



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

TAMYRES BERNADETE DANTAS QUEIROGA

**AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA CONTROLE E DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL**

**NATAL/RN
2022**

TAMYRES BERNADETE DANTAS QUEIROGA

**AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA CONTROLE E DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Bioanálises e medicamentos).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes.

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Antonaci Gama.

NATAL/RN

2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Queiroga, Tamyres Bernadete Dantas.

Avaliação de novas abordagens para controle e diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil / Tamyres Bernadete Dantas Queiroga. - 2022.

141f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2022.

Orientador: Paulo Marcos da Matta Guedes.

Coorientadora: Renata Antonaci Gama.

1. Leishmaniose visceral - Tese. 2. Fluralaner - Tese. 3. Lutzomyia longipalpis - Tese. 4. Leishmania infantum - Tese. 5. Espectroscopia - Tese. 6. Quimiometria - Tese. I. Guedes, Paulo Marcos da Matta. II. Gama, Renata Antonaci. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 616.993.161

Tamyres Bernadete Dantas Queiroga

**AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA CONTROLE E
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes
Presidente – UFRN

Prof. Dr. Leomir Aires Silva de Lima
Examinador Externo – Estácio de Goiás

Profa. Dra. Veruska Cavalcanti Barros
Examinador Externo – UFPI

Profa. Dra. Joanna Gardel Valverde Galvão
Examinador Externo – UnP

Prof. Dr. Carlos Ramon do Nascimento Brito
Examinador Interno – UFRN

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto
Examinador Interno – UFRN

Natal, 19 de outubro de 2022

NATAL/RN

2022



Emitido em 19/10/2022

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº 12/2022 - PPGCF/CCS (15.27)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 13:52)
CARLOS RAMON DO NASCIMENTO BRITO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DACT/CCS (15.09)
Matrícula: ###119#9

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 11:16)
PAULO MARCOS DA MATTA GUEDES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMP/CB (17.13)
Matrícula: ###523#7

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 13:56)
VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMP/CB (17.13)
Matrícula: ###131#6

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 11:30)
VERUSKA CAVALCANTI BARROS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.546-##

(Assinado digitalmente em 24/10/2022 10:43)
LEOMIR AIRES SILVA DE LIMA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.364-##

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 10:51)
JOANNA GARDEL VALVERDE GALVÃO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.257-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: **12**, ano: **2022**, tipo: **DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO**, data de emissão: **21/10/2022** e o código de verificação: **bf817d49dc**

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

(Booker T. Washington)

Dedico este trabalho a todos os pacientes (humanos e caninos) que convivem com uma doença negligenciada, especialmente com a leishmaniose visceral. Que este estudo contribua para o bem-estar dos pacientes e que cada vez mais, os olhares, esforços e políticas públicas sejam direcionados a essa população.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha família por ser a base para meu desenvolvimento como pessoa, por me fazerem acreditar em mim e na ideia de que tudo vai dar certo no seu devido tempo. Agradeço por me apoiarem em todos os momentos e, mesmo a distância, me darem suporte e carinho. Aos meus pais Wellington e Sandra, aos meus irmãos, Tiago e Matheus, e ao meu companheiro, Lucas, que me deram todo o amor e incentivo indispensáveis para vencer desafios.

Ao meu orientador Paulo Marcos da Matta Guedes por estar há 11 anos trilhando o caminho científico junto a mim. Agradeço a imensa contribuição na minha formação científica e profissional. Muito obrigada por tudo! Por todos os ensinamentos, compreensão e principalmente por ter me acompanhado ao longo desses anos.

À minha coorientadora Renata Antonaci Gama por sua grande ajuda, paciência, e conselhos que fizeram com que tudo se tornasse mais fácil. Meu sincero agradecimento pela contribuição em todas as etapas deste trabalho e por toda base fornecida ao longo desta caminhada.

Aos meus colegas de laboratório, Henrique e Jéssica, que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço o auxílio em algumas análises, as conversas, conselhos, suporte, carinho e amizade. Não consigo expressar em palavras o quão importantes vocês foram nessa jornada. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, Jucélia, Larissa Henrique e Wilo. Juntamente com os anteriores, foram uma família para mim na UFRN. Agradeço demais pelo suporte e carinho em todo momento que precisei.

Aos demais colegas do Laboratório de Imunoparasitologia e Laboratório de Insetos e Vetores, Nathalie, Luanderson, Eduardo, Taciano, e Larissa pelo companheirismo ao longo desses anos. Agradeço também a todos os colegas que passaram e que estão nos laboratórios neste período.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Parasitos e de Doença de Chagas, Andressa e Vicente, pelo auxílio em diversas etapas do trabalho.

Ao Grupo de Química Biológica e Quimiometria pelas análises essenciais para o desenvolvimento do capítulo sobre espectroscopia.

Aos profissionais do Centro de Controle de Zoonoses do Natal-RN pela colaboração com o grupo de pesquisa para o desenvolvimento do trabalho.

A todas as pessoas que me auxiliaram durante o doutorado direta ou indiretamente, família, amigos, colegas, e professores, permitindo que eu alcance mais essa conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Por fim e formalmente, gostaria de agradecer à CAPES pela bolsa de doutorado conferida a mim para realização deste trabalho.

QUEIROGA, T.B.D. Avaliação de novas abordagens para controle e diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. 2022. Tese - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave em crescente expansão geográfica no Brasil, frente a tratamentos que não eliminam o parasito, medidas profiláticas ineficazes e métodos diagnósticos com baixa acurácia. Pensando nesta problemática, este trabalho objetivou avaliar i) a atividade inseticida sistêmica de dose oral única do composto fluralaner contra *Lutzomyia longipalpis*, bem como ii) avaliar o infravermelho médio como alternativa para detecção de *Leishmania infantum* em amostras de soro de cães. Para isso, cães sem raça definida foram recrutados e randomizados em dois grupos, tratados com fluralaner (n = 4) e controle não tratado (n = 4), e submetidos ao repasto sanguíneo com fêmeas de *Lu. longipalpis* antes do tratamento, no dia 1 pós-tratamento e, então mensalmente até completar um ano. Além disso, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (ATR-FTIR) combinada com análise multivariada foi empregada para distinguir amostras de cães infectados com *L. infantum* (n = 29), em diferentes formas clínicas, de animais saudáveis não infectados (n = 30). Após a análise dos dados, observou-se 100% de mortalidade de *Lu. longipalpis* por até cinco meses após o início do tratamento. O composto fluralaner apresentou eficácia inseticida de 100% até 5 meses pós-tratamento dos cães, 68% em seis meses, com redução para 1,4% um ano pós-tratamento. O ATR-FTIR foi eficiente em diferenciar amostras de cães infectados e não infectados com 100% de sensibilidade e especificidade, utilizando o algoritmo de projeções sucessivas com análise de discriminante linear (SPA-LDA), SPA com máquina de vetores de suporte (SPA-SVM) e algoritmo genético com LDA (GA-LDA). Esses bons resultados sugerem que o composto fluralaner pode ser usado como possível estratégia de controle para LV em áreas endêmicas, bem como a espectroscopia associada a análise multivariada demonstra seu potencial como ferramenta alternativa para o diagnóstico de LV em cães.

Palavras-chave: Fluralaner; Cães; *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania infantum*; Espectroscopia; Quimiometria; Análise multivariada.

QUEIROGA, T.B.D. Evaluation of new approaches for the visceral leishmaniasis control and diagnosis in Brazil. 2022. Thesis - Health Sciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, 2022. Portuguese

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious and chronic disease with a geographic spread in Brazil due to the absence of a treatment that eliminates the parasite, ineffective control measures, and diagnostic methods with low accuracy. The study aimed to evaluate the systemic insecticidal activity of a single oral dose of fluralaner against *Lutzomyia longipalpis*, as well as evaluate the mid-infrared as an alternative for *Leishmania infantum* detection in canine serum samples. Mongrel dogs were recruited and randomized into two groups, fluralaner (n = 4) and control (n = 4), and female specimens of *Lu. longipalpis* were allowed to feed on all dogs before treatment, on day one post-treatment, and then monthly until 1-year post-treatment. In addition, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) combined with multivariate analysis was employed to distinguish samples from dogs infected with *L. infantum* in different clinical forms (n = 29) from healthy animals (n = 30). After data analysis, there was 100% mortality of *Lu. longipalpis* for up to five months after treatment initiation. The efficacy of fluralaner ranged from 100% on day 1 to 68% at six months with a decrease to 1.4% at one-year post-treatment. ATR-FTIR was efficient in differentiating samples from infected and uninfected dogs with 100% sensitivity and specificity using the successive projections algorithm with linear discriminant analysis (SPA-LDA), SPA with support vector machine (SPA-SVM), and the genetic algorithm with LDA (GA-LDA). These satisfactory results suggest that fluralaner may be used as a control strategy for VL in endemic areas, as well as spectroscopy associated with multivariate analysis demonstrates its potential as an alternative tool for the VL diagnosis in dogs.

Keywords: Fluralaner; Dogs; *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania infantum*; Spectroscopy; Chemometrics; Multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Avaliação de novas abordagens para controle e diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil

Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo no ano de 2020.....	22
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. no hospedeiro invertebrado.....	26
Figura 3 – Mecanismo de ação do fluralaner.....	42
Figura 4 – Espectro do infravermelho médio mostrando a faixa de impressão digital biológica	48
Figura 5 – Representação esquemática de análise bioespectroscópica utilizando ATR-FTIR.....	49

CAPÍTULO 1

Fluralaner (Bravecto®) induz mortalidade a longo prazo em *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cães tratados

Figura 1 – Ensaio de repasto sanguíneo.....	58
Figura 2 – Mortalidade de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (%) após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner e cães não tratados	60
Figura 3 – Mortalidade de <i>Lutzomyia longipalpis</i> por até 120h após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner (Bravecto®).....	62

CAPÍTULO 2

Espectroscopia de infravermelho médio (ATR-FTIR) associada a análise multivariada como ferramenta diagnóstica para leishmaniose visceral canina

Figura 1 - Representação gráfica das médias espectrais de duas classes.....	81
Figura 2 - Funções discriminantes calculadas para diferenciação entre grupo controle e grupo infectado com aplicação dos modelos matemáticos.....	82
Figura 3 - Variáveis selecionadas para construção dos modelos SPA-LDA (A) e SPA-SVM (B).....	83

Figura 4 - Variáveis selecionadas para construção dos modelos GA-LDA (A) e GA-SVM (B).....84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Fluralaner (Bravecto®) induz mortalidade a longo prazo em *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cães tratados

Tabela 1 – Acompanhamento da mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* e eficácia inseticida após repasto sanguíneo em cães por até 12 meses (360 dias) pós-tratamento com dose oral única de fluralaner (Bravecto®)..... 63

CAPÍTULO 2

Espectroscopia de infravermelho médio (ATR-FTIR) associada a análise multivariada como ferramenta diagnóstica para leishmaniose visceral canina

Tabela 1 - Valores das figuras de mérito dos modelos de classificação (PCA-LDA, PCA-SVM, SPA-LDA, SPA-SVM, GA-LDA e GA-SVM) para separação dos grupos controle e infectado.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	Reflexão Total Atenuada
AWLS	Método automático de mínimos quadrados ponderados
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl-	Cloreto
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA	Análise Discriminante
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTNs	Doenças Negligenciadas Tropicais
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ESPEC	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
GA	Algoritmo Genético
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GABA _{Cl} s	Canais de cloreto acoplados ao GABA
Glu _{Cl} s	Canais acoplados ao L-glutamato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
IVM	Infravermelho Médio
KS	Kennard-Stone
LDA	Análise de Discriminante Linear
LIVE	Laboratório de Insetos e Vetores
LR-	Razão de Probabilidade Negativa
LR+	Razão de Probabilidade Positiva
LV	Leishmaniose Visceral

