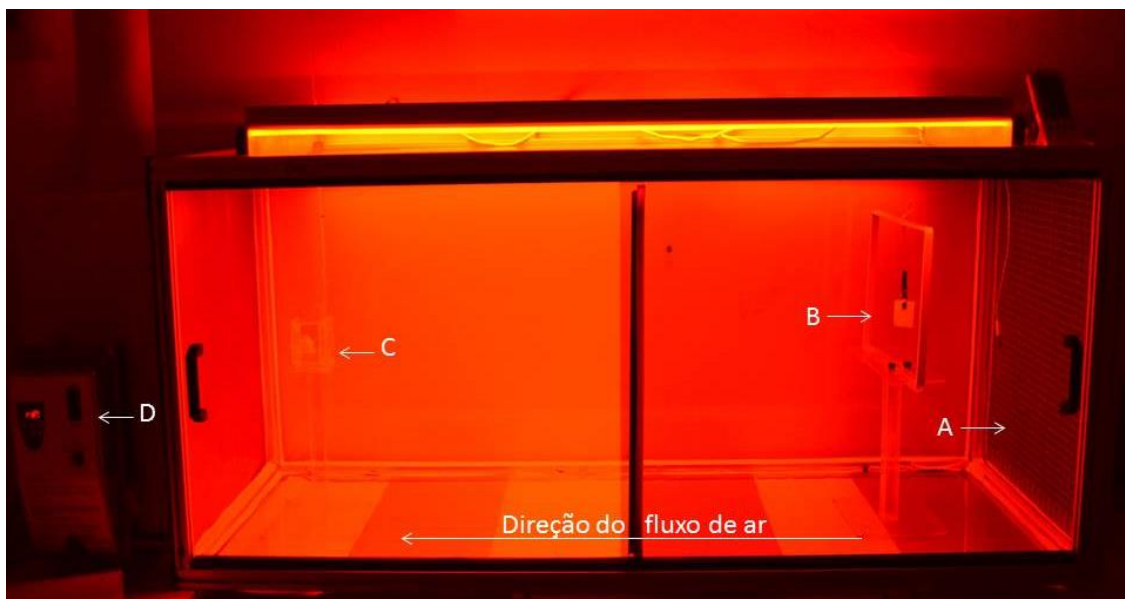
2.5.3 Atratividade de flebotomíneos em laboratório

Os bioensaios laboratoriais são realizados em sistemas fechados na tentativa de obter dados relativos ao comportamento dos insetos, quando esses são induzidos a responder a estímulos químicos (DICKE; SABELIS, 1988). No bioensaio, o detector é um organismo vivo ou parte do seu sistema sensorial (CORRÊA e SANT'ANA, 2007). Para a realização dos bioensaios, podem-se utilizar olfatômetros, túnel de vento, testes em arena, entre outros. É importante ressaltar que o desenho e tamanho dessas construções são muito variáveis, dependendo do tamanho e características biológicas de cada inseto (VILELA e DELLA LÚCIA, 2001).

As vantagens da realização de bioensaio em condições laboratoriais em comparação a testes de campo são várias: (1) controle das condições ambientais, (2) controle das condições fisiológicas do organismo, (3) eliminação de estímulos externos, (4) melhor interpretação de respostas complexas.

O bioensaio mais utilizado para flebotomíneos é o túnel de vento. Essa metodologia permite o voo dos insetos enquanto estes seguem um rastro de compostos químicos criado por uma corrente de ar, que é liberada no lado oposto ao qual os insetos são soltos (Figura 1). O comportamento do inseto frente ao estímulo é registrado por observação direta ou através de câmeras de vídeos e de softwares específicos. O primeiro estudo usando flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* em túnel de vento foi realizado por Morton e Ward (1989); os autores identificaram que fêmeas virgens, com idade entre 3 a 6 dias de emergidas, chegavam mais rapidamente e em maior quantidade ao outro lado do túnel, quando eram usados hamster e feromônio extraído de insetos machos como atrativos, em comparação ao controle. Para esses testes, foi usado um túnel de vento de 240 cm. Desde então, relativamente poucos estudos foram realizados usando essa metodologia (DOUGHERTY *et al.*, 1999; O'SHEA *et al.*, 2002; SPIEGEL *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2012).

Figura 1. Sistema de túnel de vento com luz vermelha, destacando o filtro de carvão ativado (A), plataforma de liberação de odor (B), caixa de liberação dos insetos (C) e exaustor com controlador de fluxo (D).



Fonte: Equipamento instalado na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador, Bahia, Brasil.

2.5.4 Aplicação da ecologia química no controle do vetor

Atualmente, o controle vetorial é centrado na busca e captura de flebotomíneos para identificação de áreas de risco, e na utilização de inseticidas químicos com efeito residual para o combate aos insetos adultos (ALEXANDER e MAROLI, 2003). Entretanto alguns problemas são relatados na execução destes procedimentos.

A armadilha preconizada para captura de flebotomíneos é a luminosa do tipo CDC (Ministério da Saúde, Brasil, 2006). Entretanto, essas armadilhas têm algumas limitações operacionais, sendo consideradas de alto custo, pouco específicas e de eficácia contestável em áreas com baixa abundância de flebotomíneos (ANDRADE, 2010). O uso de compostos químicos pode melhorar o desempenho das armadilhas, tornando-as mais

específicas e eficientes. Tal aspecto já foi verificado tanto em estudos com flebotomíneos (ANDRADE *et al.*, 2008; MORTON; WARD, 1990), como com outros insetos vetores de doenças (TCHOUASSI *et al.*, 2012).

Em relação ao uso de inseticidas, muito se discute a respeito do seu custo-benefício, sobretudo quando não há uma outra estratégia de controle associada. A aplicação de inseticidas no ambiente é cara e laboriosa, além de apresentar riscos de contaminação de mananciais e intoxicação de seres humanos e animais (AMÓRA *et al.*, 2009).

Assim, a possibilidade de utilização de COVs atrativos aos flebotomíneos, associados ao uso de inseticida torna-se bastante desejável. Essa estratégia é muito utilizada na agricultura e é conhecida como controle integrado de pragas/vetores e configura-se como um enfoque ecológico para o controle de insetos vetores de doenças. Um programa unificado dessa forma consiste no uso integrado e racional de várias técnicas disponíveis e necessárias ao controle do problema. No caso do controle de flebotomíneos, o feromônio sexual de *L. longipalpis* foi utilizado como atrativo para paredes tratadas com inseticidas e armadilhas adesivas, permitindo resultados considerados satisfatórios (BRAY *et al.*, 2010; 2014). Entretanto mais estudos são necessários para aumentar a eficiência do sistema, usando inclusive odores de hospedeiros para maximizar a atração dos insetos.

O uso de semioquímicos no manejo integrado de vetores pode permitir a redução na quantidade de inseticida utilizada, minimizando os riscos de acidentes ambientais e agravos à saúde pública. Além disso, o uso racional de inseticidas, associados aos semioquímicos resultaria na diminuição do risco de desenvolvimento de resistência nos insetos. O uso de semioquímicos para o controle de vetores como a *L. longipalpis* traria ainda outros benefícios, como focar as ações em uma única espécie de interesse, pois a maioria dos compostos é espécie-específica. Os semioquímicos são ainda atóxicos, podem ser usados em pequenas quantidades e biodegradáveis.

3. HIPÓTESES DO TRABALHO

1. A capacidade infectiva de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* varia de acordo com a gravidade da doença, refletida na intensidade de manifestações de sinais clínicos e patológicos.
2. *Lutzomyia longipalpis* é atraída por diferentes compostos orgânicos voláteis exalados por cães e outros seres vivos que atuam como fontes alimentares e infectantes para esses flebotomíneos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a ação atrativa de diferentes compostos químicos a *L. longipalpis*, assim como investigar quais as características clínicas dos cães infectados com *L. infantum* associadas à maior capacidade de infectar esses vetores.

4.2. Objetivos específicos

1. Estabelecer uma metodologia para estudos comportamentais de atratividade exercida por COVs sobre a espécie *L. longipalpis* usando o túnel de vento;
2. Analisar e comparar as respostas comportamentais de machos e fêmeas de *L. longipalpis* aos diferentes compostos químicos identificados no pelo de cães infectados com *L. infantum*;
3. Investigar a resposta comportamental de machos e fêmeas de *L. longipalpis* a diferentes compostos alcoólicos (octenol, octanol, heptanol e nonanol);
4. Avaliar a infectividade de cães com diferentes formas clínicas da infecção por *L. infantum* ao vetor *L. longipalpis*;
5. Avaliar a transmissibilidade parasitária dos cães aos flebotomíneos sob diferentes procedimentos do exame de xenodiagnóstico.

CAPÍTULO 1

XENODIAGNÓSTICO EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL: ASPECTOS CANINOS E DOS FLEBOTOMÍNEOS RELACIONADOS À TRANSMISSIBILIDADE PARASITÁRIA

*Xenodiagnosis in seropositive dogs for canine leishmaniasis: dog and sand fly aspects related
with infectiousness outcome*

Jairo Torres Magalhães Junior*, Tiago Feitosa Mota, Gabriela Porfírio Passos, Daniela Farias Larangeira, Carlos Roberto Franke, Stella Maria Barrouin Melo

Universidade Federal da Bahia (UFBA), Avenida Adhemar de Barros, 500, Ondina. CEP: 40170-110. Salvador, Bahia, Brasil * jairomev@gmail.com

RESUMO

A identificação precisa de cães transmissores pode significar um avanço considerável para alcançar o controle eficaz da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. O objetivo do presente estudo foi determinar fatores associados à transmissão da *Leishmania infantum* ao vetor *Lutzomyia longipalpis*, tanto os relacionados aos cães, quanto àqueles relativos à técnica de xenodiagnóstico. O xenodiagnóstico foi realizado em 50 cães domiciliados em área endêmica, os quais foram divididos em três diferentes grupos: G1 – animais comprovadamente infectados e classificados conforme presença de sinais clínicos visíveis; G2 - animais comprovadamente infectados e classificados

conforme presença de anormalidades clínicas e patológicas; G3 – animais positivos somente no ELISA. Diferentes metodologias de xenodiagnóstico foram realizadas entre G1 e G2. Cães mais intensamente doentes apresentaram maior capacidade de infectar vetores ($p=0,042$ no G1) ($p=0,040$ no G2). No G2, a taxa de infectividade nos flebotomíneos foi significativamente menor ($p=0,0098$), quando estes se alimentaram de cães com doença moderada (0,01%), comparativamente aos cães com doença severa (38,2%). Os cães do G3 apresentaram taxa de infectividade de 11% (1/9), evidenciando que a positividade no ELISA indireto não é um bom indicador de transmissibilidade e, portanto, não deve ser utilizado como teste confirmatório para eutanásia de animais, como atualmente é realizado no Brasil. A capacidade de transmissão de *L. infantum* a *L. longipalpis* por cães mostrou ser associada à intensidade dos sinais clínicos da doença, independente da forma de classificação clínica e da técnica para avaliação dos insetos realizada no pós-xenodiagnóstico.

Palavras-chave: Flebotomíneos; Leishmaniose canina; Infectividade; Xenodiagnóstico; Transmissibilidade

ABSTRACT

The difficulty to identify dogs with transmission capabilities represents one of the main limitations for the effective control of visceral leishmaniasis in endemic areas. The

objective of this study was to determine factors associated with the transmission of *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*, in both dogs and in the xenodiagnosis technique. The xenodiagnosis was performed in 50 domiciled dogs in an endemic area. They were divided in three different groups: G1 – animals proved to be infected and classified according to the presence of visible clinical signs; G2 – animals proved to be infected and classified according to the presence of clinical and pathological abnormalities; G3 – only ELISA positive animals. Different methodologies of xenodiagnosis were applied in G1 and G2. The transmission capability of the dogs is associated with the clinical evolution of the disease, regardless of the way they were clinically classified and how the infection in the sand flies was detected ($p=0,042$ in G1) ($p=0,040$ in G2). In G2 the infectivity rate to the phlebotomines was significantly lower ($p=0,0098$), when the sand flies fed on dogs with moderate disease (0,01%), compared to dogs with severe disease (38,2%). The dogs in G3 showed infectivity rate of 11% (1/9), demonstrating that positivity in an indirect ELISA is not a good indicator of transmission capability and, therefore, should not be used as a confirmatory test for the euthanasia of animals, as it is currently done in Brazil.

Keywords: Sandflies; Canine leishmaniasis; Infectivity; Xenodiagnosis; Transmissibility.

INTRODUÇÃO

O cão é considerado um importante reservatório da leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), causada no Brasil pela *Leishmania infantum*, e representa um importante problema de saúde pública no mundo (QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAURICIO *et al.*, 2000). A doença afeta principalmente crianças e adultos imunocomprometidos, ocorrendo de maneira endêmica nas Américas (CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005; LAINSON; RANGEL, 2005), Europa e Mediterrâneo (BALLART *et al.*, 2012) e Ásia (STAUCH *et al.*, 2011). Nas Américas, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é considerado o principal vetor (LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas últimas décadas, a LVZ vem apresentando uma rápida expansão, seguida de forte tendência à urbanização (COSTA, 2008). O aumento da incidência de casos humanos e caninos em áreas endêmicas (LOPES *et al.*, 2010) tem evidenciado a ineficácia das atuais medidas de controle e a necessidade de aprofundar o conhecimento científico (ROMERO ; BOELAERT, 2010). No Brasil, tais medidas vêm sendo focadas no controle do vetor através da aplicação de inseticidas químicos ambientais, diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, educação em saúde e eliminação dos cães soropositivos (BRASIL, 2014).