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR1	Multiresistência a drogas
MP	Matriz Peritrófica
MS	Ministério da Saúde
NA	Não se aplica
NPV	Valor Preditivo Negativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	Panamerican Health Organization
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPV	Valor Preditivo Positivo
PVC-LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
RBF	Função de Base Radial
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SENS	Sensibilidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SPA	Análise de Projeções Sucessivas
SUS	Sistema Único de Saúde
SVM	Máquina de Vetores de Suporte
TR-DPP	Teste rápido Dual Path Plataform
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
VN	Verdadeiro Negativo
VP	Verdadeiro Positivo
WHO	World Health Organization
YOU	Índice de Youden

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Leishmaniose visceral: doença tropical negligenciada	21
3.2	Agente etiológico e transmissão	24
3.3	Flebotomíneos	26
3.4	<i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)	29
3.5	Reservatórios de <i>Leishmania infantum</i>	31
3.6	Controle da leishmaniose visceral	33
3.7	Estratégias de controle direcionadas para o principal reservatório	37
3.8	Fluralaner (Bravecto®)	41
3.9	Diagnóstico da leishmaniose visceral	44
3.10	Uma alternativa diagnóstica: bioespectroscopia e quimiometria	47
4	CAPÍTULO 1	52
4.1	INTRODUÇÃO	55
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1	Recrutamento e manutenção dos cães	56
4.2.2	Manutenção da colônia de flebotomíneos	57
4.2.3	Desenho do estudo	57
4.2.4	Análises estatísticas	58
4.3	RESULTADOS	59
4.3.1	Ensaio de mortalidade em cães tratados e não tratados	59
4.3.2	Análise de eficácia de fluralaner	60
4.4	DISCUSSÃO	63
4.5	CONCLUSÃO	66
4.6	REFERÊNCIAS	66
5	CAPÍTULO 2	70
5.1	INTRODUÇÃO	72
5.2	METODOLOGIA	75
5.2.1	Amostras de soro	75
5.2.2	Aquisição dos espectros	76

5.2.3	Análise quimiométrica	76
5.2.4	Performance dos modelos supervisionados	79
5.2.5	Análise de dados	80
5.3	RESULTADOS	80
5.3.1	Diferenciação dos grupos por ATR-FTIR	80
5.3.2	Performance dos métodos	85
5.4	DISCUSSÃO	86
5.5	CONCLUSÃO	89
5.6	REFERÊNCIAS	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICE A – Delineamento experimental do capítulo 1	126
	APÊNDICE B – Análise de sobrevivência por grupo e dia amostral	127
	APÊNDICE C – Artigo publicado	129
	APÊNDICE D – Artigos publicados durante o doutorado	137
	ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais	140

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose visceral (LV) é considerada um grave problema de saúde pública em vários países do mundo, cujos agentes etiológicos são parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (LAINSON; SHAW, 1987). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que a incidência da doença seja de 50.000-90.000 casos reportados anualmente em todo mundo, apresentando elevados índices de mortalidade em pacientes sintomáticos graves não submetidos à terapia específica (WHO, 2022a).

Nas Américas, a LV é endêmica em 13 países, sendo o Brasil responsável por notificar aproximadamente 97% de novos casos, atingindo todas as regiões geográficas do país (PAHO, 2021; SINAN, 2022). A principal forma de transmissão do parasito é por meio da picada de fêmeas da ordem Diptera Linnaeus, 1758, da família Psychodidae Newman, 1834, subfamília Phlebotominae Rondani 1840, conhecidos como flebotomíneos. No Brasil, o complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é o principal envolvido na transmissão, bem adaptado ao ambiente urbano e periurbano, com ampla distribuição geográfica (HARHAY et al., 2011; AGUIAR; VIEIRA, 2018).

Em áreas urbanas e periurbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) é incriminado como o principal animal reservatório de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, a espécie causadora de LV nas Américas (BRAGA et al., 1986; QUINNELL et al., 1997). A doença em cães usualmente precede o surgimento de casos em humanos, sendo mais prevalente que a doença humana (CAMPINO, 2003). Outrossim, o cão apresenta elevado parasitismo cutâneo e está inserido em ambientes próximos ao ser humano, destacando seu importante papel na epidemiologia da LV (COURTENAY et al., 2002; MORENO e ALVAR, 2002; GIUNCHETTI et al., 2006).

Desde a década de 60, os órgãos de saúde pública vêm adotando medidas de controle em todo o país que visam a reduzir a transmissão e a morbimortalidade (LACERDA, 1994; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; ALEXANDER; MAROLI, 2003). O programa brasileiro de vigilância e controle da LV recomenda o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos e, a triagem sorológica periódica de todos os cães, seguida da retirada e eutanásia dos sororreagentes (BRASIL, 2014).

Existem diversos testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. Os testes usados como rotina são o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Plataform* (DPP®) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), contudo estes variam nos valores de acurácia (sensibilidade e especificidade) em função da condição clínica do animal e da carga parasitária (SANTOS et al., 2007; MORAIS et al., 2013). Ademais, o ensaio de ELISA pode ser limitado devido à sua reatividade cruzada com outras espécies de parasitos (LAURENTI et al., 2014).

Além das dificuldades observadas no diagnóstico, os medicamentos utilizados no tratamento não levam a cura parasitológica em pacientes humanos e caninos (ALVAR et al., 1994; BANETH; SHAW, 2002), com medidas de proteção individual para os cães não apresentando impacto na redução da incidência em humanos, como a vacinação e o uso de coleiras impregnadas com inseticida (COSTA et al., 2013; GRIMALDI et al., 2017).

Diante disso, a dispersão dos casos vem crescendo anualmente no Brasil, frente a tratamentos, métodos diagnósticos e medidas profiláticas falhos (REIS et al., 2017; GRAEPP-FONTOURA et al., 2020). Neste cenário, a implementação de medidas eficazes para evitar a disseminação da doença torna-se cada vez mais necessária, com o desenvolvimento e/ou aplicação de novas abordagens para o diagnóstico mais eficiente na identificação de animais naturalmente infectados e para o controle da disseminação da LV.

Considerando medidas de proteção individual para o principal animal reservatório, estudos experimentais prévios em animais têm explorado o uso de inseticidas sistêmicos como medida de controle para doenças transmitidas por vetores (OTRANTO, 2018). Mais recentemente, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos em torno de uma nova classe de fármacos, as isoxazolinas (fluralaner, afoxolaner, sarolaner, lotilaner), licenciadas para uso veterinário para proteger contra pulgas, carrapatos e ácaros por meio da inibição do sistema nervoso de artrópodes (GASSEL et al. 2014; LETENDRE et al. 2014; SHOOP et al, 2014; RUFENER et al., 2017).

Entre essa classe de fármacos, o composto fluralaner (Bravecto®) tem a proteção mais prolongada com aproximadamente 12 semanas (ROHDICH; ROEPKE; ZSCHIESCHE, 2014; TAENZLER et al, 2014; FOURIE et al., 2015). Estudos experimentais com fluralaner demonstraram atividade inseticida sistêmica em curtos períodos contra algumas espécies de flebotomíneos presentes no Velho Mundo, como

Phlebotomus papatasi (Skopole, 1786) (GOMEZ et 2018a; GOMEZ et al., 2018b) e *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (BONGIORNO et al. 2019).

Outro ponto importante a ser destacado é o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para a LV. Levando em consideração essa problemática, técnicas analíticas que se baseiam na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria vêm sendo amplamente utilizadas. A espectroscopia do infravermelho, um exemplo dessas técnicas, é usada na detecção e quantificação de biomoléculas presentes em células e tecidos em estudos biológicos, sendo reconhecida como bioespectroscopia (STUART, 2005; GRIFFITHS; HASETH; 2007; KELLY et al., 2011).

A bioespectroscopia associada a análises quimiométricas tem sido utilizada para identificação eficiente, e não destrutiva, de amostras biológicas (TREVISAN et al., 2012); detectando infecções por microrganismos de forma precisa (TAHA et al., 2013; LIMA et al., 2014; ZARNOWIEC et al., 2015; SANTOS et al., 2017; WEHBE; VEZZALINI; CINQUE, 2018; FENG et al., 2020; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2020). Essa técnica foi utilizada anteriormente na diferenciação de espécies de *Leishmania* em cultura (AGUIAR et al., 2015; HORNEMANN et al., 2017; AGUIAR et al.; 2018).

Considerando as evidências sobre a ação do Bravecto® em diferentes espécies de flebotomíneos, este trabalho visa a avaliar a ação do composto fluralaner sobre a espécie *Lu. longipalpis*¹, podendo ser empregado, no futuro, como uma nova medida para controle da LV no Brasil, e ser agregado às outras medidas de controle já existentes. Além disso, a necessidade de metodologias mais simples, rápidas, com maior acurácia, especialmente em animais assintomáticos, torna necessária a análise de novas ferramentas, como a bioespectroscopia associada a quimiometria, para eficiente diferenciação entre cães infectados ou não com *L. infantum*.

Com este trabalho foram lançadas as seguintes hipóteses: i) O composto fluralaner causa a mortalidade de espécimes de *Lu. longipalpis* alimentados em cães tratados com Bravecto®; ii) A bioespectroscopia associada a quimiometria representa uma alternativa viável para detecção da infecção por *L. infantum* em amostras de cães por ser passível de identificar as alterações fisiológicas nos animais.

¹ As abreviações dos nomes dos gêneros de flebotomíneos estão de acordo com Marcondes (2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar novas abordagens para controle e diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- a) Avaliar, mensalmente, a atividade inseticida sistêmica contra *Lu. longipalpis* após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner (Bravecto®) por até 120h pós-exposição ao fármaco pelo período de um ano;

Capítulo 2

- b) Analisar a eficiência e aplicabilidade da espectroscopia do infravermelho médio associada a quimiometria como método na separação de amostras de soro de cães infectados ou não infectados com *L. infantum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose visceral: doença tropical negligenciada

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de 20 condições que ocorrem sobretudo em áreas tropicais e subtropicais, e afetam principalmente populações que vivem em extrema pobreza. A epidemiologia das DTNs é complexa e, muitas vezes, relacionada às condições ambientais, onde o acesso ao saneamento adequado, água potável e cuidados de saúde são limitados (PAHO, 2022b; WHO, 2022b).

Muitos desses patógenos ligados as DTNs são transmitidos por vetores, possuem reservatórios animais e estão associadas a ciclos de vida complexos, tornando o seu controle desafiador para a saúde. As DTNs impactam algumas das comunidades mais pobres e marginalizadas no mundo, predominantemente na África, Ásia e Américas. Essas doenças afetam a vida de mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo e ameaçam a saúde de milhões de outras pessoas (PAHO, 2022; WHO, 2022b).

Entre o grupo das DTNs, a leishmaniose visceral (LV), ou calazar, está incluída como uma doença de grande importância para a saúde pública, devido à considerável expansão geográfica, à elevada incidência e às altas taxas de mortalidade (ALVAR et al., 2012); observadas especialmente em crianças desnutridas, idosos, e principalmente em pacientes portadores da coinfeção *Leishmania* e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; LINDOSO et al., 2018).

A LV é uma doença crônica grave causada por espécies do gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). Curiosamente, grande parte dos indivíduos infectados não apresenta doença clinicamente manifestada, desenvolvendo doença subclínica, que pode permanecer assintomática ou assumir forma oligoassintomática, com febre irregular e intermitente, perda de peso, pancitopenia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. Cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clássica da doença, apresentando estado de debilidade geral, caquexia e óbito (BADARO et al., 1986b; EVANS et al., 1992; HERWALDT, 1999; JERONIMO et al., 2000; SILVEIRA et al., 2010).