O controle da LVZ é principalmente baseado na eliminação de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*. O programa de eliminação de cães tem sido rejeitado pela sociedade e criticado por estudiosos do tema, seja pelos aspectos éticos e sociais envolvidos ou por sua baixa efetividade (COSTA, 2011). Já se demonstrou que os cães soropositivos retirados são imediatamente substituídos por filhotes, suscetíveis ao desenvolvimento de altas cargas parasitárias por sua própria natureza de imaturidade imunológica (ANDRADE *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2008). LVZ nos cães tem uma complexa patofisiologia que envolve a competência imunológica dos cães (PINELLI *et al.*, 1994; AMORIM *et al.*, 2011) e culmina com o desenvolvimento de manifestações clínicas individuais e extremamente variáveis. Estudos sobre a transmissibilidade de cães tem demonstrado que simplesmente um resultado positivo em sorotestes não é suficiente para indicar que o cão é capaz de transmitir o patógeno para o vetor (DA COSTA-VAL *et. al.*, 2007). A ausência de um método que permita distinguir, entre os cães positivos, os que realmente transmitem o parasito é um importante aspecto que pode contribuir para a baixa eficácia das medidas de controle da LVZ (COURTENAY *et al.*, 2002). Um método sensível e bem padronizado possibilitaria maior enfoque das ações de controle neste grupo de cães e, por conseguinte melhor custo-benefício e eficácia para os programas.

O xenodiagnóstico é a única técnica que avalia se um determinado hospedeiro infectado com um patógeno é capaz de transmiti-lo, pelas vias naturais, ao seu vetor potencial (GUARGA *et al.*, 2000a). Apesar de sua alta especificidade, o xenodiagnóstico

possui sensibilidade relativa, podendo variar de acordo com fatores relacionados ao animal, como a sua carga parasitária, ou ainda devido a variações na execução do próprio procedimento (TRAVI *et al.*, 2001).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a infectividade de cães com diferentes formas clínicas da infecção por *L. infantum* ao vetor *L. longipalpis*. A capacidade de transmitir parasitos ao vetor foi avaliada sob diferentes procedimentos de xenodiagnóstico em cães naturalmente infectados e clinicamente classificados por meio de duas metodologias diferentes. Ademais, devido à indicação de eutanásia dos cães soropositivos no Brasil, buscou-se avaliar a transmissibilidade de cães que reagiram positivo no ELISA indireto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Aspectos Éticos

Os grupos estudados foram compostos por animais provenientes de diferentes áreas do estado da Bahia, nordeste brasileiro, sendo de ambos os sexos, com idades e raças variadas. Os critérios de inclusão dos animais no estudo foram: (1) ser domiciliado na área endêmica e (2) apresentar positividade para *L. infantum* em exames parasitológicos (Grupos 1 e 2) e ELISA indireto para o grupo 3. Todos os animais foram submetidos a xenodiagnóstico, coleta de amostras biológicas para exames laboratoriais e exame físico em um único momento.

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, sob o protocolo nº 19/2011.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais. Os grupos foram divididos de acordo com a época de realização dos testes, sendo que dentro de cada grupo os cães foram classificados de acordo com a apresentação de anormalidades clínico-patológicas por metodologias diferentes. Cães do Grupo 1 (G1) foram atendidos entre 2011 e 2013 e foi composto por cães positivos nos testes parasitológicos de baço. Estes animais foram divididos em dois grupos clínicos conforme Soares *et al.* (2011): cães infectados, porém com manifestação localizada e de no máximo 1 sinal clínico por animal (aqui denominado de infecção subclínica) e cães doentes e com manifestação de mais de um sinal clínico característico de LVZ (aqui denominado de doença clínica).

Os cães do Grupo 2 (G2) também comprovadamente positivos em testes parasitológicos, foram atendidos do ano de 2014 até maio de 2015. Esses cães foram agrupados conforme o estadiamento proposto por Solano-Gallego *et al.* (2011): Estágio 1 - doença leve; Estágio 2 - doença moderada; Estágio 3 - doença severa; e Estágio 4 - doença muito severa.

Um terceiro grupo, denominado de G3, foi formado por cães que testaram positivo no ELISA indireto, entretanto foram negativos no exame parasitológico de baço. Todos

os animais deste grupo possuíam pelo menos uma manifestação clínica característica de LV, porém a presença e intensidade destas anormalidades eram bastante variadas.

Exame físico e coleta de amostras biológicas

Todos os animais foram submetidos a exame físico para pesquisa de presença e intensidade de sinais clínicos de LVZ. Na anamnese avaliou-se a presença de medidas prévias de prevenção contra doenças infecciosas comuns tais como vacinação, vermifugação e uso de coleiras repelentes ou drogas tópicas contra ectoparasitas hematófagos. Os cães foram cuidadosamente inspecionados a procura de lesões cutâneas, epistaxe, crescimento anormal das unhas, lesões oculares, perda de peso, presença de linfadenomegalia e/ou esplenomegalia.

Os cães foram sedados com acepromazina para a biópsia de aspiração esplênica com agulha fina, segundo Barrouin-Melo et al. (2006). Ainda sob sedação, foram coletados 10 mL de sangue por punção de veia cefálica ou jugular para realização do hemograma e sorologia para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* para todos os animais. O hemograma foi realizado na busca de evidência de inflamação, anemia e infecção por outros parasitos sanguíneos. Esfregaços de sangue fresco foram preparados, secados a temperatura ambiente (23°C) e então coradas com o kit panótico rápido. As lâminas foram examinadas sob microscopia óptica (1000x) para avaliação da morfologia e contagem de células e para procura de inclusões parasitárias nas células.

Apenas para os animais do G2 foram realizados exames bioquímicos séricos, incluindo mensuração de ureia, creatinina, proteína total e frações de albumina/globulina, além das enzimas ALT e fosfatase alcalina, para avaliar resposta inflamatória e função renal e hepática. Amostras de urina foram obtidas por cistocentese para realização da urinálise.

Elisa indireto para sorodiagnóstico de LVZ

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos cães foi investigada por ELISA indireto com antígeno total solúvel de *L. infantum* segundo descrição prévia, com pequenas adaptações (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996). O antígeno consistiu de uma fração solúvel (o sobrenadante de uma centrifugação de 10.000g, por 30 minutos) do lisado de promastigotas de uma cepa local de *Leishmania*, isolada de um cão doente e caracterizada como *L. infantum* por meio de eletroforese isoenzimática e comparação com a cepa referência (LTCC – *Leishmania* Typing Culture Collection - WDCM731). Anti-IgG de cão conjugada a peroxidase (Sigma Chemical Co, USA) foi usada como segundo anticorpo. Todos os resultados foram analisados em duplicata e os valores médios de leituras de densidade óptica (DO) acima do ponto de corte foram considerados resultados positivos. O ponto de corte foi determinado pela média das leituras de DO de um pool de três soros negativos, mais três vezes o desvio padrão.

Diagnóstico parasitológico de *L. infantum*

As amostras esplênicas foram separadas em duas frações. Uma delas foi imediatamente semeada para cultivo em meio bifásico contendo 3mL de meio sólido (ágar-sangue) acrescido a 2 mL de meio Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Sigma, USA) e mantidas em cultivo a 25°C em estufa B.O.D. (Quimis, Brasil). A cultura foi examinada semanalmente, sob microscopia óptica, durante quatro semanas, para pesquisa de formas flageladas móveis. A segunda fração de aspirado esplênico de cada cão foi submetida a extração de DNA para pesquisa de infecção por PCR.

Colônia de flebotomíneos

Foram utilizados adultos de *L. longipalpis* provenientes da colônia do insetário do Laboratório de Infectologia Veterinária da UFBA. A colônia foi inicialmente formada por flebotomíneos capturados no município de Ipecaetá (12°18'00'S 39°18'28"W), estado da Bahia, e vem sendo cultivada de maneira fechada seguindo metodologia padronizada, com acesso *ad libitum* a solução açucarada a 50%. Insetos pertencentes às gerações 08 a 25 foram utilizados nos exames xenodiagnósticos nos cães.

Xenodiagnóstico

Todos os cães foram submetidos ao xenodiagnóstico, entretanto a execução da técnica sofreu alterações conforme os grupos experimentais. Para os animais dos grupos

1 e 3, foram utilizados 40 fêmeas e 15 machos por procedimento, com 3 a 4 dias de emersão. Os flebotomíneos foram acondicionados dentro de recipientes específicos (4 cm de altura e 3 cm de diâmetro) e foram colocados em contato com a face interna da orelha dos cães por 30 minutos para o repasto sanguíneo, com os animais previamente sedados com acepromazina a 1% (0,5 mg/kg). Após a alimentação, os flebotomíneos foram transferidos para gaiolas próprias (10x10x10 cm) e mantidos durante cinco dias com alimentação açucarada no laboratório. Ao final do período, mortalidade das fêmeas foi contabilizada e a taxa de alimentação determinada por microscopia óptica. Todas as fêmeas utilizadas foram acondicionadas em tubos estéreis com tampa e mantidas a -20° para extração de DNA e pesquisa de infecção por *L. infantum* por PCR.

Para os animais do G2 foram utilizadas exclusivamente 40 fêmeas de *L. longipalpis* com jejum prévio de 24 horas, com retirada da fonte de alimentação açucarada. Posteriormente, seguiu-se o mesmo procedimento para o repasto sanguíneo anteriormente descrito. Após o repasto, as fêmeas voltavam para o laboratório, onde era contabilizada a taxa de alimentação e apenas as fêmeas ingurgitadas eram transferidas para gaiolas próprias. Estas eram mantidas utilizando solução açucarada por 10 dias. Após esse período, procedia-se a dissecação das fêmeas sobreviventes, seguida de observação direta das formas promastigotas no aparelho digestório das fêmeas com auxílio de microscopia óptica (400X).

PCR para Detecção de DNA de *L. infantum*

Todos os flebotomíneos utilizados no xenodiagnóstico dos grupos 1 e 3 foram macerados a seco com o auxílio de agulha estéril. As fêmeas que realizavam o repasto sanguíneo foram avaliadas em pools, onde cada pool representava um animal avaliado. Para extração de DNA dos flebotomíneos foi utilizado kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit*[®], enquanto para as amostras de aspirado esplênico foi utilizado o kit comercial *Purelink Genomic DNA mini kit*[®], em ambos foram seguidas as instruções dos fabricantes. A PCR foi desenvolvida com oligonucleotídeos iniciadores RV1 (forward; 5'- CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (reverso; 5'- CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') cujo alvo é a região conservada do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum*, segundo Lachaud et al. (2002). Em volumes de 50 µL, as reações foram realizadas com 50 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 20 pmol/ µL de Taq DNA polimerase, 75 mM de Tris- HCl, 50 mM de KCl Tampão e 1 µL de DNA teste. A reação foi executada a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 67°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os controles negativos da PCR foram água tratada com dietil pirocarbonato, DNA de aspirado esplênico de cão saudável de área não endêmica para LVZ e DNA de flebotomíneos não utilizados em xenodiagnóstico; os controles positivos foram DNA purificado de *L. infantum* e amostras de aspirado esplênico de cães portadores de infecção natural confirmada pelo cultivo. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (Master cycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) e o produto

originado da amplificação foi determinado por eletroforese em gel de agarose (1,5%) com 20 µL da mistura de reação.

Análise dos Dados

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação de médias entre dados não paramétricos (taxa de infectividade dos flebotomíneos no G2) e o teste de qui-quadrado para comparar diferentes proporções a partir de uma tabela de contingência (diferenças de infectividade e das taxas de alimentação dos flebotomíneos entre os grupos de cães). O teste Exato de Fisher quando o qui-quadrado não era aconselhável. Foi levado em consideração o valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Um total de 50 animais foi avaliado nesse estudo, sendo que 41 foram animais positivos no exame parasitológico (26 cães do G1 e 15 do G2) e 09 foram animais positivos apenas na sorologia, sendo agrupados no G3. Segundo a classificação clínica empregada no G1, 11/26 (42%) e 15/26 (58%) foram categorizados com tendo infecção subclínica e doença clínica, respectivamente. Entre os 15 cães do G2, um animal estava no estágio 1, cinco estavam no estágio 2 e nove no estágio 3. Nenhum animal se encontrava no estágio 4. Dessa forma, para facilitar a análise dos dados, os cães do estágio 1 e 2, foram agrupados em um único grupo denominado aqui de doença moderada,

totalizando 6/15 (40%). Enquanto o grupo de doença severa permaneceu com 09/15 (60%).

Segundo a avaliação de transmissibilidade por xenodiagnóstico no G1, 15/26 (58%) foram capazes de transmitir o parasito ao vetor na avaliação por PCR, realizada cinco dias após o repasto sanguíneo. Enquanto nos cães do G2, 8/15 (53%) cães transmitiram o parasito ao vetor na avaliação por visualização direta após dissecação. Demonstrando que as taxas de infectividade dos cães foram semelhantes entre G1 e G2 ($p=0,47$), independente da técnica de xenodiagnóstico empregada e da forma que a infecção nos flebotomíneos foi detectada. Ainda comparando os diferentes protocolos de xenodiagnóstico que foram empregas nos dois períodos, a taxa de alimentação foi significativamente maior no segundo período (87%), do que no primeiro período (57%) ($p<0.0001$).