Segundo a OMS, a doença pode conduzir mais de 90% dos pacientes a óbito em até dois anos em casos sintomáticos graves, se não forem submetidos à terapia específica. A LV apresenta ampla distribuição mundial, sendo considerada endêmica em 78 países. Dentre estes, em torno de 90% de novos casos reportados estão distribuídos em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (**Figura 1**) (WHO, 2022a). Nas Américas, a doença ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo endêmica em 13 países (PAHO, 2021; WHO, 2022a).

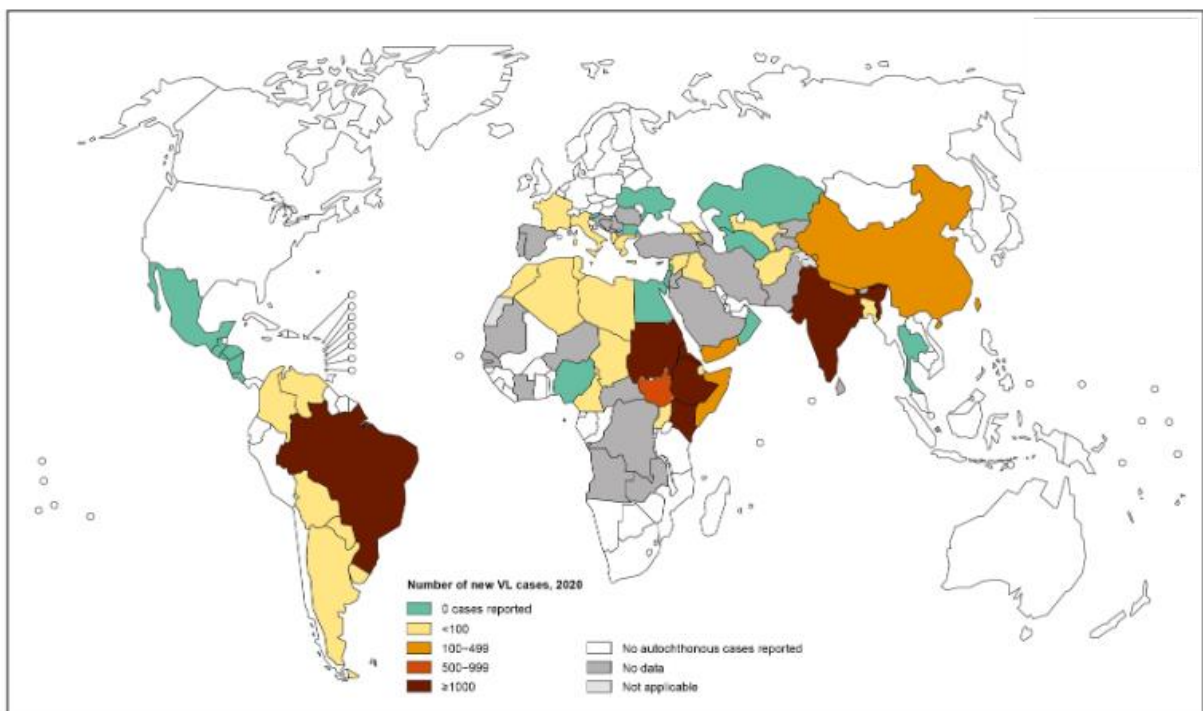


Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo no ano de 2020. Fonte: Adaptado de WHO (2020).

O registro do primeiro caso de LV, na América do Sul, ocorreu em 1913, a partir da análise de material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso do Sul (MIGONE, 1913). Em anos posteriores, a partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, amastigotas de *Leishmania* foram encontradas em cortes histológicos de fígado em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (PENNA, 1934).

Atualmente, o Brasil é responsável por reportar aproximadamente 97% de novos casos nas Américas com mais de 2000 casos relatados por ano, sendo o país com maior taxa de incidência. A LV está amplamente distribuída no Brasil, tendo sido

notificada em 24 das 27 Unidades da Federação, atingindo todas as regiões geográficas, com maior número de casos reportados nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (PAHO, 2021; SINAN, 2022).

Inicialmente silvestre, a LV passou por processo de urbanização, que pode ser correlacionado a intervenções na cadeia epidemiológica, envolvendo parasito, vetores e hospedeiros. Dentre essas intervenções, destacam-se as modificações ambientais causadas por ações antrópicas, ligadas ao rápido processo migratório em áreas periurbanas (desmatamento e urbanização); a adaptação do vetor *Lu. longipalpis* ao peridomicílio com eclética preferência alimentar; e a interação e mobilização de reservatórios infectados para áreas sem transmissão (LUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; SALÓMON et al., 2015).

Nas áreas urbanas, o cão é considerado o principal reservatório doméstico e apresenta importante papel na manutenção do ciclo do parasito, sendo o principal elo na cadeia de transmissão de *L. infantum* ao ser humano (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008). O cão tem sido incriminado como responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, devido à alta prevalência da doença nesses animais, ao elevado parasitismo na pele e a íntima relação com o ser humano (DANTAS-TORRES, 2009; PRADO et al., 2011; PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Quando a prevalência canina aumenta, a humana acompanha esses índices. Por esta razão, esses animais são considerados um dos alvos estratégicos de controle da doença, sendo de extrema importância sua vigilância epidemiológica (MARZOCHI et al., 1985; MADEIRA et al., 2004; FRAGA et al., 2012; GRIMALDI et al., 2012, ZOGHLAMI et al., 2014).

Em áreas endêmicas, a infecção de cães por *L. infantum* ocorre de forma generalizada com soroprevalência variando de 3,4% a 40%. Entretanto, muitos animais permanecem assintomáticos frequentemente e, somente, uma pequena parcela da população canina apresenta doença clínica (DANTAS-TORRES, 2009; PRADO et al., 2011; PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Clinicamente, esses animais são divididos em três grupos quando infectados: assintomáticos, que não apresentam nenhum sinal clínico sugestivo de LV; oligossintomáticos, são aqueles com adenite, perda de peso leve e pelo opaco; e sintomáticos, aqueles que apresentam alguns sinais mais comuns da doença como dermatite furfurante, onicogrifose e ceratoconjuntivite, podendo ser observado ainda febre, diarreia, coriza, apatia, hemorragia intestinal e em casos mais graves, atrofia

muscular com paresia das patas posteriores, anorexia, perda de peso, caquexia e morte (MANCIANTI et al., 1988; GIUNCHETTI et al. 2006; REIS et al., 2009).

3.2 Agente etiológico e transmissão

A LV é causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*: *Leishmania donovani* Laveran & Mesnil, 1903 e *L. infantum* (LAINSON e SHAW, 1987). A espécie causadora da infecção nas Américas é *L. infantum*, apresentando o cão como principal animal reservatório (BRAGA et al., 1986; QUINNELL et al., 1997).

A transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* ocorre em ciclo digenético (heteroxênico), alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, passando por grandes mudanças morfológicas em seu ciclo de vida e diferentes estágios em regiões distintas dentro de seus hospedeiros e vetores. Os parasitos apresentam duas morfologias principais no seu ciclo de vida: amastigota intracelular, encontrada em hospedeiros vertebrados, e promastigota, encontrada nos insetos vetores (HOMMEL, 1978; WALTERS, 1993; BATES; ROGERS, 2004; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Durante o ciclo de transmissão no hospedeiro vertebrado, formas promastigotas metacíclicas infectantes são introduzidas na epiderme durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK, 1990b) e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), transformando-se em amastigotas intracelulares, que são formas arredondadas, sem flagelos exteriorizados e se multiplicam intensamente por divisão binária (HANDMAN; BULLEN, 2002).

Os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo, ocorrendo a disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do SMF (KAYE; SCOTT, 2011). A infecção, no inseto vetor, ocorre após a alimentação sanguínea da fêmea em um hospedeiro infectado (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). As fêmeas de flebotomíneos realizam a telmofagia, dilacerando pequenos vasos presentes na derme do hospedeiro, produzindo micro hemorragias (GORDON; CREWE, 1952).

Durante o repasto, a fêmea pode ingerir, juntamente com o sangue, os parasitos na forma amastigota, presentes dentro de macrófagos ou em outros tipos de células fagocitárias mononucleares. Esses são, então, direcionados para o intestino médio do inseto, juntamente com o conteúdo alimentar, e envoltos pela matriz peritrófica (MP), uma matriz quitino-protéica secretada pelo epitélio intestinal do inseto logo após a ingestão do sangue (WALTERS et al., 1993; PIMENTA et al., 1997; SECUNDINO et al., 2005).

Os parasitos enfrentam mudanças adversas após a passagem do hospedeiro vertebrado para o flebotomíneo. Para sobreviver a variações no interior do intestino do inseto, os parasitos precisam passar por mudanças morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se em formas promastigotas (SACKS; PERKINS, 1984; DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

Diferentes morfotipos são encontrados no inseto vetor. Inicialmente, as formas promastigotas procíclicas são observadas, formas com pequeno flagelo, baixa motilidade e que se replicam no interior da matriz peritrófica (WILSON et al., 2010). Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas com flagelo longo e alta motilidade, chamadas nectomonas, que se dirigem para o exterior da matriz peritrófica, aderindo-se ao epitélio intestinal. As nectomonas se diferenciam em leptomonas, formas curtas e largas com capacidade replicativa (**Figura 2**) (ROGERS; CHANCE, BATES, 2002; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

Posteriormente, alguns parasitos irão se diferenciar em formas haptomonas, formas imóveis que possuem um flagelo modificado; e outros, em formas promastigotas metacíclicas, que são formas longas e com alta motilidade (ASHFORD, 2000; CHOI; LERNER, 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001). A depender das espécies de *Leishmania*, o desenvolvimento do parasito irá ocorrer em regiões diferentes do trato digestivo, ocorrendo sua multiplicação, seguida da migração e colonização no intestino (KAMHAWI, 2006).

As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*, como *L. infantum*, desenvolvem-se nas regiões abdominal e torácica do intestino médio (seção suprapilárica). Enquanto as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, estabelecem uma infecção inicial no triângulo pilórico e no intestino posterior (seção peripilárica) e, posteriormente, migram e se desenvolvem na região do intestino médio (LAINSON; SHAW, 1988; KAMHAWI, 2006).

No período de aproximadamente de seis a nove dias, de acordo com a espécie envolvida, o ciclo de infecção no inseto é completado, com o desenvolvimento de formas metacíclicas infectantes que são altamente ativas e migram ao longo do intestino anterior, podendo ser liberadas em um novo repasto sanguíneo (SACKS et al., 1995; SARAIVA et al., 1995; BATES, 2007).

O desenvolvimento de infecção bem-sucedida em flebotomíneos selvagens é um processo gradual, dependente da amplificação do parasito e impulsionada pela ingestão de várias refeições sanguíneas pelo flebotomíneo. Apesar do número de parasitos ser muito baixo inicialmente, a realização de novo repasto sanguíneo aumentará a replicação de leptomonas, aumentando o número de parasitos, de modo que favoreça a diferenciação em formas metacíclicas. A efetuação de terceiro repasto sanguíneo e outro ciclo de replicação do parasito podem ser necessários, a depender do inóculo inicial (SERAFIM et al., 2018).