Os cães do G3 apresentaram taxa de infectividade de 11% (01/09), sendo que esta taxa foi significativamente menor do que a comparação com os cães do G1 ($p=0,01$) e os cães do G2 ($p=0,04$).

Na avaliação de transmissibilidade por classificação clínica nos cães do G1, 3/10 (30%) dos cães portadores de infecção subclínica foram infectivos ao vetor, por outro lado 12/16 (75%) cães com doença clínica foram transmissores. Evidenciando que os cães com doença clínica tiveram maior taxa de transmissão, do que os cães com infecção subclínica ($p=0,042$).

Enquanto nos cães do G2, 1/6 (17%) dos cães que foram classificados com doença moderada foram transmissores, enquanto 7/9 (78%) dos cães com doença severa foram infectivos ao vetor. Mostrando que os cães com doença severa tiveram maior taxa de transmissão, do que os cães com doença moderada ($p=0,040$). Em relação à transmissibilidade dos flebotomíneos do G2, a proporção de infectividade foi maior nos flebotomíneos que se alimentaram nos cães com doença severa (38,2%), do que naqueles que realizam o repasto em cães com doença moderada (0,01%), ratificando que a transmissibilidade foi maior nos cães com doença severa ($p=0,0098$) (Tabela 1).

Tabela 1. Número e porcentagem de flebotomíneos infectados a partir do xenodiagnóstico realizado em cães com doença clínica moderada e severa (G2).

Estágio clínico	Nº cães	Flebotomíneos	
		Positivos/Examinados	% de infectividade
Moderado	6	1/101	0,01
Severo	9	63/165	38,2

DISCUSSÃO

Até o presente, não há um método diagnóstico indireto que determine se um cão infectado com *L. infantum* é um transmissor potencial ou real. Elementos mensuráveis indicativos de transmissão de parasitos ao vetor por cães seriam importantes para o

estabelecimento de estratégias mais eficazes de controle e vigilância da LVZ. A concentração de ações e medidas sobre um grupo específico e menor de animais possibilitaria menores esforços e custos para o sistema de saúde pública (COURTENAY *et al.*, 2002), além de reduzir o número de cães sacrificados (MORENO ; ALVAR, 2002) e favorecer a manutenção de cães resistentes à doença em área endêmica.

O xenodiagnóstico é a única ferramenta que produz dados concludentes para diferenciar cães transmissores dos não transmissores. Apesar de sua indiscutível importância, seu uso na rotina não é factível e até na pesquisa seu uso é limitado, sobretudo devido às dificuldades de criação dos flebotomíneos em laboratório (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007). Assim, em vista da necessidade de identificação de cães transmissores, alguns estudos avaliaram possíveis indicadores de transmissibilidade que pudessem substituir o xenodiagnóstico, sendo sugerido que altos níveis de IgG e IgG2 (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007) e baixas contagens de células T CD4+ (GUARGA *et al.*, 2000b) são possíveis indicadores de altas taxas de infectividade ao vetor.

Não obstante, a presença de sinais clínicos é considerada um dos indicadores mais confiáveis de transmissibilidade. Diversos estudos, tanto na Europa como na América, afirmam que quanto maior a presença de sinais característicos de LV, maior é a carga parasitária provável e consequentemente maior a possibilidade do cão transmitir o parasito ao vetor (MOLINA *et al.*, 1994; TRAVI *et al.*, 2001; DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; VERÇOSA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011). Entretanto, existe certa discordância no que se refere à capacidade de transmissão pelos cães clinicamente hígidos

(DYE *et al.*, 1992), sendo que Laurenti *et al.* (2013) encontraram que cães assintomáticos foram mais competentes para transmitir o parasito ao vetor do que cães sintomáticos. Dois principais motivos podem incitar tal controvérsia: (1) existem dois tipos de cães hígidos, aqueles considerados verdadeiros, que podem ser definidos como animais residentes em área endêmica e que desenvolveram resposta imunológica predominantemente do tipo celular, tornando-se resistentes ao desenvolvimento de doença clínica (PINELLI *et al.*, 1994). Esses animais muito provavelmente não são eficazes em transmitir o parasito. Outro grupo de cães clinicamente hígidos, chamados por alguns autores de “pré-sintomáticos”, são aqueles que apesar de no momento da análise ainda não apresentarem sinais clínicos, não possuem imunocompetência contra a infecção e desenvolverão sinais da doença em breve período de tempo (COURTENAY *et al.*, 2002). (2) Outro motivo de controvérsia é a diferença nos critérios utilizados na classificação clínica dos cães, que não segue um padrão nos estudos disponíveis e dificulta comparações consistentes (QUINNELL ; COURTENAY, 2009).

Estudos anteriores classificaram os cães com LVZ em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (MANCIANTI *et al.*, 1988; MOLINA *et al.*, 1994; GUARGA *et al.*, 2000b; DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007), abordagem semelhante à utilizada aqui para classificar os cães do G1, segundo a qual o número de sinais clínicos é contabilizado no momento do exame físico. Tal classificação é limitada do ponto de vista clínico, pois considera apenas os sinais clínicos visíveis, ignorando anormalidades clínicas e patológicas subjacentes, além de não levar em

consideração a extensão da lesão e o nível de comprometimento da mesma no organismo animal (SOLANO-GALLEG0 *et al.*, 2011). Assim, o estadiamento clínico proposto por Solano-Gallego *et al.* (2011) é mais preciso em determinar a indicação terapêutica, o prognóstico e, possivelmente a capacidade infectiva do animal, entretanto é mais caro e laborioso, dificultando a sua realização em nível de saúde pública. Neste trabalho, independente da metodologia de classificação clínica utilizada, os animais com maior evolução clínica (achados clínicos e laboratoriais alterados) demonstraram ter maiores taxas de transmissibilidade.

Nos cães do G3, apenas 01/09 (11%) teve capacidade de infectar o vetor. Apresentando uma taxa de infectividade menor quando comparado a todos os cães do G1 (58%) e do G2 (53%), independente da classificação clínica. Este resultado demonstra que a soro positividade unicamente, não é um bom indicador de transmissibilidade. O ELISA indireto é uma técnica bastante sensível, porém apresenta moderada especificidade, já tendo sido descrito a possibilidade de reação cruzada com outras doenças infecciosas (FERREIRA *et al.*, 2007; METTLER *et al.*, 2005). Este é um importante resultado, pois no Brasil o ELISA indireto é utilizado como teste confirmatório do diagnóstico canino, sendo que a recomendação para estes animais é a eutanásia (COURA-VITAL *et al.*, 2014). Assim, é possível que parte dos animais eliminados no Brasil, muito possivelmente não estava contribuindo para a manutenção do ciclo epidemiológico da doença, podendo inclusive nem estar infectados com *L. infantum*, agravando o debate ético acerca da situação.

Além de fatores inerentes aos cães, os relacionados à própria técnica do xenodiagnóstico também podem estar relacionados com os resultados obtidos. Nos estudos disponíveis para avaliar a taxa de transmissão utilizando xenodiagnóstico, existe grande variação na forma de realizá-lo. Em alguns estudos, os flebotomíneos são soltos em gaiola onde é colocada a cabeça do cão sedado (GUARGA *et al.*, 2000b; MOLINA *et al.*, 1994), ou o animal inteiro (COURTENAY *et al.*, 2002); porém na maioria dos estudos os flebotomíneos são colocados dentro de recipientes próprios com diferentes tamanhos. Outro aspecto é a variação nos números de insetos machos e fêmeas empregados em cada exame, assim como o tempo de repasto (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011). Todas essas diferenças naturalmente implicam variações nas taxas de alimentação e, possivelmente variação na sensibilidade do teste, pois quanto maior o número de fêmeas alimentadas, maiores as chances de transferência do parasito ao vetor por cães infectados. Assim como no estudo realizado por Molina et al. (1994), neste trabalho a taxa de alimentação foi muito variada e possivelmente sofreu interferência de fatores externos não analisados, como umidade, temperatura e sons ambientais. Aqui foi verificado uma maior média de fêmeas alimentadas no segundo período, o que provavelmente está relacionada com o jejum energético realizado 24 horas do repasto sanguíneo, possibilitando uma maior avidez das fêmeas pela alimentação. Por outro lado, a não utilização dos machos de flebotomíneos na segunda metodologia, demonstra que apesar dos machos realizarem importante função

de atração das fêmeas para o repasto sanguíneo na natureza (KELLY; DYE, 1997), a presença deles não é necessária em ambiente controlado.

Outro fator importante a ser analisado é a taxa de sobrevivência das fêmeas até o momento da análise da infecção. Neste trabalho, os períodos em dias entre a alimentação e análise da infecção foram muito diferentes, portanto inviabiliza uma comparação. Entretanto em ambos os períodos houve uma sobrevivência maior do que 50% das fêmeas. A sobrevivência dos insetos após o repasto sanguíneo é fator necessário para a multiplicação e desenvolvimento dos parasitos dentro do seu trato gastrointestinal e consequentemente, quanto maior a taxa de mortalidade, menores as chances de detecção do parasito.

Neste sentido é importante ressaltar que nas primeiras 48-72 horas após a ingestão do sangue infectado, cerca de metade dos parasitos são destruídas por enzimas digestivas e eliminado junto com as fezes, sendo que neste momento a *Leishmania* encontra-se na fase de promastigotas leptomonodas, as quais são pouco móveis e estão distribuídas por todo o intestino torácico do flebotomíneo, diminuindo a capacidade de visualizá-las. Assim a sensibilidade do teste é menor quando a dissecação é feita cinco dias após a alimentação, tornando-se importante a realização da PCR convencional. Apesar desse aumento de sensibilidade, a positividade na PCR não garante que a infecção intestinal está a termo, visto que nesta técnica detecta-se apenas material genético (KAMHAWI, 2006).

Por outro lado, quando a inspeção do intestino é realizada 8-9 dias após o repasto sanguíneo, o tempo decorrido permite que tenha havido um aumento significativo do número de parasitas e estes estão concentrados na válvula estomodeal do flebotomíneo, o que aumenta a capacidade de detecção. Além disso neste momento é possível observar as formas promastigotas metacíclicas, garantindo assim que a infecção atingiu seu auge (KAMHAWI, 2006).

Nossos dados revelam que a capacidade de transmissão dos cães está associada a evolução clínica da doença, independente da forma de classificação clínica realizada e da maneira que a infecção nos flebotomíneos foi detectada. Quando se compara as diferentes metodologias do exame de xenodiagnóstico aqui realizadas, o procedimento utilizando fêmeas em jejum energético, sem utilização de machos durante o repasto sanguíneo, assim como a execução da dissecação 10 dias após o repasto sanguíneo, torna o procedimento mais sensível e confiável para avaliar se uma fêmea de flebotomíneo após ingerir *L. infantum* de um cão, tem capacidade de passar à infecção a diante. Por outro lado, o estadiamento da infecção baseado em características clínicas-patológicas associadas, fornece maior segurança na identificação de um animal transmissor. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a sua aplicabilidade e principalmente viabilidade econômica em nível de saúde pública. Por fim, destaca-se a necessidade de uma reavaliação nos critérios utilizados para definição da eutanásia de cães no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq– Proc. N. 307475/2008-5 e 479753/2009-1) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB – Ped. N. 4749 / 2009). Agradecemos à FAPESB a concessão de bolsa de doutorado (JTMJ).

REFERÊNCIAS

- Andrade, A.M., Queiroz, L.H., Nunes, G.R., Perri, S.H.V., Nunes, C.M., 2007. Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 594-595.
- Amorim, I.F., Silva, S.M., Figueiredo, M.M., Moura, E.P., Castro, R.S., Lima, T.K., Gontijo, N. F., Michalick, M.S., Gollob, K.J., Tafuri, W.L., 2011. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 6 (11):e27679.
- Ballart, C., Alcover, M., Portus, M., Gallego, M., 2012. Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 134-136.
- Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., de Andrade Filho, F.A., Trigo, J., Julião, F.S., Franke, C.R., Palis Aguiar, P.H., Conrado dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2006. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis

- of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. Vet. J. 171, 331-339.
- Brasil 2014. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Saúde, M.d., ed. (Brasília, Editora do Ministério da Saúde), p. 122. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
- Campos-Ponce, M., Ponce, C., Ponce, E., Maingon, R., 2005. *Leishmania infantum/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. Exp. Parasitol. 109, 209-219.
- Costa, C.H.N., 2011. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 232-242.
- Coura-Vital, W., Ker, H.G., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Leal, G.G., Moreira, N.D., Oliveira, L.A., de Menezes-Machado, E.M., Moraes, M.H., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, M., Reis, A.B., 2014. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. PLoS One. Mar 7;9(3):e91009.
- Courtenay, O., Quinell, R.J., Garcez, L.M., Shaw, J.J., Dye, C., 2002. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. J. Infect. Dis. 186, 1314-1320.
- Da Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., de Figueiredo Gontijo, N., Marques Michalick, M.S., Alexander, B., Williams, P., Melo, M.N., 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia longipalpis* infectivity. Vet. J. 174, 636-643.
- Dye, C., Killick-Kendrick, R., Vitutia, M., Walton, R., Killick-Kendrick, M., Harith, A., Guy, M., Canavate, M., Hasibeder, G., 1992. Epidemiology of canine

- leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105, 35-41.
- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Da Silva ES, et al., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*; 146:235-241.
- Guarga, J.L., Lucientes, J., Peribáñez, M.A., Molina, R., Gracia, M.J., Castillo, J.A., 2000a. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta. Trop.* 77, 203-207.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribánzz, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000b. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249-253.
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22, 439-445.
- Kelly, D. W., Dye, C., 1997. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim. Behav.*, 53, 721–731.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210-215.
- Laurenti, M.D., Rossi, C.N., da Matta, V.L., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Marcondes, M., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.* 23, 296–300.

- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.
- Lopes, E., Magalhães, D., Silva, J., Haddad, J., Moreira, E., 2010. Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 1062-1071.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566-567.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes PJ., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Clin Microbiol*; 43:5515-5519.
- Michalsky, É.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, Á.J., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67-76.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491-493.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399-405.

- Nunes, C.M., Lima, V.M.F., Paula, H.B., Perri, S.H.V., Andrade, A.M., Dias, F.E.F., Burattini, M.N., 2008. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 153, 19-23.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L. A. R., Santos, W. C., Grimaldi, G. Jr., Pontes-de-Carvalho, L. C., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 39–44
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., Ruitenberg, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229-235.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.
- Romero, G.A.S., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e584.
- Stauch, A., Sarkar, R.R., Picado, A., Ostry, B., Sundar, S., Rijal, S., Boelaert, M., Dujardin, J.C., Duerr, H.P., 2011. Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1405.
- Soares, M.R.A., Mendonça, I.L., Bonfim, J.M., Rodrigues, J.A., Werneck, G.L., Costa, C.H.N., 2011. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.* 117, 6-9.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Grazia Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors* 4, 1-16.
- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C., Osorio, Y., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 119-124.

Verçosa, B., Lemos, C., Mendonça, I., Silva, S., De Carvalho, S., Goto, H., Costa, F., 2008. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. BMC Vet. Res. 4, 45.

CAPÍTULO 2

ATRAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) PARA COMPOSTOS QUÍMICOS EXALADOS DO PELO DE CÃES

Attraction of the sand fly Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds emitted by hair of dogs

Jairo Torres Magalhães Junior^{1*}, Alex Oliva Filho¹, Hugo Oliveira Novais¹, Paulo Roberto Ribeiro Mesquita¹, Frederico de Medeiros Rodrigues², Mara Cristina Pinto³, Stella Maria Barrouin Melo¹

¹Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; ²Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; ³Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP * jairomev@gmail.com

RESUMO

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da *L. infantum* nas Américas, por esse motivo vários trabalhos são realizados objetivando identificar novas alternativas para o seu controle, sobretudo com o uso de atrativos químicos. A atratividade da *L. longipalpis* já foi demonstrada em testes laboratoriais para odores exalados de raposa, assim como para álcoois encontrados em algumas plantas. Entretanto nenhum trabalho avaliou a atração destes insetos para odores de cães, que são considerados os principais hospedeiros de *L. infantum*. Este trabalho investigou a

atratividade em laboratório de diferentes compostos orgânicos voláteis identificados no pelo de cães para *L. longipalpis*. Machos e fêmeas dos insetos foram avaliados na metodologia de túnel de vento. Entre os compostos avaliados, octanal, decanal e heptadecano demonstraram exercer capacidade atrativa aos machos de *L. longipalpis*, sendo que apenas o decanal foi considerado atrativo para as fêmeas. COV's exalados de cães podem ser uma interessante fonte na busca de novos atrativos para flebotomíneos.

Palavras-chaves: Flebotomíneos, Cairomônio, Pelo de cães, Octanal, Decanal, Heptadecano, Atração, Túnel de vento.

ABSTRACT

The phlebotomine *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of *L. infantum* in the Americas, for this reason, many studies are performed aiming to identify new alternatives for the control, especially with the use of chemical attractors. The attractiveness of *L. longipalpis* has already been shown in laboratory tests to odors exhaled from foxes, as well as to alcohol found in some plants. However, no study evaluated the attraction of these insects to odors from dogs, which are considered as the main host for *L. infantum*. This work investigated the attractiveness, in laboratory conditions, of different volatile organic compounds (VOCs), identified in the hair of dogs, to *L. longipalpis*. Both males and females of the sand fly were evaluated by the wind tunnel methodology. Between the evaluated compounds octanal, decanal and heptadecane showed to have attractive

capability to males of *L. longipalpis*, while only the decanal was considered attractive to females. Exhaled VOCs from dogs might be an interesting source in the search for new attractors to sand flies.

Keywords: Sandflies, Kairomone, Hair of dog, Octanal, Decanal, Heptadecane, Attraction, Wind tunnel

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) encontra-se em franca expansão em todo o mundo, apesar das recorrentes tentativas de controle (ALVAR *et al.*, 2012). No Brasil, a situação torna-se mais preocupante quando se avalia a atual tendência à urbanização da doença (LAINSON e RANGEL, 2005), associada à crescente degradação ambiental que favorece sua disseminação (DIAS-LIMA *et al.*, 2003), bem como a exposição de populações susceptíveis e a ineficácia das atuais medidas de combate à enfermidade (WERNECK, 2008).

No Brasil, as ações para vigilância e controle da LV são basicamente centradas no tratamento dos doentes, aplicação de inseticidas para controle do vetor e identificação e eliminação de cães infectados (BRASIL, 2014). A eutanásia dos cães, entretanto, além de muito polêmica do ponto de vista social e ético, não tem conseguido controlar a

expansão da doença. Assim, tem sido sugerida a necessidade de se redirecionar o controle da doença canina e humana no Brasil (ROMERO e BOELAERT, 2010).

Nesse sentido, as ações voltadas ao controle vetorial devem ser reforçadas na busca por um controle efetivo da doença. As medidas voltadas ao inseto transmissor visam investigar a presença e dispersão dos flebotomíneos utilizando armadilhas luminosas para captura, sendo que em casos de alta densidade populacional do inseto associada ao aparecimento de casos da doença, recomenda-se o uso de inseticidas químicos residuais (BRASIL, 2014).

Entretanto estas ações tem custo-benefício discutível, pois (1) as armadilhas luminosas utilizadas para captura dos flebotomíneos são inespecíficas, capturando outros insetos; (2) Tendem a selecionar espécies mais fototrópicas de flebotomíneos; (3) O uso de inseticidas sem nenhuma estratégia associada, pode ocasionar intoxicações em animais e seres humanos, supressão de insetos com importância ecológica, desenvolvimento de resistência nos insetos, além de ser caro e laborioso. Com isso, o monitoramento ou controle vetorial baseados na atratividade dos flebotomíneos a compostos químicos vem ganhando destaque.

Alguns estudos têm demonstrado o comportamento de atratividade da *L. longipalpis*, principal espécie transmissora da LV nas Américas, a compostos exalados de raposa (*Vulpes vulpes*) (DOUGHERTY *et al.*, 1999) e álcoois encontrados em plantas

(MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2014a). Esses compostos podem ser utilizados como iscas nas armadilhas luminosas, aumentando a capacidade de atração dos insetos, ou ainda associado com inseticidas residuais melhorando a eficácia de seu uso, como já demonstrado para o feromônio liberado por machos de *L. longipalpis* (BRAY *et al.*, 2014).

O cão é considerado o principal hospedeiro doméstico da LV, principalmente devido a sua alta susceptibilidade a *L. infantum* e aos altos índices de prevalência em áreas endêmicas (MONTEIRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005). Apesar disso, pouco se tem estudado a capacidade atrativa que os cães exercem sobre os flebotomíneos. Recentemente demonstrou-se que o pelo de cães naturalmente infectados com *L. infantum* exala um perfil de compostos orgânicos voláteis diferentes do pelo de cães saudáveis, sendo que os compostos octanal, heptadecano, tetradecano e decanal foram identificados como possíveis biomarcadores da presença de *L. infantum* em cães, independente do grau de infecção dos animais (MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2014b).

O presente estudo investigou a atratividade de diferentes compostos orgânicos voláteis identificados no pelo de cães para *Lutzomyia longipalpis* usando a metodologia de túnel de vento.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Flebotomíneos foram coletados em Ipecaetá (12°18'00'S 39°18'28"W), estado da Bahia e mantidos em uma colônia do Laboratório de Infectologia Veterinária (Universidade Federal da Bahia). Os insetos foram mantidos em laboratório por 25 gerações, sem inclusão de espécimes do campo, usando métodos de cultivo padronizados. Os insetos foram mantidos em gaiolas de tecido, com acesso a solução 50% de açúcar, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80–90% de umidade.

Experimentos no Túnel de vento

O túnel de vento utilizado foi construído em policarbonato, possuindo 150 cm de comprimento, 60 cm de altura e 60 cm de largura. Tem em uma de suas extremidades um exaustor de ar, que capta o ar da sala de experimento e forma um fluxo laminar unidirecional dentro do túnel. Ao entrar no sistema, o fluxo de ar é filtrado por carvão ativado, passa primeiro pela plataforma de liberação de odor e segue para o lado onde os flebotomíneos são liberados. Para os testes, foi utilizado o fluxo de ar na velocidade de 3,06 cm/s. Devido ao comportamento de voo dos flebotomíneos, um túnel de tecido *voil* (110 cm de comprimento, 30 cm de altura e 30 cm de largura) foi instalado internamente no centro do túnel de acrílico, conforme descrito anteriormente Spiegel et al.(2005).

Foram utilizados flebotomíneos machos e fêmeas, com idade entre 3 a 5 dias de idade. Utilizaram-se três insetos por teste, totalizando 60 flebotomíneos para cada concentração do composto avaliado. Para o controle negativo, foram utilizados 90 insetos de cada sexo. Os insetos foram colocados dentro de caixas de acrílico (6 X 6 X 6 cm) e mantidos por 20 minutos nas condições do experimento para acondicionamento dos flebotomíneos. As caixas contendo os insetos foram colocadas em plataforma de 26 cm de altura, a 110 cm de distância onde o composto químico era liberado e na mesma altura deste. A liberação dos insetos era feita externamente ao túnel, tomando cuidado para que não houvesse movimentos bruscos durante a abertura. Cada teste teve 2 minutos de duração, onde eram observados os comportamentos de ativação (porcentagem de flebotomíneos que voavam da plataforma de liberação em direção à plataforma de odor) e a atração dos insetos (porcentagem de flebotomíneos que voavam mais que 35 cm dentro do túnel em direção a plataforma de odor). Nós consideramos a distância de 35 cm para caracterizar atração, pois ela equivale a 1/3 do tamanho do túnel de tecido conforme estabelecido por Spiegel *et al.* (2005). Não houve repetições de indivíduos em nenhum teste. Em cada intervalo entre experimentos, todo o sistema era desmontado, limpo com hexano e secado à temperatura ambiente.

Para evitar a influência de outros fatores na atração dos insetos, que não a dos compostos testados, os testes foram realizados em sala climatizada e no escuro. Utilizou-se apenas uma luz vermelha dentro do túnel para a visualização dos insetos, pois essa faixa de luz não é captada pelos insetos.

Os compostos avaliados foram: octanal, heptadecano, tetradecano e decanal (respectivamente octanal 99%, heptadecano 99%, tetradecano $\geq 99\%$, decanal $\geq 98\%$ - Aldrich Chemical). Todos os compostos foram diluídos em hexano e testados na concentração de 50% e 100% (puro). Hexano puro foi utilizado como controle negativo. Utilizou-se 200 μ L de cada concentração, colocados em papel filtro (4 X 4 cm) que ficava pendurado na entrada do fluxo de ar.

Análise Estatística

O teste qui-quadrado foi utilizado para avaliar diferentes proporções de fêmeas e machos de flebotomíneos ativados e atraídos por cada composto. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.3 (Disponível em <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/>).

RESULTADOS

Os resultados de ativação e atração de machos e fêmeas de flebotomíneos para os diferentes compostos avaliados estão demonstrados na Tabela 1. O decanal promoveu a melhor resposta atrativa entre todos os compostos testados, demonstrando ativar mais machos e fêmeas, quando puro ou na concentração de 50%. Em relação ao comportamento de atração, apenas os machos apresentaram uma resposta significativa frente ao decanal 50 e 100%.

Tabela 1. Porcentagem de ativação e atração de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* para compostos químicos identificados no pelo de cães infectados com *L. infantum*.

Composto	Fêmeas		Machos	
	Ativação (%)	Atração (%)	Ativação (%)	Atração (%)
Controle	21 a	1 a	13 a	3 a
Octanal 50%	30 a	2 a	30 b	8 b
Octanal 100%	28 a	5 a	42 b	7 a
Decanal 50%	37 b	3 a	39 b	10 b
Decanal 100%	37 b	5 a	35 b	8 b
Tetradecano 50%	25 a	2 a	15 a	2 a
Tetradecano 100%	20 a	3 a	20 a	3 a
Heptadecano 50%	27 a	3 a	25 a	0 a
Heptadecano 100%	27 a	2 a	32 b	5 a

Para cada composto, diferentes letras dentro da coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

O octanal incitou uma resposta de ativação para machos na concentração de 50 e 100%. Sendo que a resposta de atração foi significativa apenas para a concentração de 50%. Não houve comportamento atrativo significativo para as fêmeas.