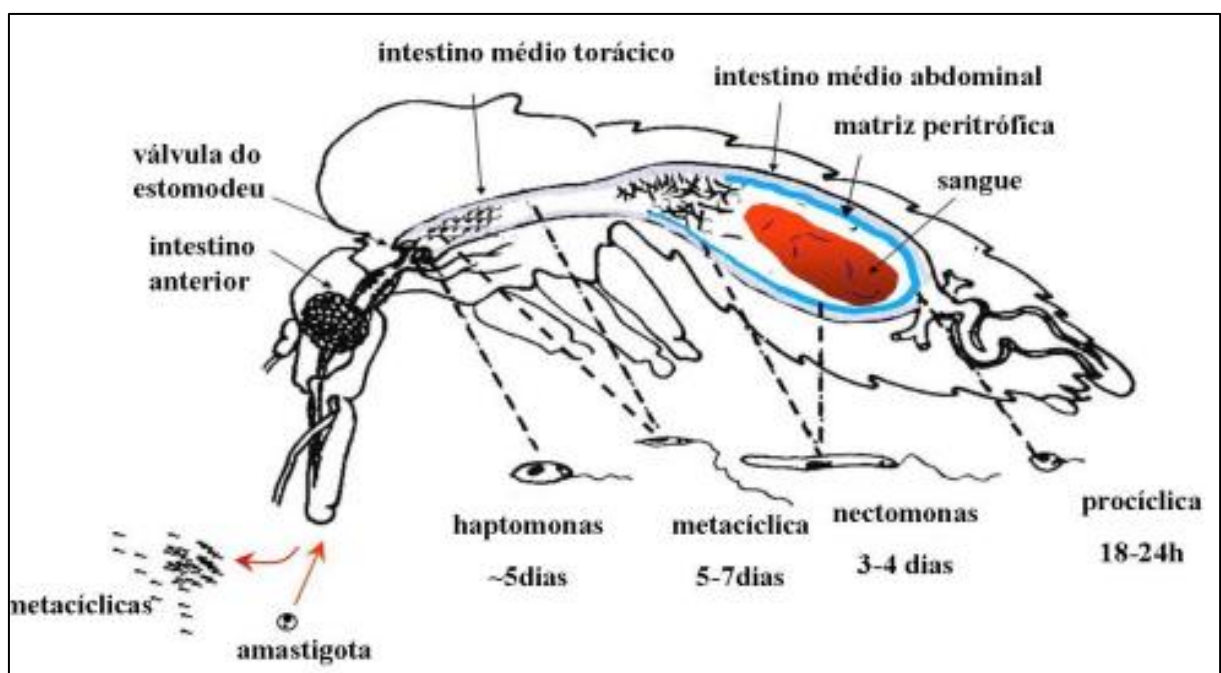


Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp. no hospedeiro invertebrado. Fonte: Adaptado de KAMHAWI (2006).

3.3 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros pertencentes a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que apresentam grande importância médica, pois muitas espécies estão envolvidas na transmissão de patógenos entre humanos e animais

(FORATTINI, 1973). Atualmente, 1.047 espécies de flebotomíneos são conhecidas em todo o mundo com 539 espécies registradas nas Américas, pertencentes a 23 gêneros, e dessas, 283 espécies têm ocorrência no Brasil até o momento (GALATI, 2018; AGUIAR; VIEIRA, 2018; CHAVES JR; SHIMABUKURO; ANDRADE, 2022).

De acordo com análises filogenéticas, os flebotomíneos são divididos em duas tribos, apresentando método de classificação cladístico proposto por Galati (1995, 2003). A subfamília Phlebotominae é dividida na tribo Hertigiini Abonnenc & Léger, 1976, na qual estão incluídas as subtribos Hertigiina Abonnenc & Léger, 1976 e Idiophlebotomina Artemiev, 1991; e na tribo Phlebotomini Rondani, 1840 (GALATI, 2003).

A tribo Phlebotomini contém as subtribos Phlebotomina Rondani, 1840; Australophlebotomina Artemiev, 1991; Brumptomyiina Artemiev, 1991; Sergentomyiina Artemiev, 1991; Lutzomyiina Abonnenc & Léger, 1976; e Psychodopygina Galati, 1995 (GALATI, 2003). Nessas análises, o gênero *Edentomyia* Galati, Andrade-Filho, Silva & Falcão, 2003 também foi descrito por Galati sem indicar a posição taxonômica na tribo Phlebotomini (GALATI, 2003).

Os flebotomíneos são insetos de tamanho pequeno, medindo de 2 a 3 mm com o corpo bastante cerdoso, coloração variando entre tons amarelados e marrons escuros. Caracterizam-se pelo voo curto, baixo e saltitante, não se afastando muito de seus criadouros (FORATTINI, 1973; RANGEL; LAINSON, 2003). Estes insetos são holometábolos, apresentando estágio de ovo, quatro estádios larvais (L1-L4), estágio de pupa e o adulto, com o tempo de desenvolvimento completo podendo variar a depender da espécie e das condições ambientais; por exemplo, *Lu. longipalpis* apresenta ciclo de desenvolvimento de 30 a 45 dias em condições de laboratório (KILLICK-KENDRICK; LEANEY; READY, 1977).

Pouco se conhece a respeito dos criadouros naturais dos flebotomíneos. As larvas apresentam grande capacidade de deslocamento em busca por alimento; ademais, diversos ecótopos podem ser utilizados como abrigo para o inseto adulto (ANDRADE FILHO et al., 1998). Estas são algumas das razões pelas quais os criadouros naturais são difíceis de serem encontrados, o que não contribui para o direcionamento das ações para o inseto vetor, especialmente nas suas formas imaturas, nas estratégias de controle das leishmanioses (CASANOVA, 2001; SHERLOCK, 2003; ALENCAR, 2007; SANGIORGI et al., 2012).

As larvas se desenvolvem em micro-habitat úmido, onde haja substrato orgânico para alimentação (FERRO et al, 1997). Os insetos adultos apresentam hábitos alimentares de fontes naturais de açúcar, necessitando de carboidratos como fonte energética para garantir as funções vitais como o voo, acasalamento e postura (KILLICK-KENDRICK, 1999); enquanto as fêmeas também são hematófagas, alimentam-se de sangue para o desenvolvimento e maturação dos ovócitos, apresentando capacidade de dispersão até a fonte de alimento e se adaptam a diferentes ambientes naturais ou modificados pela intervenção humana (RANGEL; VILELA, 2008).

A maioria das espécies de flebotomíneos apresenta hábitos crepusculares e noturnos, permanecendo em locais protegidos durante o dia. Os insetos adultos são encontrados em troncos de árvores, no interior de cavernas, dentro de tocas de animais, em frestas de rochas, entre outros locais (TEODORO et al., 1993; CASANOVA et al., 2013; SILVA et al., 2014; CAMPOS et al., 2017).

Em áreas antropizadas, os flebotomíneos podem ser encontrados no intradomicílio (nas paredes internas e externas das casas) ou peridomicílio, próximo a vegetações, sob material acumulado nos quintais e em abrigos de animais como, galinheiro, chiqueiro, estábulo, curral (ALMEIDA et al., 2010; CASANOVA et al., 2013; SILVA et al., 2014; SALOMÓN et al., 2015; BERROZPE et al., 2017; SANTINI et al., 2017). A introdução de animais no ambiente peridomiciliar, como cães, aves e porcos, levam ao fornecimento de fontes sanguíneas que favorecem o desenvolvimento do vetor, e possibilita a perpetuação do ciclo de transmissão de *L. infantum* (ANDRADE et al., 2009).

Diversos critérios são descritos e relacionados à capacidade e competência vetorial dos flebotomíneos para transmitir *L. infantum*. Alguns critérios são essenciais para serem indicativos que determinada espécie esteja participando da transmissão do parasito, dentre eles podemos destacar: a distribuição e presença em alta densidade nos locais onde há casos de LV, preferência alimentar por reservatórios naturais de *L. infantum*, grau de antropofilia da espécie, e presença de espécimes infectadas naturalmente. Além da infecção natural, indica-se realizar a infecção experimental para avaliar a suscetibilidade do inseto ao parasito e a capacidade de transmissão utilizando um modelo animal (KILLICK-KENDRICK, 1990a; READY, 2013).

Considerando esses critérios, o complexo de espécies *Lu. longipalpis* é o principal transmissor de *L. infantum* no Brasil, apresentando preferência alimentar eclética, alto grau de antropofilia, associada a presença e prevalência em áreas com casos autóctones de LV, além de ser observada a infecção natural e experimental de *L. infantum* (DEANE; DEANE, 1962; LAINSON; WARD; SHAW, 1977; LAINSON; RANGEL, 2005; MISSAWA; DIAS, 2007).

Outras espécies são encontradas naturalmente infectadas, tendo a espécie *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) sido incriminada como vetor nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998; PITA-PEREIRA et al., 2008; MISSAWA et al., 2011; READY, 2013, FALCÃO DE OLIVEIRA et al., 2017). Em Pernambuco, o papel de vetor de *L. infantum* foi atribuído a espécie *Migonemyia migonei* (França, 1920) em focos de LV (CARVALHO et al., 2010, GUIMARÃES et al., 2016). Outrossim, o isolamento e caracterização de promastigostas de *L. infantum* na espécie *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926) foi observado em áreas, onde casos humanos autóctones de LV estavam ocorrendo (GALVIS-OVALLOS et al., 2021).

3.4 *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)

Segundo as classificações de Galati (2003), que divide os flebotomíneos americanos em 23 gêneros, sete desses gêneros são os principais responsáveis pela transmissão de *Leishmania* nas Américas: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*. Com o complexo de espécies *Lu. longipalpis* sendo o principal transmissor de *L. infantum*, bem adaptado ao ambiente peridomiciliar e disseminado em toda a América Latina (ZELEDON; MURILLO; GUTIERREZ, 1984; MORRISON et al., 1995; CARRASCO; MORRISON; PONCE; 1998; LAINSON; RANGEL, 2005; SALOMON; ORELLANO, 2005).

Lutzomyia longipalpis é considerado um complexo de espécies-irmãs, apresentando diferenças em características comportamentais e genéticas, além de morfológicas entre algumas populações (WARD et al., 1983; WATTS et al. 2005; BALBINO et al. 2006; ARAKI et al. 2009; SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017). Esse complexo de espécies é amplamente distribuído, ocorrendo em diversos ecossistemas. Inicialmente, *Lu. longipalpis* era considerado de área silvestre, capturado em regiões de matas e florestas, longe da presença humana (LAINSON et al., 1986; LAINSON et al., 1990; SALOMÓN et al., 2009).

Com o processo de urbanização das cidades, observou-se a dispersão do vetor para novas áreas (RANGEL; VILELA, 2008; GALARDO et al., 2013; SALOMÓN et al., 2015; BERROZPE et al., 2017; PETERSON et al., 2017). Essa disseminação esteve associada à construção de rodovias, à malha viária, ao desmatamento, e a intensidade de intercâmbio entre as cidades vizinhas (OLIVEIRA et al., 2018).

A urbanização de *Lu. longipalpis* está ligada a capacidade adaptativa a diferentes nichos ecológicos, com presença relatada nas áreas mais úmidas até ambientes com climas quente e seco, sendo amplamente encontrado em áreas que se estendem da região Nordeste para a região Sudeste do Brasil (ANDRADE FILHO et al., 2017), distribuído nas cinco regiões do país (AGUIAR; VIEIRA, 2018).

Fatores ambientais associados ao grau de urbanização das cidades, tais como saneamento básico, coleta de lixo, iluminação pública e pavimentação podem estar relacionados a ocorrência de *Lu. longipalpis*, (FERNÁNDEZ et al., 2010), além da temperatura, umidade e pluviosidade, que estão associadas ao aparecimento do vetor (MICHALSKY et al., 2009; DE ANDRADE et al., 2014).