O heptadecano provocou uma resposta atrativa unicamente para os machos, na concentração de 100%, enquanto o tetradecano não estimulou uma resposta

comportamental de atração para os flebotomíneos machos e fêmeas, independente da concentração avaliada.

DISCUSSÃO

Os Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) octanal, decanal e heptadecano demonstraram exercer capacidade atrativa aos machos de *L. longipalpis*, sendo que apenas o decanal foi considerado atrativo para as fêmeas dos insetos. Estes COV's são exalados do pelo canino e foram identificados como possíveis biomarcadores da infecção de *L. infantum* em cães (MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2014b). Para a identificação destes COV's os autores levaram em consideração a magnitude da presença destes compostos em cães infectados, na comparação com cães não infectados. Dessa forma,

Na natureza, os machos de *L. longipalpis* são atraídos primeiro para possíveis fontes sanguíneas e só então, a partir da formação de agregados de machos, é que as fêmeas, únicas que realizam o repasto sanguíneo, são atraídas para os animais (KELLY E DYE, 1997). Essa dinâmica de agregação, que é mediada pelo feromônio liberado por machos e por cairomônio de hospedeiros, pode explicar a maior atratividade dos machos de *L. longipalpis* aos COV's exalados de cães, conforme demonstrado neste estudo.

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que avaliou a atratividade de flebotomíneos a estes aldeídos e alcanos. Entretanto outros trabalhos já avaliaram a

atratividade desses compostos para outros insetos hematófagos, sobretudo para os aldeídos octanal e decanal. Tais compostos são normalmente encontrados em substâncias voláteis exaladas da pele de seres humanos (LOGAN *et al.*, 2008; SYED *et al.*, 2009) e de outros animais como vaca, cabra, macacos e ovelha (TCHOUASSI *et al.*, 2013). Estes compostos quando testados isoladamente não demonstraram atratividade em testes de campo para os mosquitos *Aedes mcintoshi* e *Ae. ochraceus*, principais vetores da febre do Vale do Rifti na África, entretanto quando avaliados associados a outros aldeídos (heptanal e nonanal) mostraram grande atratividade a estas espécies de mosquitos (TCHOUASSI *et al.*, 2013). Da mesma forma, essa mistura de aldeídos em concentrações específicas (heptanal = 2 mg/ml, octanal = 0.5 mg/ml, nonanal = 0.1 mg/ml e decanal = 0.1 mg/ml) foi atrativo para *Anopheles gambiae* e *An. funestus* (NYASEMBE *et al.*, 2014).

Por outro lado, octanal e decanal demonstraram um efeito protetor contra a picada de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* quando diferentes concentrações desses compostos foram aplicados no antebraço de seres humanos, sugerindo uma possível resposta comportamental de repulsão dos insetos a esses compostos (LOGAN *et al.*, 2010). Efeito semelhante já havia sido verificado em *Ae. aegypti* por meio de olfatômetro (LOGAN *et al.*, 2008), sendo que Douglas *et al.*, (2005) também observaram que o decanal exercia um efeito repelente para o *Ae. aegypti*. Esses autores identificaram o

decanal (e outros aldeídos) no odor de pássaros marinhos (*Aethia cristatella*) e sugeriram que os aldeídos funcionam como repelente natural contra ectoparasitos nessas aves.

O tetradecano já foi identificado no ar exalado de seres humanos (WANG *et al.*, 2014), entretanto não há relatos de sua interferência no comportamento de insetos hematófagos. No presente estudo, o tetradecano não evocou resposta atrativa em machos e fêmeas de *L. longipalpis*.

O heptadecano, por sua vez, já foi identificado em voláteis de flores (DENG *et al.*, 2004), enquanto o decanal foi encontrado em folhas de cânfora (LI *et al.*, 2010) e octenal e decanal em folhas de sorgo (PADMAJA *et al.*, 2010). A atração de flebotomíneos por voláteis encontrados em plantas já foi demonstrada (MULLER *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2015), sugerindo que esses insetos são atraídos por tais fitoquímicos em busca do açúcar necessário para sobreviverem.

Nossos resultados mostram que compostos químicos exalados do pelo de cães exercem um comportamento atrativo para flebotomíneos. O composto decanal promoveu a melhor resposta atrativa a fêmeas e machos de *L. longipalpis* em bioensaio.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB – Ped. N. 498/2011 e Ped. N. 1799/2012). Agradecemos à FAPESB a concessão de bolsa de doutorado (JTMJ).

REFERÊNCIAS

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*.;7(5):e35671.

Brasil 2014. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Saúde, M.d., ed. (Brasília, Editora do Ministério da Saúde), p. 122. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf

Bray, D.P., Carter, V., Alves, G.B., Brazil, R.P., Bandi, K.K., Hamilton, J.G. 2014. Synthetic sex pheromone in a long-lasting lure attracts the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 weeks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 20; 8 (3).

Dias-Lima, A.G., Guedes, M.L., Sherlock, I.A. 2003. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga

and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(6):733-7.

Deng, C., Song, G., Hu, Y. 2004. Rapid determination of volatile compounds emitted from *Chimonanthus praecox* flowers by HS-SPME-GC-MS. *Z Naturforsch C*. 59 (9-10) : 636-40.

Dougherty, M. J., Guerin, P. M., Ward, R. D., Hamilton, J. G. C. 1999. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. *Physiological Entomology*, v. 24, n. 3, p. 251-262,

Douglas, H.D., Co, J.E., Jones, T.H., Conner, W.E., Day, J.F. 2005. Chemical odorant of colonial seabird repels mosquitoes. *J Med Entomol*, 42:647-651.

Kelly, D. W., Dye, C., 1997. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim. Behav.*, 53, 721–731.

Lainson, R., Rangel, E.F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100 (8):811-27.

Logan, J.G., Birkett, M.A., Clark, S.J., Powers, S., Seal, N.J., Wadhams, L.J., Mordue, A.J., Pickett, J.A. 2008. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Chem Ecol*, 34:308-322.

Logan, J.G., Stanczyk, N.M., Hassanali, A., Kemei, J., Santana, A.E., Ribeiro, K.A., Pickett, J.A., Mordue (Luntz), A.J. 2010. Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents. *Malar J.* 20; 9:239.

Li, J., Wakui, R., Tebayashi, S., Kim, C.S. 2010. Volatile attractants for the common bluebottle, *Graphium sarpedon nipponum*, from the host, *Cinnamomum camphora*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74 (10):1987-90.

Nyasembe, V.O., Tchouassi, D.P., Kirwa, H.K., Foster, W.A., Teal, P.E.A., et al. 2014. Development and Assessment of Plant-Based Synthetic Odor Baits for Surveillance and Control of Malaria Vectors. *PLoS ONE* 9(2): e89818.

Magalhães-Junior, J. T., Barrouin-Melo, S. M., Correa, A. G., Govone, J. S. , Silva, F. B. R., Estevam, V. M., Pinto, M. C. 2014a . A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 60.

Magalhães-Junior, J. T., Mesquita, P. R. R., Oliveira, W. F. S., Oliveira, F. S., Franke, C. R., Rodrigues, F. M.; Andrade, J. B., Barrouin-Melo, S. M. 2014b. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Print), v. 406, p. 6691-6700.

Monteiro, E.M., Silva, J.C., Costa, R.T., Costa, D.C., Barata, R.A., Paula, E.V., et al. 2005. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38 (2):147-52.

Machado, V.E., Corrêa, A.G., Goulart, T.M., Silva, F.B., Ortiz, D.G., Pinto, M.C. 2015. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. *Parasit Vectors*. 7;8:147.

Muller, G.C., Revay, E.E., Schlein, Y. 2011. Relative attraction of the sand fly *Phlebotomus papatasi* to local flowering plants in the Dead Sea region. *J Vector Ecol*. 36 Suppl 1:S187–94.

Padmaja, P.G., Woodcock, C.M., Bruce, T.J. 2010. Electrophysiological and behavioral responses of sorghum shoot fly, *Atherigona soccata*, to sorghum volatiles. *J Chem Ecol*. 36(12):1346-53.

Romero, G.A.S., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 4, e584.

Silva, A.V., Paula, A.A., Cabrera, M.A., Carreira, J.C. 2005. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cadernos de Saude Publica*. 21(1):324-8.

Spiegel, C.N., Jeanbourquin, P., Guerin, P.M., Hooper, A.M., Claude, S., Tabacchi, R., et al. 2005. (1S,3S,7R)-3-methyl-alpha-himachalene from the male sandfly

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females. Journal of insect physiology. 51(12):1366-75.

Syed, Z., Leal, W.S. 2009. Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. Proc Natl Acad Sci, 106:18803-18808.

Tchouassi, D.P., Sang, R., Sole, C.L., Bastos, A.D., Teal, P.E., et al. 2013. Common host-derived chemicals increase catches of disease-transmitting mosquitoes and can improve early warning systems for Rift Valley Fever Virus. PLoS Negl Trop Dis 7: e2007.

Wang, C., Dong, D., Wang, X., Lian, A., Chi, C., Ke, C., Guo, L., et al. 2014. Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. Sci. Rep. 4, 7312.

Werneck, G.L. 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cadernos de saude publica. 24 (12): 2937-40.

CAPÍTULO 3

Uma avaliação laboratorial de álcoois como atrativos para flebotomíneos

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)

A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly Lutzomyia longipalpis
(Diptera: Psychodidae)

Jairo Torres Magalhães Junior^{1*}, Stella Maria Barrouin Melo¹, Arlene Gonçalves Corrêa², Flavia Benini da Rocha Silva³, Vicente Estevam Machado³, José Silvio Govone³, Mara Cristina Pinto³.

¹Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; ²Universidade Federal de São Carlos (UFSC), ³Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), * jairomev@gmail.com

ARTIGO PUBLICADO:

Magalhães-Junior, J. T.; Barrouin-Melo, S. M.; Correa, A. G. ; Govone, J. S.; Silva, F. B. R.; Estevam, V. M.; Pinto, M. C. 2014 . A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Parasites e Vectors**, v. 7, p. 60. doi:10.1186/1756-3305-7-60

Antes da montagem do sistema de túnel de vento na Bahia, foi realizada uma visita técnica ao túnel de vento montado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP,

Campus Araraquara. A partir dessa visita, foi realizado um estudo para avaliar as respostas de machos e fêmeas de *L. longipalpis* à atratividade exercida por diferentes álcoois (octenol, octanol, heptanol e nonanol) sob diferentes concentrações. Os flebotomíneos foram cultivados no insetário do laboratório de infectologia veterinária da UFBA, enquanto os testes foram realizados no túnel de vento montado na Faculdade de Farmácia da UNESP de Araraquara. O trabalho foi publicado no início de 2014, na revista *Parasites & Vectors* e os principais resultados apontam para a identificação de um comportamento de atratividade dos machos e fêmeas de flebotomíneos aos diferentes álcoois avaliados.

A capacidade atrativa desses álcoois já foi demonstrada em diversos insetos hematófagos, com destaque para o octenol, que é considerado um atrativo universal. O octenol é encontrado na respiração de bovinos e seres humanos e já teve sua capacidade atrativa demonstrada em espécies de mosquitos e algumas espécies de flebotomíneos. Em *L. longipalpis*, o octenol já havia sido positivamente avaliado por meio de testes eletrofisiológicos, entretanto o presente estudo foi o primeiro que demonstrou sua atratividade em bioensaios comportamentais.

Em relação ao octanol, heptanol e nonanol, poucos trabalhos foram realizados avaliando a atratividade de insetos a estes álcoois. Esses compostos são pouco associados a hospedeiros animais, entretanto já foram identificados em algumas plantas herbáceas. Em uma perspectiva ambiental, a atratividade sobre flebotomíneos, exercida por esses

álcoois primários, é um achado interessante, já que os machos e fêmeas utilizam a seiva de plantas como fonte energética e, portanto, justifica essa resposta de atração.

Mais estudos são necessários para avaliar voláteis de plantas como possíveis fontes atrativas de flebotomíneos.

Aqui artigo publicado na Parasites and Vectors.

SHORT REPORT

Open Access

A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Jairo Torres Magalhães-Junior¹, Stella Maria Barrouin-Melo¹, Arlene Gonçalves Corrêa², Flavia Benini da Rocha Silva³, Vicente Estevam Machado³, José Silvio Govone⁴ and Mara Cristina Pinto^{3*}

Abstract

Background: The potential attraction from 1-octen-3-ol for sandflies has been documented; however, studies using other primary alcohols are limited.

Findings: We used a wind tunnel to compare the activation and attractive behaviors in male and female *Lutzomyia longipalpis* using 1-octen-3-ol and three additional alcohols, 1-octanol, 1-heptanol and 1-nonanol at three different concentrations: neat (100%) and diluted in hexane (10% and 50%). The compounds 1-octen-3-ol and 1-nonanol induced a clear concentration-dependent activation and attraction response in females. In males, 1-octen-3-ol, 1-nonanol and 1-heptanol yielded the same results.

Conclusions: *L. longipalpis* is attracted to 1-octen-3-ol, 1-nonanol and 1-heptanol, which are found in many plant volatiles.

Keywords: Sandflies, Phlebotomine, Kairomone, Octenol, Octanol, Heptanol, Nonanol, Attraction, Wind tunnel

Findings

Background

Volatile compounds used as haematophagous insect lures may improve the efficacy of traps for surveillance and control of disease vectors. For the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), which is the major *Leishmania infantum* vector in South America, previous investigations into attractive lures have focused on male pheromones [1] and kairomones [2].

The kairomone 1-octen-3-ol (hereafter octenol) is a volatile component of bovine [3] and human breath [4]. Its potential role as an attractant has been documented for different haematophagous insect species, such as mosquitoes [5] and tsetse flies [3]. For the New World sandfly species, octenol has previously been used with light traps and found to be relatively attractive to *Psathyromyia shannoni* (Dyar) (= *Lutzomyia shannoni*) [6] and, in a concentration-

dependent manner, to *Nyssomyia neivai* (Lutz & Neiva) (= *Lutzomyia intermedia*) [7]. For *L. longipalpis*, octenol elicited significant olfactory responses in electrophysiological experiments [8], but it showed a weak attractive response at 0.5 mg/h associated with light traps under field conditions [2].

Unlike octenol, studies on the potential attractiveness of other primary alcohols, namely, 1-octanol, 1-heptanol, 1-nonanol (hereafter, octanol, heptanol and nonanol), for haematophagous insects are limited. These alcohols were identified at small levels in incubated human sweat [9]. Only nonanol has been demonstrated as relatively attractive to *Aedes aegypti* (Linnaeus) compared with a control [10]. No studies have been reported on attractiveness of these alcohols to sandflies.

The aim of this study was to evaluate *L. longipalpis* male and female responses to octenol, octanol, heptanol and nonanol at different concentrations using the wind tunnel method.

* Correspondence: marap@fcar.unesp.br

³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

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

Methods

Insects

Sandflies were collected in Ipecaetá (12°18'00"S 39°18'28"W), Bahia State and kept in a colony at the Laboratory of Veterinary Infectious Diseases (Federal University of Bahia) for 18 generations. The insects were maintained in netting cages using standard methods with access to a 50% sucrose solution at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80–90% humidity. The sandfly species names are presented using the Galati classification system [11] followed by the corresponding Young and Duncan nomenclature [12] in brackets when cited for the first time.

Bioassay protocol in the wind tunnel

Each bioassay was performed from 9:00 to 19:00 in a transparent acrylic wind tunnel (length 200 cm, width 20 cm and height 20 cm) as previously described [13]. For each test, three male or female *L. longipalpis* were placed inside a releasing chamber for 30 min for acclimation before each test. The insects were 3–6 days old and received only sugar meal. Females had not received a blood meal. The chamber was then placed inside the wind tunnel 50 cm downwind from the odor source. Each trial was 2 min long, and we recorded the sandfly activation and attraction behaviors. The activation behavior was demonstrated through the number of sandflies that left the releasing chamber. The attraction behavior was demonstrated through the number of sandflies that reached the odor source. Thirty insect specimens were used for each concentration per compound.

The compounds used for the experiments were octenol, octanol, heptanol and nonanol (98.0%, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) at three different concentrations: neat (100%) and diluted in hexane (10% and 50%). Each concentration was released by placing 200 μL onto filter paper (4×4 cm) in the wind tunnel entrance. The controls were 200 μL of hexane on filter paper (4×4 cm) before each trial.

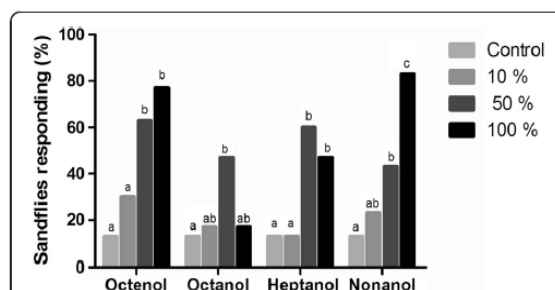


Figure 1 Activation of female *L. longipalpis*. Percentage of female *L. longipalpis* activated by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).

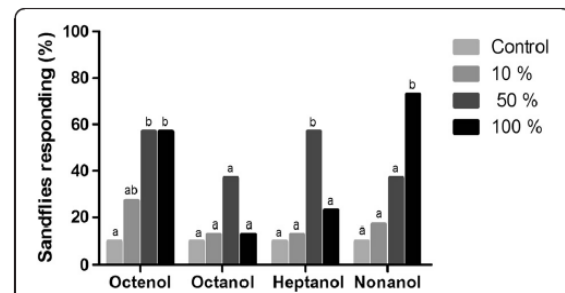


Figure 2 Attraction of female *L. longipalpis*. Percentage of female *L. longipalpis* attracted by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).

Statistical analysis

Chi square tests were used to evaluate the different proportions of males and females activated and attracted by each compound. Initially, the test was conducted for all four groups simultaneously. Thereafter, if a significant difference was verified, each of the two groups was compared separately. The statistical analyses were performed using BioEstat (version 5.0; Mamirauá/CNPq, Belém, PA, Brazil).

Results

Female responses

Octenol and nonanol induced a clear concentration-dependent activation and attraction response within the dosage range evaluated. For octenol, the activation and attraction responses were significantly different at the 50% concentration compared with the control ($p < 0.05$), but the 50% and 100% concentrations were not different ($p > 0.05$). For nonanol, the activation response was statistically different from the 50% concentration compared with the control; however, there was a significantly different attraction response only at the 100% concentration ($p < 0.05$) (Figures 1 and 2).

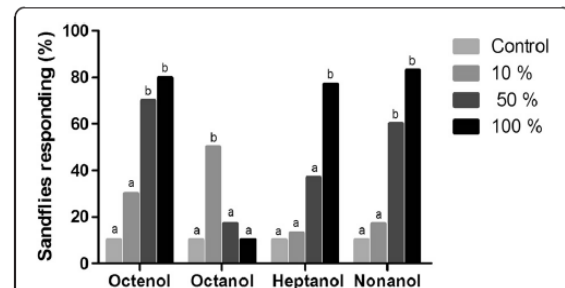
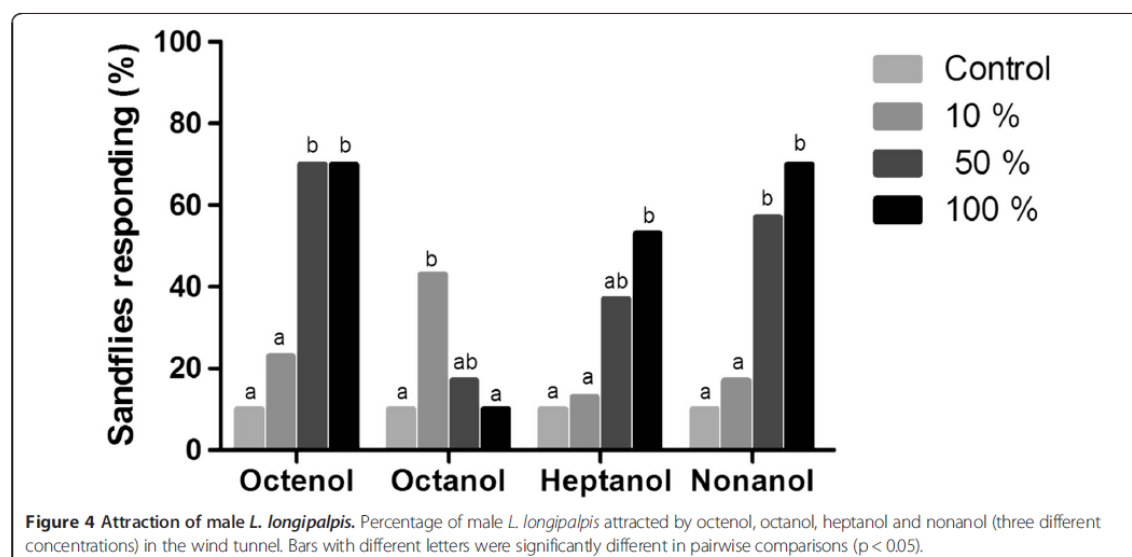


Figure 3 Activation of male *L. longipalpis*. Percentage of male *L. longipalpis* activated by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).



The female activation and attraction response to octanol did not yield a concentration-dependent pattern. The only statistical difference detected was for activation at the 50% concentration compared with the control ($p < 0.05$).

For heptanol, the female activation responses were concentration-dependent; the 100% response was greater than at 50% compared with the control ($p < 0.05$). However, only the 50% concentration yielded a significantly different insect attraction response compared with the control ($p < 0.05$); the 100% concentration was not different from the control ($p > 0.05$).

Male responses

The male sandfly responses followed a similar pattern as the females for octenol, nonanol and heptanol (i.e., a concentration-dependent response).

For octanol, similar to the females, the males did not exhibit a concentration-dependent response; however, the only significant difference detected in the activation and

attraction response was at the 10% concentration compared with the control ($p < 0.05$). For heptanol, although the males presented the same pattern as the females, the best activation and attraction responses were at the highest concentration (100%) compared with the control ($p < 0.05$) (Figures 3 and 4).

Discussion

Our results show that in addition to octenol, other alcohols evoke sandfly responses and should also be investigated. Octenol and nonanol elicited the highest responses from *L. longipalpis* females, and octenol, heptanol and nonanol elicited the highest responses from males. Further, not all mosquito species respond equally to octenol [5], and whether different groups of alcohols would increase attractant activity for such species has been discussed [10]. However, a clear structure-activity relationship has not been demonstrated [14].

Octenol's role as a kairomone has been extensively evaluated in haematophagous insects because it is found

Table 1 Reports of haematophagous insect responses to octanol, heptanol and nonanol

Compounds	Sources of compounds	Insects	References
Experimental design responses			
1-octanol	Commercial (Aldrich)	<i>Simulium arcticum</i>	Sutcliffe et al. [18]
		Field Negative attractiveness	
1-heptanol	Metasternal glands of <i>Triatoma brasiliensis</i>	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Vitta et al. [19]
		CG- EAD	
		No response	
1-nonanol	Volatiles from cattle headspace and urine	<i>Haematobia irritans</i> <i>Stomoxys calcitrans</i>	Birkett et al. [20]
		CG-EAG Positive response	

in different sources, such as bovine [3] and human breath [15]. Octenol's role in attracting sandflies is controversial, but our results showed a clear dose-dependent response with weak attractiveness at a low concentration (10%). These results may explain the poor results from *L. longipalpis* captures in the field when octenol was used at a low concentration (0.5 mg/h) [2].

Nevertheless, primary alcohols, such as octanol, heptanol and nonanol, have not been well-investigated for haematophagous insects, and this is the first report of such a study using sandflies. Such alcohols are not directly associated with vertebrate breath or skin odors, which may be the basis for the lack of interest in their potential role as an attractant for disease vectors. Nonetheless, those alcohols were detected at small levels in human sweat after incubation for 42-52 h, and nonanol presented the highest levels compared with octanol and heptanol [9]. Heptanol was also observed in chicken feather hydrolysate [16], which is relevant for sandflies because they are present at high levels in chicken sheds. Such bird shelters are the putative breeding sites for *L. longipalpis* [17]. The literature reports on haematophagous insect responses to octanol, heptanol and nonanol are summarized in Table 1 [18-20].

Floral volatiles are composed of various substances that have been shown to be attractive to mosquitoes [21]. The primary alcohols herein were identified in several mushrooms species [22] and other herbaceous plants [23]. From an environmental perspective, it is noteworthy that primary alcohols are in plants, which are generally sandfly feed sources. Both male and female sandflies require carbohydrates for energy, which are acquired through feeding directly on plant tissues in the field [24].

Herein, we observed similarities and distinctions between the insect sexes considering their biological responses to the primary alcohols evaluated. Although both males and females require plant sap to survive and specific variation in attraction to their constituent compounds is expected, it is difficult to explain such events through reports on morphological aspects. Differences were also observed in the number of sensilla on the second palpal segment in females (2-6) compared with males (1-2). However, an equal number of sensilla were observed in the third segment of the maxillary palps (Newstead's sensilla) for *L. longipalpis* males and females [25].

A dose-dependent response to octenol in female *L. longipalpis* was previously observed through electrophysiological recordings [8]. The female behavioral responses to octenol herein are consistent with such studies. Although no studies have investigated male electrophysiological responses to octenol, they were both activated and attracted in the wind tunnel.

Plant-specific emissions are important for attracting sandflies, and further studies with plant volatiles may be a potential approach to improve sandfly lures.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JMJ, SM, AC and MP conceived the study and drafted the manuscript. MJM, MP, FS and VM conducted the bioassay experiments. JG provided statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação para o Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB (Programa de Apoio a Núcleos Emergentes-Proneim; Apoio à Formação e Articulação de Redes de Pesquisa no Estado da Bahia; and scholarship for MJM). MP received a grant from the International Foundation for Science (IFS) to build the wind tunnel.

Author details

¹Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, 40170-000 Salvador, BA, Brazil. ²Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil. ³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil. ⁴Departamento de Estatística Matemática Aplicada E Computação Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro, v 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-970 Rio Claro, SP, Brazil.