Em ambientes antrópicos, espécimes de *Lu. longipalpis* são encontrados em abrigos artificiais que incluem áreas sombreadas e úmidas, principalmente, próximo a locais de criação de animais, como galinheiros, chiqueiros, currais e estábulos. Esses locais são escolhidos por serem fonte para obtenção de sangue, além de serem favoráveis para a oviposição e o desenvolvimento das formas imaturas com solos ricos em umidade e matéria orgânica (FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005; VIANNA et al., 2016).

Lutzomyia longipalpis possui hábitos alimentares ecléticos, apresentando marcada zoofilia e antropofilia. Este complexo de espécies é considerado oportunista, podendo se alimentar em aves, equinos, bovinos, roedores, cães e até mesmo em seres humanos, favorecendo o papel como vetor nos ciclos zoonóticos de *L. infantum* e facilitando o estabelecimento e a colonização do ambiente antrópico (BARATA et al., 2005; LAINSON; RANGEL, 2005; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008; RANGEL; VILELA, 2008).

A presença dos abrigos de animais domésticos, próximos as residências, geralmente encontra-se em uma distância dentro do raio de dispersão dos flebotomíneos, sendo um aspecto relevante para o risco de transmissão de *Leishmania* para os seres humanos, pois quanto mais próximos estiverem deles, mais fácil será o acesso do vetor ao intradomicílio (MORRISON et al., 1993).

3.5 Reservatórios de *Leishmania infantum*

O reservatório de uma infecção compreende um sistema ecológico onde um agente infeccioso sobrevive persistentemente. Esse sistema pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção de um parasito na natureza. As espécies configuram diferentes papéis na continuidade da infecção, que devem ser consistentes, equilibrados e serem considerados únicos numa escala espaço-temporal em cada sistema ecológico (ASHFORD, 1997; HAYDON et al., 2002; JANSEN; ROQUE, 2010).

A importância na manutenção do ciclo de transmissão dependerá das particularidades da interação parasito-hospedeiro em determinada área. Certas características são observadas nessa interação, relacionadas ao hospedeiro (idade, sexo, competência imunológica, coinfeções), ao parasito (estratégias de transmissão, potencial reprodutivo, tempo de geração), ao vetor (hábitos, comportamento, dispersão) e ao ambiente onde ocorre (CHAVES et al., 2007; ROQUE; JANSEN, 2014).

Diversos mamíferos são encontrados infectados com espécies de *Leishmania*, incluindo mamíferos silvestres, domésticos e sinantrópicos, os quais abrangem espécies de canídeos, felinos, equídeos, marsupiais, quirópteros, roedores, dentre outros (SHERLOCK, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; ROQUE et al., 2010; QUARESMA et al., 2011; GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; MENDONÇA et al., 2020). Entretanto, nem todas essas espécies agem como fontes de infecção para vetores e amplificação de focos enzoóticos, sendo necessários estudos para a compreensão de sistemas reservatórios e do papel desempenhado por cada espécie de mamífero na manutenção dos parasitos na natureza (ROQUE; JANSEN, 2014).

Dentre esses mamíferos, o papel do cão doméstico já está bem definido e sedimentado. Os cães são considerados eficientes reservatórios de *L. infantum*, devido à alta susceptibilidade à infecção (MORENO; ALVAR, 2002), à proximidade com os seres humanos, favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão doméstico (SILVA et al., 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006), e ao intenso parasitismo cutâneo (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; BORJA et al., 2016).

A prevalência de infecção por *L. infantum* é frequentemente elevada em cães em áreas endêmicas de LV, com uma grande proporção de assintomáticos (DANTAS-

TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006). Outrossim, os cães podem permanecer infectados por *L. infantum* sem exibir sinais clínicos aparentes de LV por anos e até mesmo por toda a vida e serem competentes em transmitir o parasito (MORENO; ALVAR, 2002; LAURENTI et al., 2013).

O papel de outros animais domésticos, como possíveis reservatórios de *L. infantum*, também tem sido especulado. Os gatos domésticos (*Felis catus* Linnaeus, 1758) apresentam destaque, em virtude principalmente dos casos de infecção natural relatados em diferentes partes do mundo (RÜFENACHT et al., 2005; RICHTER; SCHAARSCHMIDT-KIENER; KRUDEWIG, 2014; MAIA et al., 2015; PENNISI et al., 2015a; PIMENTA et al., 2015; BASSO et al., 2016).

Estudos com xenodiagnóstico vêm observando a transmissão para o vetor após exposição a gatos naturalmente infectados com *L. infantum* (MAROLI et al., 2007; SILVA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2020). Ademais, a transmissão do parasito foi demonstrada por meio de xenodiagnóstico, com espécimes de *Lu. longipalpis*, de um gato com LV para um cão saudável (BATISTA et al., 2020).

Algumas outras espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos são classificadas como potenciais reservatórios de *L. infantum* nas Américas. Na ordem Marsupialia Illiger, 1811, o gênero *Didelphis* Linnaeus, 1758 é um dos marsupiais didelfídeos mais investigados no que diz respeito à infecção por *Leishmania* spp. (TRAVI et al., 1994; SCHALLIG et al., 2007; QUINNELL; COURTENAY, 2009). O gambá *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 foi demonstrado como potencial reservatório de *L. infantum* na Colômbia (CORREDOR et al., 1989).

O isolamento de *L. infantum* foi observado em amostras de didelfídeos da espécie *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (SHERLOCK et al., 1984; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; HUMBERG et al., 2012). Além disso, a infectividade para *Lu. longipalpis* foi observada após xenodiagnóstico em mamífero dessa espécie, sugerindo a sua participação como reservatório (SHERLOCK, 1996). Na ordem Carnivora Bowdich 1821, o cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 foi a primeira espécie descrita, entre os carnívoros silvestres, infectada com *L. infantum* (DEANE; DEANE, 1955; COURTENAY et al., 1996).

Este canídeo pode apresentar prevalências de infecção de até 78% por sorologia e de até 42% por isolamento (LAINSON et al., 1990; COURTENAY et al., 2002). Outrossim, a infecção do vetor já foi comprovada por xenodiagnóstico, porém a taxa de infecção dos vetores relatada para *C. thous* é menor quando comparada à

taxa observada em cães domésticos (COURTENAY et al., 2002; GOMES et al., 2007; QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Alguns poucos estudos epidemiológicos observam a infecção de *Leishmania* spp. em primatas não humanos (ordem Primata Linnaeus, 1758) (SILVEIRA et al., 1990). Entretanto, a competência de transmitir *L. infantum* para *Lu. longipalpis* foi demonstrada, por meio de xenodiagnóstico, em quatro espécies de primatas não humanos em cativeiro, incluindo o chimpanzé *Pan troglodytes* (Blumenbach, 1776), o mico-leão-dourado *Leontopithecus rosalia* (Linnaeus, 1766), o macaco-prego *Sapajus apella* (Linnaeus, 1758) e o talapoim-angolano *Miopithecus talapoin* (Schreber, 1774) (OLIVEIRA et al., 2019).

A partir deste contexto, considerar os cães como responsáveis exclusivamente pela manutenção da endemia de LV diminui as possibilidades de sucesso no controle epidemiológico, pois outros mamíferos podem atuar como possíveis reservatórios, incluindo o ser humano (FERREIRA et al., 2018). Sendo importante ressaltar que a condição de reservatório é dinâmica, variando em diferentes ambientes e ao decorrer do tempo, e apenas um estudo local da enzootia poderia definir a participação ou não de determinadas espécies como potenciais reservatórios (COURTENAY et al., 2017).

3.6 Controle da leishmaniose visceral

A LV é reconhecida como problema de saúde pública pelos representantes do governo brasileiro desde a década de 60, com a realização de campanhas de controle que foram desenvolvidas particularmente nos estados de Ceará e Minas Gerais, com posterior interrupção e recomeço na década de 80 (VIEIRA; LACERDA; MARSDEN, 1990; LACERDA, 1994; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

Em 2006, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) foi instituído pelo Ministério da Saúde (MS). Com a publicação do PVC-LV, várias diretrizes foram constituídas visando à redução da transmissão e da morbimortalidade. Essas diretrizes foram direcionadas para o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; inquéritos sorológicos caninos e eutanásia de cães sororreagentes; redução da população de flebotomíneos; e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006).

As estratégias de controle estabelecidas pelo PVC-LV foram centradas em quatro pilares como supracitado. Além disso, o cumprimento das ações foi

determinado para ser realizado de forma conjunta, considerando o fato de que nenhuma, isoladamente, é capaz de prevenir e controlar a doença integralmente. Essas ações estabelecidas pelo programa, direcionadas para prevenção e controle, devem estar baseadas em análises epidemiológicas fundamentadas na estratificação por risco (BRASIL, 2014).

Acerca do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, as autoridades municipais têm a responsabilidade de organizar a rede básica de saúde para o atendimento de pacientes com LV (BRASIL, 2014). Todo caso suspeito deve ser submetido à investigação clínica, epidemiológica e ao diagnóstico laboratorial. Em casos confirmados, deve-se iniciar o tratamento conforme procedimentos terapêuticos padronizados (BRASIL, 2014; PAHO, 2022a).

No que concerne à redução dos flebotomíneos, o controle químico é preconizado pelo PVC-LV. Esse controle é direcionado para os insetos adultos e baseia-se na utilização de inseticidas de ação residual, vinculada à procedência de casos humanos (BRASIL, 2014).

A investigação entomológica deve ser realizada para determinar a curva de sazonalidade dos vetores, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, seguida da aplicação de inseticida no período do ano em que se verifica o aumento da densidade vetorial ou ao final do período chuvoso. Os produtos mais empregados, atualmente, são a cipermetrina, em formulação pó molhável, e a deltametrina, em suspensão concentrada (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Um dos problemas relacionados ao controle químico é o uso indiscriminado de inseticidas para controlar vetores, levando a seleção de populações de flebotomíneos resistentes (DHIMAN; YADAV, 2016). Atualmente, 47 populações de flebotomíneos de diferentes espécies são observadas com resistência confirmada para um ou mais inseticidas, especialmente na Índia, e outras 28 populações são consideradas tolerantes. A resistência de flebotomíneos a inseticidas é um dos fatores que deve ser levado em consideração no controle das leishmanioses (ROCHA et al., 2020).

Em relação às atividades de educação em saúde, todos os serviços, que desenvolvem as ações de prevenção e controle da LV, devem requerer o envolvimento das equipes multiprofissionais para incorporar atividades de educação direcionadas à LV, dentro de um processo de educação continuada junto à comunidade e aos profissionais de saúde (BRASIL, 2014).

Um dos pilares do PVC-LV que vem passando por reformulações é a confirmação e eliminação de reservatórios caninos. Os inquéritos sorológicos caninos são realizados desde o Decreto nº 51.838 de 14 de março de 1963, que baixa normas técnicas especiais para o combate às leishmanioses, focando na eliminação dos animais domésticos doentes para efeitos do programa de controle (BRASIL, 1963).

A partir de critérios clínicos e/ou laboratoriais, os cães são considerados caso canino suspeito ou confirmado. A eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou com parasitológico positivo com base na Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) (BRASIL, 2014). Um dos problemas relacionados à baixa efetividade desta medida de controle é o longo período entre o diagnóstico e a remoção dos cães (WERNECK, 2014).

Dificuldades na detecção e acompanhamento do animal infectado também são relatadas (WERNECK, 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2017; DUTHIE; LISON; CORTENAY, 2018). Outrossim, a “reposição” do animal submetido à eutanásia também é observada, com a presença de outro cão suscetível que pode tornar-se infectado em aproximadamente dois meses (DYE, 1996; MOREIRA et al., 2003; DANTAS-TORRES et al., 2012; GRIMALDI et al., 2012).

A partir de 2016, o MS emitiu uma nota técnica com parecer favorável ao tratamento de cães com LV com o componente miltefosina (Milteforan™), não se configurando como uma medida de saúde pública para controle da doença, apenas de caráter individual, à escolha do tutor (BRASIL, 2016).

O cumprimento do protocolo de tratamento descrito na rotulagem do produto é fundamental, sendo necessárias reavaliações clínicas, laboratoriais e parasitológicas periodicamente, e a necessidade de realização de novo ciclo de tratamento quando indicado pelo médico veterinário. Ademais, é recomendada a utilização de produtos repelentes contra o inseto vetor (BRASIL, 2016).

Com a liberação deste medicamento, o protocolo de recomendação de eutanásia do animal não foi invalidado, considerando-se que o tratamento não é financeiramente acessível à toda população (TRAVI, 2014). As orientações direcionadas para os médicos veterinários focam na avaliação do risco/benefício para cada animal em acordo com o tutor, com devida orientação de que não há cura parasitológica. O risco de transmissão continua e existe a possibilidade de recidivas de sintomas e conseqüente óbito do animal (BRASIL, 2020).

Ainda em 2016, o MS instituiu um grupo de trabalho com a finalidade de rever as diretrizes de vigilância e manejo de reservatórios da LV pela Portaria nº 2.684, de 9 de dezembro de 2016. Dentre as pautas propostas, a recomendação do uso de coleiras impregnadas com inseticida em cães foi apresentada como ferramenta de controle da LV (BRASIL, 2021). Essa recomendação foi baseada em estudo de intervenção controlado e multicêntrico financiado pelo MS entre 2012 e 2015 (ALVES et al., 2018; KAZIMOTO et al., 2018; ALVES et al., 2020; ASSIS et al., 2020; BRASIL, 2021).

No estudo desenvolvido com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®), foi demonstrado que o uso da coleira foi responsável pela redução em 50% da incidência da LV em cães nas áreas de intervenção quando comparadas às áreas controle, associando às demais ações de controle recomendadas pelo PVC-LV (KAZIMOTO et al., 2018; ALVES et al., 2020).

Após análises de efetividade da coleira, a avaliação de custo-efetividade foi realizada, sendo considerada custo-efetiva comparada às ações de controle preconizadas. Deve ser destacado também que os resultados do estudo devem ser explorados com cautela, pois são baseados em análises de um único município brasileiro (ASSIS et al., 2020).

Desta forma, critérios de elegibilidade de municípios prioritários foram estabelecidos para implementação do uso da coleira como estratégia de controle para LV a partir de 2021 em um projeto piloto. Esses critérios incluem estar classificado como transmissão alta, intensa ou muito intensa para LV. A classificação baseia-se em índice composto que abrange a média de casos e incidência de LV nos últimos três anos (BRASIL, 2021).

Outrossim, pré-requisitos de municípios elegíveis foram estabelecidos, sendo avaliados os recursos humanos, recursos físicos/insumos, monitoramento de indicadores e pactuação. Após a adesão do município, esse deverá manter a abordagem por, no mínimo, quatro anos de trabalho nas áreas escolhidas (BRASIL, 2021).

Apesar dos esforços realizados para o controle da LV, identifica-se a expansão geográfica da doença no território brasileiro (TRENCH et al., 2016; REIS et al., 2017; SEVÁ et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Posto isto, algumas dificuldades na execução das diretrizes do PVC-LV são observadas em grandes municípios

brasileiros, como a descontinuidade das atividades de controle, baixa cobertura da aplicação de inseticida residual e resistência dos tutores de cães com indicação à eutanásia, tornando necessária a reavaliação de estratégias para combate da LV (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016; WERNECK, 2016).

3.7 Estratégias de controle direcionadas para o principal reservatório

Abstraindo-se da prática que os cães infectados desempenham papel essencial na transmissão de *L. infantum* ao homem em áreas urbanas, estratégias de controle eficazes devem ser capazes de diminuir a incidência de infecção nestes animais (WERNECK, 2014). Dentre essas estratégias, a eliminação de cães infectados, correntemente utilizada no Brasil, tem sido uma das mais questionadas, devido aos resultados controversos dos estudos que avaliam sua eficiência (COSTA, 2011).

Neste cenário, a efetividade de medidas de proteção individual para reservatórios domésticos deve ser estudada. Nas últimas décadas, vários candidatos vacinais têm sido propostos (FUJIWARA et al., 2005; LEMESRE et al., 2007; GIUNCHETTI et al., 2008; CARRIÓN et al., 2011; PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; GRADONI, 2015; MARTINS et al., 2015; JAIN; JAIN, 2015).

Dentre as combinações existentes, a formulação com o antígeno A2 recombinante (proteína específica do estágio amastigota de *Leishmania donovani*) (CARVALHO et al., 2002), associado a saponina como adjuvante, é a única registrada atualmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como medida protetiva individual contra LV em cães (BRASIL, 2007). Essa formulação constitui os componentes da Leish-Tec[®], que deve ser administrada em cães com quatro meses ou mais, e o esquema de vacinação primária consiste em três doses, administradas por via subcutânea em intervalos de 21 dias, seguidas de reforços anuais (CEVA, 2022).

A eficácia da Leish-Tec[®] foi avaliada em área endêmica no Brasil em estudo clínico prospectivo. Neste estudo, 46 cães saudáveis foram acompanhados por até um ano, com 92,8% dos animais vacinados permanecendo clinicamente saudáveis, sem sinais clínicos de LV. Além disso, 7,9% dos cães imunizados apresentaram parasitismo no baço, enquanto os animais do grupo controle exibiram taxa de 100% (FERNANDES et al., 2014).

A vacinação com Leish-Tec[®] também foi considerada por reduzir significativamente a infecciosidade de cães para flebotomíneos, com 5,4% dos animais vacinados infectantes para os insetos em comparação com taxa positiva de 36,6% entre cães controle. Entretanto, soroconversão foi demonstrada em 32,6% desses animais, e cerca de 13% dos cães apresentaram efeitos adversos sistêmicos, incluindo apatia, anorexia, dor, claudicação e edema (FERNANDES et al., 2014).

O primeiro ensaio de campo randomizado com a Leish-Tec[®] incluiu aproximadamente 500 cães, distribuídos de forma uniforme para os grupos de vacina e controle. De acordo com os critérios utilizados, observou-se redução significativa de 71,4% no número de casos de LV canina no grupo vacinado. A eficácia foi estimada de acordo com os resultados parasitológicos. O xenodiagnóstico também foi realizado em uma subamostra de cães, a vacinação induziu redução de 46,6% na transmissão de *Leishmania* spp. para os flebotomíneos (REGINA-SILVA et al., 2016).

Em ensaio de campo realizado para avaliar a efetividade da vacina Leish-Tec[®], diferença significativa na incidência de infecção entre os animais vacinados (27%) e controle (42%) foi demonstrada em área endêmica de LV no sudeste do Brasil. A indução de proteção clínica não foi evidente, uma vez que 43% dos animais vacinados desenvolveram a doença ao longo do tempo. Os autores concluíram que a utilização da vacina não tem efeito sobre a redução da incidência de LV canina em área endêmica (GRIMALDI et al., 2017).

Outra abordagem que vêm sendo estudada e utilizada, na interrupção da transmissão de *L. infantum*, é o uso de coleiras impregnadas com inseticidas (deltametrina). As coleiras contêm um sistema de matriz polimérica capaz de liberação contínua de baixa dose do componente ativo no local de contato direto com o pescoço do cão, o que provoca deposição contínua do inseticida na pele (KILLICK-KENDRICK, 1999; DAVID et al., 2001).

Em função da deltametrina ser lipolítica, ela dissolve-se na gordura presente na pele do cão, espalhando-se por todo o corpo do animal e protegendo-o contra picadas (KILLICK-KENDRICK, 1999; DAVID et al., 2001). O efeito das coleiras sobre os flebotomíneos (repelência e morte) ocorre 2-3 semanas após sua colocação, tempo correspondente a disseminação do composto pelo corpo do animal (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001), sendo recomendada a reposição a cada 4 meses (MSD, 2022).

A coleira impregnada com deltametrina foi amplamente validada por sua eficácia protetora contra flebotomíneos em estudos de campo (GAVGANI et al., 2002; REITHINGER et al., 2004; FOGLIA MANZILLO et al., 2006; FERROGLIO; POGGI; TRISCIUOGLIO, 2008; LOPES ET AL., 2018). Em estudos financiados pelo MS para avaliar a efetividade de coleiras impregnadas com inseticidas (deltametrina a 4%, Scalibor®) no controle da LV canina, intervenções comunitárias foram realizadas em áreas endêmicas para LV em municípios do Brasil (KAZIMOTO et al., 2018; ALVES et al., 2020).

Nas áreas controle, as medidas preventivas recomendadas pelo PVC-LV foram implementadas (eutanásia de cães e controle químico), enquanto que nas áreas de intervenção, as coleiras impregnadas com deltametrina foram colocadas em cães domiciliados, além da execução das medidas preventivas acima mencionadas. O monitoramento de infecção canina e substituição de coleiras foram realizados por meio de pesquisas sequenciais em até 24 meses após a pesquisa inicial. O uso das coleiras foi associado à redução de 50% da incidência de casos de LV caninos (KAZIMOTO et al., 2018; ALVES et al., 2020).

Estudos considerando a repercussão do uso de coleiras impregnadas na incidência de casos humanos também já foram desenvolvidos. A partir de um modelo matemático adaptado por Sevá e colaboradores, as coleiras impregnadas com deltametrina foram avaliadas na redução da prevalência de casos humanos e caninos de LV. Este estudo demonstrou que quando as coleiras são usadas, em uma taxa de cobertura de 90%, são capazes de diminuir a prevalência de cães soropositivos e a incidência de casos humanos a zero (SEVÁ et al., 2016).

O impacto que as coleiras impregnadas apresentam na incidência de casos de LV está relacionado à diminuição de fauna flebotomínica em área endêmica. Flebotomíneos foram capturados em quatro bairros com transmissão intensa de LV nos municípios de Fortaleza, Ceará, e Montes Claros, Minas Gerais, ao longo de 30 meses. Esses locais foram definidos anteriormente como áreas de intervenção ou não intervenção com as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em estudos financiados pelo MS (SILVA et al., 2018).

Nesse período, taxas de infestação domiciliar, abundância relativa de *Lu. longipalpis*, distribuição de *Lu. Longipalpis* em cada local, local de captura e área (intervenção e não intervenção) foram calculados. O uso de coleiras impregnadas foi

associado a redução na captura de flebotomíneos em 15% e 60% em Montes Claros e Fortaleza, respectivamente (SILVA et al., 2018).

A escolha e implementação de novas estratégias de controle para LV devem levar em consideração a análise de custo-efetividade dessas medidas, além de dificuldades operacionais para sua implementação. Por meio da utilização de modelos matemáticos, Sevá e colaboradores simularam diferentes cenários de intervenção para realizar um estudo de custo-efetividade, incluindo o uso da vacina Leish-Tec® e coleira impregnada com deltametrina (Scalibor®), ambos com diferentes taxas de cobertura. Os custos foram calculados para cada cenário considerando um período de simulação de quatro anos (SEVÁ; FERREIRA; AMAKU, 2020).

A estratégia mais econômica observada foi o uso das coleiras em animais infectados e não infectados. A vantagem do uso das coleiras, em relação às vacinas, é a não realização de diagnóstico prévio, reduzindo custos e facilitando a implementação. Além disso, a utilização das três primeiras doses consecutivas da vacina apresentou o maior impacto no aumento do custo da estratégia de vacinação (SEVÁ; FERREIRA; AMAKU, 2020).