Received: 7 November 2013 Accepted: 31 January 2014
Published: 6 February 2014

References

- Bray D, Bandi K, Brazil R, Oliveira A, Hamilton J: **Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field.** *J Med Entomol* 2009, **46**:428-434.
- Andrade AJ, Andrade MR, Dias ES, Pinto MC, Eiras AE: **Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, **103**(4):337-343.
- Hall D, Beevor P, Cork A, Nesbitt B, Vale G: **A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours.** *Insect Sci Appl* 1984, **5**:335-339.
- Bernier UR, Kline DL, Barnard DR, Schreck CE, Yost RA: **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*).** *Analyt Chem* 2000, **72**(4):747-756.
- Essen PV, Kemme J, Ritchie S, Kay B: **Differential responses of *Aedes* and *Culex* mosquitoes to octenol or light in combination with carbon dioxide in Queensland, Australia.** *Med Vet Entomol* 1994, **8**(1):63-67.
- Mann RS, Kaufman PE, Butler JF: ***Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) response to olfactory attractant-and light emitting diode-modified Mosquito Magnet X (MM-X) traps.** *J Med Entomol* 2009, **46**(5):1052-1061.
- Pinto M, Barbieri K, Silva M, Graminha M, Casanova C, Andrade A, Eiras A: **Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the field.** *J Med Entomol* 2011, **48**(1):39-44.
- Sant'ana AL, Eiras AE, Cavalcante RR: **Electroantennographic responses of the *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) to 1-octen-3-ol.** *Neotrop Entomol* 2002, **31**:13-17.
- Meijerink J, Braks M, Brack A, Adam W, Dekker T, Posthumus M, Van Beek T, Van Loon J: **Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples.** *J Chem Ecol* 2000, **26**(6):1367-1382.
- Mathew N, Ayyanar E, Shanmugavelu S, Muthuswamy K: **Mosquito attractant blends to trap host seeking *Aedes aegypti*.** *Parasitol Res* 2013, **112**(3):1-8.
- Galati E: **Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups.** *Bol Dir Malarial San Amb* 1995, **35**(Supl 1):133-142.

12. Young DG, Duran MA: Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). In *DTIC Document*; 1994.
13. Pinto MC, Bray DP, Eiras AE, Carvalheira HP, Puertas CP: Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. *Parasit Vectors* 2012, **5**(1):210.
14. Cilek J, Ikediobi C, Hallmon C, Johnson R, Onyeozili E, Farah S, Mazu T, Latinwo L, Ayuk-Takem L, Bernier U: Semi-field evaluation of several novel alkenol analogs of 1-octen-3-ol as attractants to adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc* 2011, **27**(3):256–262.
15. Xue R, Dong L, Zhang S, Deng C, Liu T, Wang J, Shen X: Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, **22**(8):1181–1186.
16. DeMilo A, Lee CJ, Levi V, Moreno D: Volatile components of a chicken feather hydrolystate that is highly attractive to the West Indian and Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J Entomol Sci* 1997, **32**:245–256.
17. Casanova C, Andrighetti MT, Sampaio SM, Marcoris ML, Colla-Jacques FE, Prado AP: Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**(9):e2443.
18. Sutcliffe JF, Shemanchuk JA, McKeown DB: Preliminary survey of odours that attract the black fly, *Simulium arcticum* (Malloch)(15-10.11)(Diptera: Simuliidae) to its cattle hosts in the Athabasca region of Alberta. *Insect Sci Appl* 1994, **15**(4):487–494.
19. Vitta AC, Bohman B, Unelius CR, Lorenzo MG: Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volatiles produced in the metasternal glands of females. *J Chem Ecol* 2009, **35**(10):1212–1221.
20. Birkett M, Agelopoulos N, Jensen K, Jespersen JB, Pickett J, Prijs H, Thomas G, Trapman J, Wadhams L, Woodcock C: The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Med Vet Entomol* 2004, **18**(4):313–322.
21. Jhumur US, Dötterl S, Jürgens A: Floral odors of *Silene otites*: their variability and attractiveness to mosquitoes. *J Chem Ecol* 2008, **34**(1):14–25.
22. Jong S, Birmingham J: Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Edited by Chang ST, Chang ST, Buswell JA, Chiu SW.; 1993:345–366.
23. Yang Y, Nan H, Wang G, Yang W, Xu J: Comparative determination of the volatile components of *Prunella vulgaris* L: from different geographical origins by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Lett* 2013, **46**(13):2001–2016.
24. Schlein Y, Müller G: Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1995, **32**(6):882–887.
25. Spiegel CN, Oliveira SM, Brazil RP, Soares MJ: Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies. *Microsc Res Tech* 2005, **66**(6):321–330.

doi:10.1186/1756-3305-7-60

Cite this article as: Magalhães-Junior et al.: A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasites & Vectors* 2014 **7**:60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para melhor entender os aspectos da transmissibilidade de cães infectados com *L. infantum* ao vetor, bem como na identificação de novos mecanismos de controle para a LV, faz-se necessário um maior enfoque nos estudos que abordem a interface entre flebotomíneos e os cães.

Neste sentido, observamos que o diagnóstico de transmissibilidade parasitária de cães infectados com *L. infantum* pode ser influenciada por variáveis relacionadas aos animais e à execução da técnica de xenodiagnóstico. Portanto, faz-se necessária uma maior atenção para a definição e padronização destas condições, no que tange a identificação daqueles animais verdadeiramente transmissores em uma área endêmica.

Ademais, demonstramos que a taxa de infectividade de cães naturalmente infectados com *L. infantum* varia de acordo com a manifestação e intensidade de sinais clínicos e patológicos nestes animais, sugerindo que cães infectados porém clinicamente hígidos, considerados, portanto, resistentes à doença, representam um risco baixo ou inexistente como reservatórios na manutenção do ciclo epidemiológico da doença.

Outro importante fator demonstrado na interface vetor-hospedeiro na LV foi que diferentes compostos químicos exalados de cães demonstraram influenciar no comportamento atrativo de machos e fêmeas de flebotomíneos *L. longipalpis*. Foi demonstrado também que alguns compostos alcóolicos exercem atração aos flebotomíneos. Os álcoois testados são encontrados em mamíferos e algumas plantas, sugerindo que a atratividade encontrada esteja relacionada à busca por alimentos dos insetos.

Esses compostos identificados como possíveis atrativos, podem ser utilizados em diferentes metodologias de estudo e controle da fauna flebotomínea. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o potencial atrativo destes odores químicos, sobretudo daqueles exalados do pelo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral para o vetor *L. longipalpis*, levando-se em consideração a importância dos cães animais no ciclo epidemiológico da LV.

Como perspectivas, pretendemos avaliar as respostas comportamentais a campo e eletrofisiológicas do *L. longipalpis* aos COVs identificados aqui como atrativos, buscando identificar novos atrativos químicos para utilização em métodos de controle e monitoramento do inseto *L. longipalpis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B.; Maroli, M. Control Of Phlebotomine Sandflies. **Medical And Veterinary Entomology**. V. 17, N. 1, P. 1-18, 2003.
- Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. D. The Who *Leishmaniasis* Control Team. *Leishmaniasis* Worldwide And Global Estimates Of Its Incidence. **Plos One**, V. 7, N. 5, P. E35671, Jan. 2012.
- Alves, C. F.; De Amorim, I. F. G.; Moura, E. P.; Ribeiro, R. R.; Alves, C. F.; Michalick, M. S.; Kalapothakis, E.; Bruna-Romero, O.; Tafuri, W. L.; Teixeira, M. M.; Melo, M. N. Expression Of Ifn- Γ , Tnf-A, Il-10 And Tgf-B In Lymph Nodes Associates With Parasite Load And Clinical Form Of Disease In Dogs Naturally Infected With *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, V. 128, N. 4, P. 349-358, 2009. Issn 0165-2427.
- Amóra, S.S.; Bevilaqua, C.M.; Feijó, F.; Alves, N.D.; Maciel, M.D.V. Control Of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) *Leishmaniasis* Vectors. **Neotropical Entomology**. V.38, N. 3, P. 303-10, 2009.
- Andrade, A. J.; Andrade, M. R.; Dias, E. S.; Pinto, M. C.; Eiras, A. E. Are Light Traps Baited With Kairomones Effective In The Capture Of *Lutzomyia longipalpis* And *Lutzomyia Intermedia*? An Evaluation Of Synthetic Human Odor As An Attractant For Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V. 103, N. 4, P. 337-43, Jun 2008. Issn 1678-8060 (Electronic)0074-0276.
- Andrade, A.J. **Ecologia química de flebotomíneos (Diptera : Psychodidae: Phlebotominae):desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies**. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; Tese de Doutorado. 2010.
- Barral-Netto, M.; Barral, A.; Brownell, C. E.; Skeiky, Y.; Ellingsworth, L. R.; Twardzik, D. R.; Reed, S. G. Transforming Growth Factor-Beta In *Leishmanial* Infection: A Parasite

Escape Mechanism. **Science (New York, Ny)**, V. 257, N. 5069, P. 545, 1992. Issn 0036-8075.

Barrouin-Melo, S. M.; Larangeira, D. F.; De Andrade Filho, F. A.; Trigo, J.; Juliao, F. S.; Franke, C. R.; Palis Aguiar, P. H.; Conrado Dos-Santos, W. L.; Pontes-De-Carvalho, L. Can Spleen Aspirations Be Safely Used For The Parasitological Diagnosis Of Canine Visceral Leishmaniosis? A Study On Assymptomatic And Polysymptomatic Animals. **Vet J**, V. 171, N. 2, P. 331-9, Mar 2006. Issn 1090-0233 (Print)1090-0233.

Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore. J.L., Bourdoiseau, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, p. 108-120. 2001.

Brasil. II Forum De Discussão Sobre O Tratamento Da Leishmaniose Visceral Canina (Lvc). Saúde, S. D. V. E. Brasília: 10 P. 2009a.

_____. **Nota de esclarecimento sobre as vacinas antileishmaniose visceral canina registradas no MAPA.** MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília 2009b.

_____. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, 1990 a 2011.** Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.

_____. **Manual De Vigilância E Controle Da Leishmaniose Visceral.** Saúde, M. D. Brasília: Editora Do Ministério Da Saúde. 5º reimpressão, 122 p. 2014.

Bray, D.; Hamilton, J. G. C. Host Odor Synergizes Attraction Of Virgin Female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, V. 44, N. 5, P. 779-787, 2007. Issn 0022-2585.

Bray, D. P.; Alves, G. B.; Dorval, M. E.; Brazil, R. P.; Hamilton, J. G. Synthetic Sex Pheromone Attracts The *Leishmaniasis* Vector *Lutzomyia longipalpis* To Experimental Chicken Sheds Treated With Insecticide. **Parasit Vectors**, V. 3, P. 16, 2010. Issn 1756-3305 (Electronic)

Bray, D.P.; Ward, R.D.; Hamilton, J.G. **9. The Chemical Ecology Of Sandflies. Olfaction In Vector-Host Interactions.** The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2010. P. 203.

Bray, D.P.; Carter, V.; Alves, G.B.; Brazil, R.P.; Bandi, K.K. Et Al. Synthetic Sex Pheromone In A Long-Lasting Lure Attracts The Visceral *Leishmaniasis* Vector, *Lutzomyia longipalpis*, For Up To 12 Weeks In Brazil. Plos Negl Trop Dis, V. 8, N. 3, E2723, 2014. Doi:10.1371/Journal.Pntd.0002723

Corrêa, A.; Sant'ana, J. Ecologia Química De Insetos. In: (Ed.). **Ag Corrêa, Pc Vieira, Produtos Naturais No Controle De Insetos**, V.2, 2007. P.9-17.

Courtenay, O.; Quinnell, R. J.; Garcez, L. M.; Shaw, J. J.; Dye, C. Infectiousness In A Cohort Of Brazilian Dogs: Why Culling Fails To Control Visceral *Leishmaniasis* In Areas Of High Transmission. **Journal Of Infectious Diseases**, V. 186, N. 9, P. 1314-1320, November 1, 2002.

Da Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., De Figueiredo Gontijo, N., Marques Michalick, M.S., Alexander, B., Williams, P., Melo, M.N., 2007. Canine Visceral *Leishmaniasis*: Relationships Between Clinical Status, Humoral Immune Response, Haematology And *Lutzomyia longipalpis* Infectivity. **Vet. J.** 174, 636-643.

Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. When An “Asymptomatic” Dog Is asymptomatic? **Veterinary Parasitology**. 202, 341–342.

De Abreu, R. T.; Das Graças Carvalho, M.; Carneiro, C. M.; Giunchetti, R. C.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O. A.; Coura-Vital, W.; Corrêa-Oliveira, R.; Reis, A. B. Influence Of Clinical Status And Parasite Load On Erythropoiesis And Leucopoiesis In Dogs Naturally Infected With *Leishmania (Leishmania) Chagasi*. **Plos One**, V. 6, N. 5, P. E18873, 2011. Issn 1932-6203.

Dicke, M.; Sabelis, M.W. Infochemical Terminology: Based On Cost-Benefit Analysis Rather Than Origin Of Compounds? **Functional Ecology**. 131-9. 1988.

Dougherty, M. J.; Guerin, P. M.; Ward, R. D.; Hamilton, J. G. C. Behavioural And Electrophysiological Responses Of The Phlebotomine Sandfly *Lutzomyia longipalpis*

(Diptera: Psychodidae) When Exposed To Canid Host Odour Kairomones. **Physiological Entomology**, V. 24, N. 3, P. 251-262, 1999. Issn 1365-3032.

Dorea, J.; Costa, J.; Holzbecher, J.; Ryan, D.; Marsden, P. Antimony Accumulation In Hair During Treatment Of *Leishmaniasis*. **Clinical Chemistry**, V. 33, N. 11, P. 2081-2082, 1987. Issn 0009-9147.

Franke, C. R.; Staubach, C.; Ziller, M.; Schluter, H. Trends In The Temporal And Spatial Distribution Of Visceral And Cutaneous *Leishmaniasis* In The State Of Bahia, Brazil, From 1985 To 1999. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, V. 96, N. 3, P. 236-41, May-Jun 2002. Issn 0035-9203.

Grimaldi, G.; Tesh, R. *Leishmaniases* Of The New World: Current Concepts And Implications For Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 6, N. 3, P. 230-250, 1993. Issn 0893-8512.

Guarga, J.L., Lucientes, J., Peribáñez, M.A., Molina, R., Gracia, M.J., Castillo, J.A., 2000a. Experimental Infection Of *Phlebotomus Perniciosus* And Determination Of The Natural Infection Rates Of *Leishmania Infantum* In Dogs. *Acta. Trop.* 77, 203-207.

Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribánzz, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000b. Canine *Leishmaniasis* Transmission: Higher Infectivity Amongst Naturally Infected Dogs To Sand Flies Is Associated With Lower Proportions Of T Helper Cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249-253.

Hamilton, J.; Ramsoondar, T. Attraction Of *Lutzomyia longipalpis* To Human Skin Odours. *Medical And Veterinary Entomology*. V. 8, N. 4, P. 375-80, 1994.

Hamilton, J. G. C.; Hooper, A.M.; Ibbotson, H.C.; Kurosawa, S.; Mori, K.; Muto, S.E., *Et Al.* 9-Methylgermacrene-B Is Confirmed As The Sex Pheromone Of The Sandfly *Lutzomyia longipalpis* From Lapinha, Brazil, And The Absolute Stereochemistry Defined As S. **Chemical Communications**. V. 23, P. 2335-6, 1999.

Hamilton, J.; Maingon, R.; Alexander, B.; Ward, R.; Brazil, R. 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. 480-8, 2005.

Jones, T. M.; Hamilton, J. G. C. A Role For Pheromones In Mate Choice In A Lekking Sandfly. **Anim Behav**, V. 56, N. 4, P. 891-898, Oct 1998. Issn 0003-3472 (Print)0003-3472.

Kamhawi, S. Phlebotomine Sand Flies And *Leishmania* Parasites: Friends Or Foes? **Trends In Parasitology**, V.22 N.9, P. 339-445, 2006.

Kelly, D. W.; Mustafa, Z.; Dye, C. Differential Application Of Lambda-Cyhalothrin To Control The Sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Med Vet Entomol**, V. 11, N. 1, P. 13-24, Jan 1997. Issn 0269-283x (Print)0269-283x .

Kenney, R. T.; Sacks, D. L.; Gam, A. A.; Murray, H. W.; Sundar, S. Splenic Cytokine Responses In Indian Kala-Azar Before And After Treatment. **Journal Of Infectious Diseases**, V. 177, N. 3, P. 815-819, 1998. Issn 0022-1899.

Kline, D.; Takken, W.; Wood, J.; Carlson, D. Field Studies On The Potential Of Butanone, Carbon Dioxide, Honey Extract, L-Octen-3-OL, L-Lactic Acid And Phenols As Attractants For Mosquitoes. **Medical And Veterinary Entomology**.V. 4, N. 4, P. 383-91. 1990.

Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M.; Focheux, C.; Dereure, J.; Puech, M. P.; Cadiergues, M. Protection Of Dogs From Bites Of Phlebotomine Sandflies By Deltamethrin Collars For Control Of Canine *Leishmaniasis*. **Med Vet Entomol**, V. 11, N. 2, P. 105-111, 2008. Issn 1365-2915.

Knols, B. G. J.; Meijerink, J. Odors Influence Mosquito Behavior. **Science And Medicine**, V. 4, P. 56-63, 1997. Issn 1087-3309.

Laurenti, M.D., Rossi, C.N., da Matta, V.L., Tomokane, T.Y., Cor-bett, C.E., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Marcondes, M., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania(Leishmania) infantum Chagasi* to the natural vector. **Vet. Parasitol.** 196,296–300.

Lainson, R. **Flebotomíneos Do Brasil**. Editora Fiocruz, 2003.

Lainson, R.; Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* And The Eco-Epidemiology Of American Visceral *Leishmaniasis*, With Particular Reference To Brazil: A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V. 100, N. 8, P. 811-827, 2005. Issn 0074-0276.

Logan J.G., Birkett M.A.. Semiochemicals For Biting Fly Control: Their Identification And Exploitation. **Pest Management Science**.V. 63, N. 7, P. 647-57, 2007.

Magalhães-Junior, J. T.; Mesquita, P. R. R. ; Oliveira, F. S.; Oliveira, W. F. S. ; Rodrigues, F. M. ; Franke, C. R.; Andrade, J. B.; Barrouin-Melo, S. M. 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, 2014.

Melo, M. N. Leishmaniose Visceral No Brasil: Desafios E Perspectivas. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, V. 23, N. Sup 1, P. 41-45, 2004.

Michalsky, É. M.; Rocha, M. F.; Da Rocha Lima, A. C. V. M.; França-Silva, J. C.; Pires, M. Q.; Oliveira, F. S.; Pacheco, R. S.; Dos Santos, S. L.; Barata, R. A.; Romanha, Á. J. Infectivity Of Seropositive Dogs, Showing Different Clinical Forms Of *Leishmaniasis*, To *Lutzomyia longipalpis* Phlebotomine Sand Flies. **Vet Parasitol**, V. 147, N. 1, P. 67-76, 2007. Issn 0304-4017.

Modi, G. B.; Tesh, R. B. A Simple Technique For Mass Rearing *Lutzomyia longipalpis* And *Phlebotomus Papatasi* (Diptera: Psychodidae) In The Laboratory. **J Med Entomol**, V. 20, N. 5, P. 568-9, Oct 5 1983. Issn 0022-2585 (Print)0022-2585.

Monteiro, E. M.; Da Silva, J. C.; Da Costa, R. T.; Costa, D. C.; Barata, R. A.; De Paula, E. V.; Machado-Coelho, G. L.; Rocha, M. F.; Fortes-Dias, C. L.; Dias, E. S. 2005. Visceral *Leishmaniasis*: A Study On Phlebotomine Sand Flies And Canine Infection In Montes Claros, State Of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, V. 38, N. 2, P. 147-52, Mar-Apr. Issn 0037-8682 (Print)0037-8682 (Linking).

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity Of Dogs Naturally Infected With *Leishmania Infantum* To Colonized *Phlebotomus Perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 88, 491-493.

Morton, I. E.; Ward, R. D. 1990. Laboratory Response Of Female *Lutzomyia longipalpis* Sandflies To A Host And Male Pheromone Source Over Distance. **Med Vet Entomol**, V. 3, N. 3, P. 219-23, Jul. Issn 0269-283x (Print)0269-283x.

O'shea, B.; Rebollar-Tellez, E.; Ward, R. D.; Hamilton, J. G.; El Naiem, D.; Polwart, A. 2002. Enhanced Sandfly Attraction To *Leishmania*-Infected Hosts. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, V. 96, N. 2, P. 117-8, Mar-Apr. Issn 0035-9203 (Print)0035-9203.

Palatnik-De-Sousa, C. B.; Day, M. J. 2011. One Health: The Global Challenge Of Epidemic And Endemic *Leishmaniasis*. **Parasit Vectors**, V. 4, N. 1, P. 1-10.

Palis-Aguiar, P. H.; Santos, S. O.; Pinheiro, A. A.; Bittencourt, D. V. V.; Costa, R. L. G., Julião, F. S.; Santos, W. L. C.; Barrouin-Melo, S.M. 2007. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4.

Pinelli, E.; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J.; Bernadina, W.; Del Real, G.; Ruitenber, J. 1994. Cellular And Humoral Immune Responses In Dogs Experimentally And Naturally Infected With *Leishmania Infantum*. **Infect Immun**, V. 62, N. 1, P. 229-235, Issn 0019-9567.

Pinto, M. C.; Campbell-Lendrum, D. H.; Lozovei, A. L.; Teodoro, U.; Davies, C. R. 2001. Phlebotomine Sandfly Responses To Carbon Dioxide And Human Odour In The Field. **Med Vet Entomol**, V. 15, N. 2, P. 132-9.

Pinto, M. C.; Bray, D. P.; Eiras, A. E.; Carvalheira, H. P.; Puertas, C. P. 2012. Attraction Of The Cutaneous *Leishmaniasis* Vector *Nyssomyia Neivai* (Diptera: Psychodidae) To Host Odour Components In A Wind Tunnel. **Parasites & Vectors**. V. 210,n. 5.

Quinnell, R. J.; Courtenay, O. 2009. Transmission, Reservoir Hosts And Control Of Zoonotic Visceral *Leishmaniasis*. **Parasitology**.136(14):1915-34.

Rangel, E. F.; Souza, N. A.; Wermelinger, E. D.; Barbosa, A. F.; Andrade, C. A. 1986. Biologia De *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 E *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), Em Condições Experimentais. I. Aspectos Da

Alimentação De Larvas E Adultos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V. 81, N. 4, P. 431-438, Issn 0074-0276.

Rangel, E. F.; Vilela, M. L. 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) And Urbanization Of Visceral *Leishmaniasis* In Brazil. **Cad Saude Publica**, V. 24, N. 12, P. 2948-52, Dec Issn 1678-4464 (Electronic)0102-311x.

Rebollar-Tellez, E. A.; Hamilton, J. G. C.; Ward, R. D. 1999. Response Of Female *Lutzomyia longipalpis* To Host Odour Kairomones From Human Skin. **Physiological Entomology**, V. 24, N. 3, P. 220-226, Issn 1365-3032.

Romero, G. A. S.; Boelaert, M. 2010. Control Of Visceral *Leishmaniasis* In Latin America—A Systematic Review. **Plos Negl Trop Dis**, V. 4, N. 1, P. E584, Issn 1935-2735.

Sherlock, I. A. 1996. Ecological Interactions Of Visceral *Leishmaniasis* In The State Of Bahia, Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**.91(6):671-83.

Silva, A. V.; Paula, A. A.; Cabrera, M. A.; Carreira, J. C. 2005. *Leishmaniasis* In Domestic Dogs: Epidemiological Aspects. **Cad Saude Publica**, V. 21, N. 1, P. 324-8, Jan-Feb Issn 0102-311x (Print)0102-311x.

Soares, R. P.; Turco, S. J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. **An Acad Bras Cienc**, V. 75, N. 3, P. 301-30, Sep Issn 0001-3765 (Print)0001-3765 (Linking).

Souza, D. M.; Oliveira, R. C.; Sá, R. G.; Giunchetti, R. C.; Carvalho, A. T.; Martins Filho, O. A.; Oliveira, G. C.; Reis, A. B. 2011. Cytokine And Transcription Factor Profiles In The Skin Of Dogs Naturally Infected By *Leishmania (Leishmania) Chagasi* Presenting Distinct Cutaneous Parasite Density And Clinical Status. Issn 0304-4017.

Spiegel, C.N.; Jeanbourquin, P.; Guerin, P.M.; Hooper, A.M.; Claude, S.; Tabacchi, R.; *et al.* 2005. (1s,3s,7r)-3-Methyl-Alpha-Himachalene From The Male Sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Induces Neurophysiological Responses And Attracts Both Males And Females. *Journal Of Insect Physiology*. V. 51, N. 12, P. 1366-75.

Tchouassi, D.P.; Sang, R.; Sole, C.L.; Bastos, A.D.; Mithoefer, K.; Torto, B. 2012. Sheep Skin Odor Improves Trap Captures Of Mosquito Vectors Of Rift Valley Fever. **Plos Neglected Tropical Diseases**. V. 6, N. 11, E1879.

Travi, B. L.; Tabares, C. J.; Cadena, H.; Ferro, C.; Osorio, Y. 2001. Canine Visceral *Leishmaniasis* In Colombia: Relationship Between Clinical And Parasitologic Status And Infectivity For Sand Flies. **Am J Trop Med Hyg**, V. 64, N. 3, P. 119-124. Issn 0002-9637.

Verçosa, B.; Lemos, C.; Mendonça, I.; Silva, S.; De Carvalho, S.; Goto, H.; Costa, F. 2008. Transmission Potential, Skin Inflammatory Response, And Parasitism Of Symptomatic And Asymptomatic Dogs With Visceral *Leishmaniasis*. **BMC Veterinary Research**, V. 4, N. 1, P. 45, Issn 1746-6148.

Vilela, E.; Della Lúcia, T. Introdução aos Semioquímicos e Terminologia. In: Holos (Ed.). **Feromônios De Insetos: Biologia, Química E Emprego No Manejo De Pragas**. 206p. Ribeirão Preto, 2001. P.9-12.

World Health Organization (Who). ***Leishmaniasis: Worldwide Epidemiological And Drug Access Update*** 2011.

Who, W. H. O. **Control Of *Leishmaniasis*** 2007.