Em estudo desenvolvido para análise de custo-efetividade sob a ótica do Sistema Único de Saúde (SUS), os custos diretos de três estratégias de controle foram calculados no município de Montes Claros, Minas Gerais. As estratégias foram triagem de infecção canina mais eutanásia, controle químico do vetor e coleiras impregnadas com inseticida (Scalibor®) (ASSIS et al., 2020).

O estudo foi financiado pelo MS para determinar o fornecimento de coleiras impregnadas com inseticida para o controle da LV canina em projeto piloto como mencionado anteriormente. O custo total do programa na área submetida às três estratégias de controle (área de intervenção) foi de aproximadamente R\$300.000 a mais em comparação ao custo das estratégias tradicionais de controle (área controle). A razão de custo-efetividade incremental foi de aproximadamente R\$578 por eutanásia de cão que pode ser evitada (ASSIS et al., 2020).

Vinculado aos estudos de intervenção e custo-efetividade das coleiras, as dificuldades operacionais foram relatadas em estudo desenvolvido em Montes Claros. Dentre os animais encoleirados, a perda de coleiras foi observada em 56% dos cães em um ano. Os autores concluem que as altas frequências de perda de coleiras e de domicílios fechados por ocasião da visita são dificuldades operacionais possíveis de

serem enfrentadas, em caso de adoção pelo PVC-LV do uso dessas coleiras como medida de controle da LV no Brasil (ALVES et al., 2018).

Até 2012, somente as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®) tinham registro no Brasil. Recentemente, outra coleira foi registrada com princípios ativos distintos da Scalibor®. A coleira Seresto®, a base de imidacloprida a 10% e flumetrina a 4,5%, foi licenciada para uso em cães e gatos (STANNECK et al., 2012). Com o surgimento de coleiras com diversas composições químicas, estudos comparativos estão sendo desenvolvidos.

O efeito dessas coleiras foi observado na incidência de infecção por *L. infantum* em dois grupos de cães vacinados por período de um ano. Ao final do estudo, a incidência de *L. infantum* em cães com coleira foi de 5,5% em cães tratados com Seresto® e 20% em cães tratados com Scalibor®, resultando em eficácia global de prevenção de 88,3% para Seresto® e 61,8% para Scalibor® (BRIANTI et al., 2016).

3.8 Fluralaner (Bravecto®)

O fluralaner pertence a uma nova classe de fármacos inseticidas, isoxazolininas, que atuam inibindo o sistema nervoso de artrópodes. Nesta classe, estão incluídos os fármacos afoxolaner, fluralaner, sarolaner e lotilaner. As isoxalozinas atuam sob os canais de cloreto acoplados ao ácido gama aminobutírico (GABA_ARs) e canais acoplados ao L-glutamato (Glu_ARs), apresentando alta seletividade para neurônios de insetos sobre neurônios de mamíferos (GASSEL et al. 2014; LETENDRE et al. 2014; SHOOP et al, 2014; RUFENER et al., 2017).

O fluralaner atua como um antagonista dos canais de cloreto (Cl⁻) ligados ao neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA), que se encontra armazenado em vesículas sinápticas no neurônio pré-sináptico e age inibindo o sistema nervoso central. O fluralaner liga-se aos canais de Cl⁻, bloqueando o influxo de íons de Cl⁻ no neurônio pós-sináptico e conseqüentemente, neutralizando a função inibitória de GABA. Como resultado, ocorre hiperexcitabilidade do sistema nervoso central do inseto, levando a tremores, convulsão e morte (**Figura 3**) (OZOE et al., 2010; GARCÍA-REYNAGA et al., 2013; ASAH I et al., 2014; GASSEL et al., 2014).

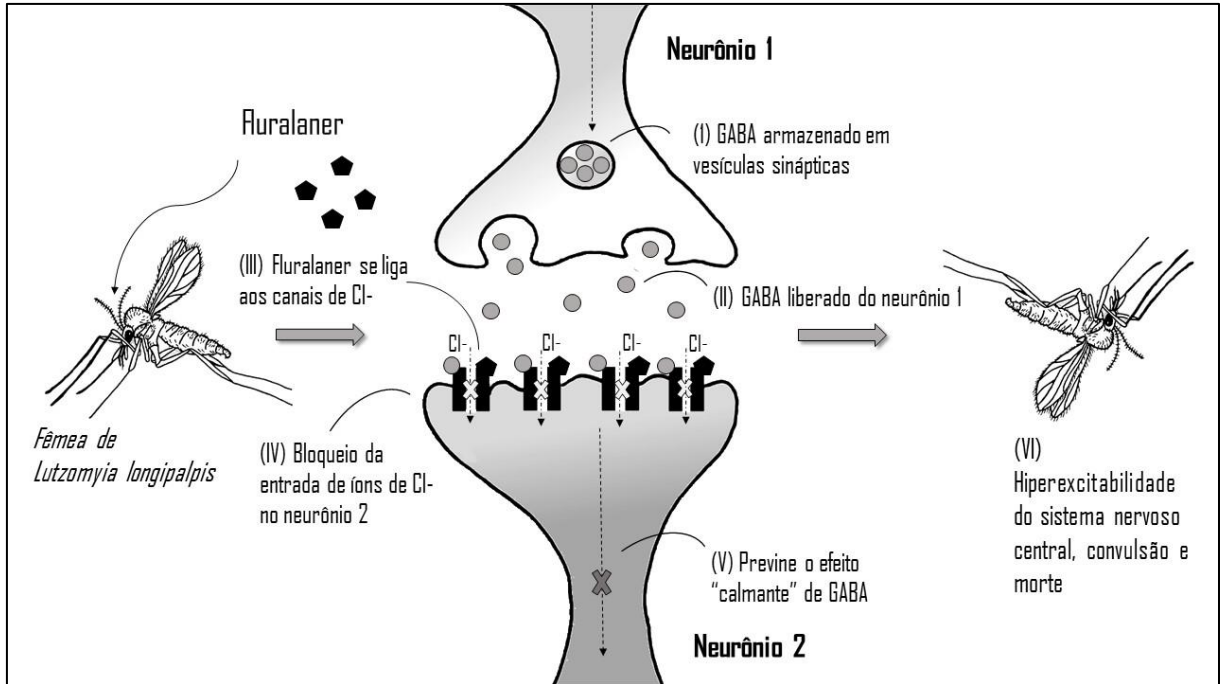


Figura 3 – Mecanismo de ação do fluralaner. Fonte: Adaptado de Gassel et al. (2014).

Estudos farmacocinéticos com fluralaner demonstraram que após a administração de única dose mínima recomendada (25mg/kg de peso corporal) por via oral, a concentração máxima de 3000ng/mL é alcançada em 24 horas, e, progressivamente, há declínio ao longo do tempo, com alguns picos secundários mais baixos, que podem indicar redistribuição ou recirculação (KILP et al., 2014).

Esse fármaco apresenta longo tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de, aproximadamente, 15 dias, e concentrações quantificáveis no plasma por até 112 dias pós-tratamento; além de apresentar, aparentemente, metabolismo mínimo por ser excretado inalterado nas fezes (KILP et al., 2014). Ademais, o fluralaner é rapidamente absorvido em cães em jejum ou alimentados, demonstrando que a ingestão de comida pré-tratamento não causa efeitos sobre sua biodisponibilidade (WALTHER et al., 2014c).

O perfil de segurança do fluralaner foi evidenciado em diferentes trabalhos experimentais, sendo observada a ausência de efeitos adversos em filhotes de oito semanas de idade com administração de até cinco vezes (280mg/kg) a dose máxima permitida (56mg/kg de peso corporal) (WALTHER et al., 2014b).

Atualmente, apenas alguns fatores são conhecidos por afetar o perfil farmacocinético e a penetração cerebral do fluralaner em vertebrados. Um deles é o defeito no gene de resistência a multidrogas (MDR1), frequentemente presente em raças de cães como Collie, Pastor Australiano, Pastor de Shetland, dentre outros

(GRAMER et al., 2011); o que leva ao aumento na penetração do fluralaner no cérebro (MEALEY et al., 2001).

Isso pode provocar toxicidade neurológica em cães mutantes do gene MDR1 mesmo em dosagem padrão, como é bem conhecido por drogas como ivermectina (GEYER; JANKO, 2012). Entretanto, Walther e colaboradores demonstraram a ausência de efeitos adversos em cães da raça Collie deficientes do gene MDR1 que é responsável pela codificação da glicoproteína P, envolvida no transporte de diversas classes de fármacos em diferentes tecidos (WALTHER et al., 2014a).

A forma farmacêutica do Bravecto® é um comprimido mastigável contendo o princípio ativo fluralaner em diferentes concentrações de acordo com o peso (mg/kg) do cão. O início do efeito inseticida é observado entre 8-48 horas após ser administrado a depender das espécies de pulgas, carrapatos ou ácaros (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2018).

Bioensaios realizados com Bravecto® demonstraram sua atuação no controle de pulgas, carrapatos e ácaros em cães após administração por via oral, em dose única mínima (25 mg/kg), sendo o primeiro componente que apresenta atividade inseticida contra pulgas ao longo de 12 semanas (ROHDICH; ROEPKE; ZSCHIESCHE, 2014; TAENZLER et al., 2014; MEADOWS; GUERINO; SUN, 2017; RANJAN; YOUNG; SUN, 2018), e também atua na redução da produção de ovos (DRYDEN et al., 2015).

O composto fluralaner apresenta atividade acaricida contra carrapatos por mais de 12 semanas (ROHDICH; ROEPKE; ZSCHIESCHE, 2014; WENGENMAYER et al., 2014; TOYOTA et al., 2019; ALLEN et al., 2020); além de ser observada ação contra ácaros, com alguns estudos comprovando sua eficácia no tratamento e na contenção dos sintomas da sarna (TAENZLER et al., 2016; FOURIE; MEYER; THOMAS, 2019; CHIUMMO et al., 2020; HOSHINO et al., 2021).

Além das atividades inseticidas evidenciadas e estabelecidas para uso comercial, outros estudos experimentais vêm sendo desenvolvidos com doenças transmitidas por vetores. Ação inseticida sistêmica foi apresentada pelo fluralaner contra espécies de triatomíneos, como *Triatoma infestans* (Klug, 1834), vetor do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas (LOZA et al., 2017; LAIÑO et al., 2019; GÜRTLER et al., 2022; LAIÑO et al., 2022); além das espécies *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (QUEIROGA et al., 2021) e *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (ORTEGA-PACHECO et al., 2022).

Outrossim, o fluralaner demonstrou ação sistêmica contra algumas espécies de flebotomíneos, como *Ph. papatasi* (GOMEZ et al., 2018a; GOMEZ et al., 2018b) e *Ph. perniciosus* (BONGIORNO et al., 2019; BONGIORNO et al., 2022), espécies envolvidas na transmissão de *Leishmania* no Velho Mundo.

3.9 Diagnóstico da leishmaniose visceral

Diversos métodos podem ser aplicados no diagnóstico da LV humana, contudo é de extrema importância a associação entre os dados clínicos, epidemiológicos e os resultados laboratoriais. Os dados clínicos consistem na pesquisa de sinais e sintomas característicos da doença, enquanto os dados epidemiológicos fundamentam-se na coleta de informações sociais, econômicas e ambientais do paciente. Os dados laboratoriais baseiam-se na realização de exames sorológicos específicos, parasitológicos e moleculares (SUNDAR; RAI, 2002; BRASIL, 2017).

Dentre as técnicas laboratoriais realizadas em casos humanos de LV, o padrão-ouro para a confirmação da infecção por *L. infantum* é a visualização do parasito em um esfregaço de tecido, após realização de punção hepática, esplênica, de medula óssea ou de linfonodo. O exame parasitológico apresenta elevada especificidade, no entanto, a sensibilidade varia de acordo com o tecido analisado (SUNDAR; RAI, 2002).

O uso de técnicas imunológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* é bastante disseminado, devido a uma das características marcantes da LV, a presença de hipergamaglobulinemia. As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da LV são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação direta (DAT), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes de imunocromatografia (BADARO; REED; CARVALHO, 1983; BADARO et al., 1986a; BADARO et al., 1996; CARVALHO et al., 2003; SILVA et al., 2005; MACHADO DE ASSIS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2011).

Ensaio baseado em biologia molecular para detectar o ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), também são amplamente utilizados, porém são aplicados usualmente em centros particulares e centros de pesquisas (LEMRANI et al., 2009; SANTOS et al., 2014). A recomendação, definida pelo MS para realizar o diagnóstico de LV humana, é a utilização de punção preferencialmente da medula óssea e, o uso de métodos

auxiliares, como a reação de ELISA com antígenos recombinantes (K26, K39) e o teste imunocromatográfico rápido (BRASIL, 2017).

Em relação ao diagnóstico de LV em cães, os métodos laboratoriais considerados padrão-ouro para confirmação da doença também são abordagens parasitológicas (REGINA-SILVA et al., 2014). A detecção do parasito em tecidos, órgãos ou culturas estabelece o diagnóstico conclusivo de infecção por *L. infantum* em cães (FARIA; ANDRADE, 2012). No entanto, além da possibilidade de resultados falso-negativos devido à baixa sensibilidade, esses métodos diretos são de difícil execução e invasivos (REGINA-SILVA et al., 2014).

Os exames sorológicos recomendados pelo MS para diagnóstico dos cães, até 2011, eram ELISA e RIFI como teste de triagem e confirmatório, respectivamente. A partir de 2012, o MS emitiu uma nota técnica orientando a utilização de teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®-Bio-Manguinhos, como triagem, e ELISA, como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2011b).

Essa nota técnica foi baseada na execução de um estudo multicêntrico, randomizado, cego em painel de soros para realizar a análise combinatória de todos os testes disponíveis no mercado para o diagnóstico de LV canina (BRASIL, 2011a). Dentre os parâmetros avaliados, a realização dos testes sequenciais TR-DPP, como triagem, e ELISA, como confirmatório, apresentou melhor acurácia com valores de sensibilidade e especificidade de 87,88 e 88,53%, respectivamente (BRASIL, 2011a).

O TR-DPP® LVC Bio-manguinhos utiliza-se dos antígenos recombinantes de *L. infantum* (rK39, K26 e k9), fundidos em uma proteína recombinante chamada k28 (PATTABHI et al., 2010). Em estudos desenvolvidos em cães no Brasil, o DPP mostrou-se um teste com sensibilidade e especificidade elevadas, 98% e 96% em animais sintomáticos, respectivamente, entretanto em animais assintomáticos, essa sensibilidade diminuiu para 47% (GRIMALDI et al., 2012).

Em um estudo comparativo de área de alta e baixa prevalência para LV, o DPP apresentou elevada sensibilidade do teste e especificidade controversa. Em área de alta transmissão, o teste não discriminou adequadamente cães infectados por *L. infantum* de cães não infectados (MENDONÇA et al., 2017).

Além dos valores de acurácia, é importante considerar que a realização de um teste rápido, como o TR-DPP, tem diversas vantagens em campo, como a praticidade na realização, a possibilidade de utilizar pequena amostra de sangue total, soro ou plasma e rapidez no resultado (FIGUEIREDO et al., 2018). No que concerne à reação

de ELISA, sensibilidade e especificidade elevadas são observadas, a depender dos antígenos empregados, que incluem principalmente extratos de promastigotas solúveis e proteínas recombinantes ou purificadas (MIRÓ et al., 2008).

Antígenos não purificados são sensíveis para a detecção de casos caninos subclínicos ou clínicos, mas apresentam menor especificidade e podem produzir reação cruzada com outros agentes biológicos, como *T. cruzi*, *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) e *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) (METTLER et al., 2005; FERREIRA et al., 2007; ZANETTE et al., 2014, PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Por outro lado, a reação de ELISA com peptídeos recombinantes é muito específica, porém pode não ter sensibilidade elevada para a detecção de cães infectados clinicamente saudáveis, a depender do antígeno empregado (METTLER et al., 2005; PORROZZI et al., 2007). A utilização de antígenos purificados sintéticos e recombinantes aumenta a acurácia do teste se comparado ao uso de antígenos brutos (PORROZZI et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008).

Embora existam diversos testes sorológicos disponíveis, estes variam nos valores de acurácia (sensibilidade e especificidade) em função da condição clínica do animal e da carga parasitária (SANTOS et al., 2007; MORAIS et al., 2013; COURAVITAL et al., 2014; LOPES et al., 2017). Outro diagnóstico mais amplamente utilizado pelos grupos de pesquisa é o diagnóstico molecular através da técnica de PCR, que detecta parasitismo inferior a um parasito por microlitro, com elevada sensibilidade (MARY et al., 2006; GALLUZZI et al., 2018).

Essa técnica permite a detecção de cães assintomáticos com sensibilidade superior à outras técnicas (MARY et al., 2006; CARVALHO et al., 2018) e a identificação da espécie do parasito (SCHONIAN et al., 2008), porém necessita de equipamento e pessoal especializado, além de apresentar valor mais elevado que a ELISA, impossibilitando o uso na rotina.

A aplicação de testes rápidos e simplificados desempenha um avanço para o diagnóstico da LV. Um método que apresente bom desempenho, combinado com facilidades na sua aplicação, proporciona maior acesso a serviços de diagnóstico da doença, principalmente, em áreas endêmicas (FIGUEIREDO et al., 2018).

3.10 Uma alternativa diagnóstica: bioespectroscopia e quimiometria

A espectroscopia é tradicionalmente usada para a identificação de componentes moleculares em substâncias desconhecidas. Nos últimos anos, esta tem sido amplamente utilizada na detecção e quantificação de biomoléculas presentes em células e tecidos em estudos biológicos, sendo reconhecida como bioespectroscopia (STUART, 2005; GRIFFITHS; HASETH; 2007; KELLY et al., 2011).

A interação entre a radiação eletromagnética e a matéria é bastante explorada em técnicas analíticas. Uma das técnicas que se baseia nesse fenômeno é a espectroscopia do infravermelho. Compreende-se como uma técnica de espectroscopia vibracional baseada em absorção molecular na qual a energia, quando absorvida por uma determinada molécula, promove transições vibracionais e rotacionais. Dentre as faixas do espectro eletromagnético, o infravermelho é dividido em três faixas características: infravermelho próximo, médio e distante, as quais estão contidas na faixa de $14000\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009; SMITH, 2011).

A maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações envolvem a região espectral do infravermelho médio (IVM) ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), a qual apresenta particular interesse para as aplicações biológicas. Grande parte das análises de identificação de biomoléculas é efetuada na região denominada de impressão digital (*fingerprint*). Nesta faixa, os espectros mostram picos de absorção relacionados a uma série de estruturas biológicas (STUART, 2005; GRIFFITHS; HASETH; 2007; KELLY et al., 2011).

Na análise de estruturas biológicas, duas regiões espectrais do IVM apresentam importância: as regiões de dupla ligação e de impressão digital biológica. A região de dupla ligação ($2000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) está associada ao alongamento de átomos de carbono (C), nitrogênio (N) e oxigênio (O), C=C, C=N e C=O. A região de impressão digital biológica ($1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) identifica torções e vibrações moleculares. As informações bioquímicas, associadas a essa região, representam estrutura e função de componentes biológicos baseados nas bandas de vibração (CHIRIBOGA; YEE; DIEM, 2000; MARTIN et al., 2010; KELLY et al., 2011).

Esta análise fornece informações específicas de constituintes biológicos, como: carboidratos (1155 cm^{-1}), lipídeos (1750 cm^{-1}), proteínas (amida I, II e III: 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , respectivamente), DNA (1225 cm^{-1}) e RNA (1080 cm^{-1}) (**Figura**

4) (POTIER, 2004; KELLY et al., 2011; OBINAJU; MARTIN, 2013). Os espectros na região do infravermelho médio podem ser obtidos por meio de diferentes metodologias, como o Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Raman, Microespectroscopia Foto térmica e ainda Reflexão Total Atenuada (ATR) com FTIR (ATR-FTIR) (KELLY et al., 2011).

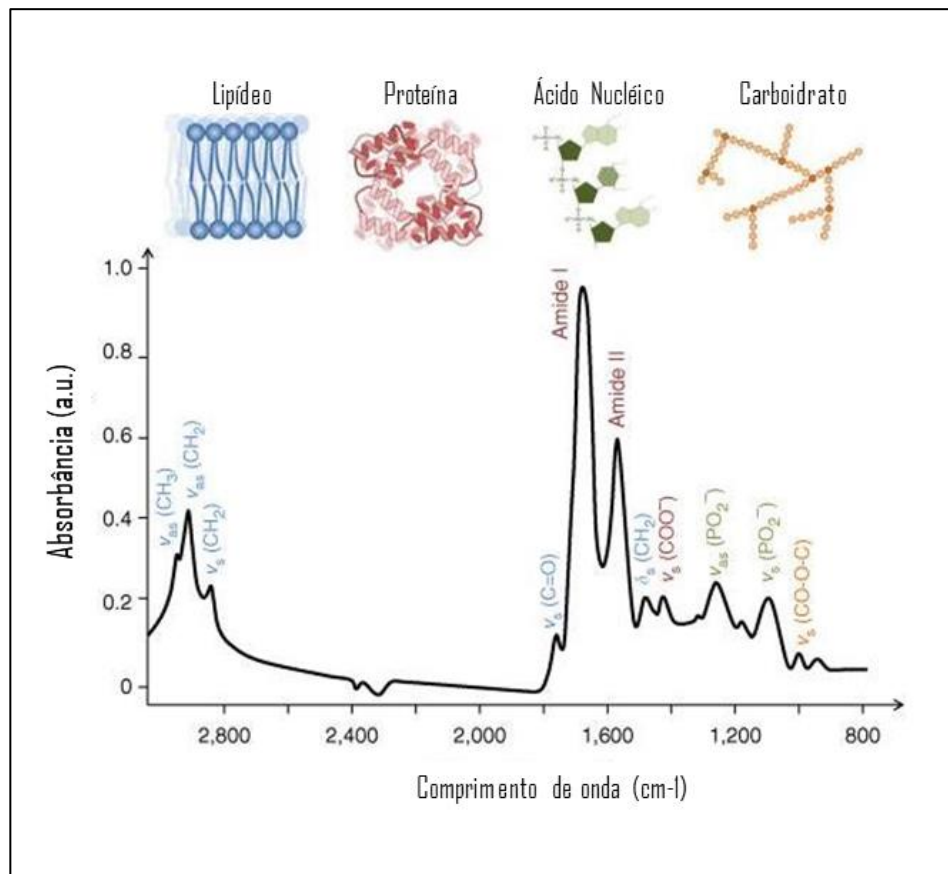


Figura 4 – Espectro do infravermelho médio mostrando a faixa de impressão digital biológica.
Fonte: Adaptado de Baker et al. (2014).

O ATR-FTIR é uma técnica não destrutiva que exerce enorme atração na área biológica, pois permite obter de forma rápida uma impressão bioquímica da amostra sob investigação, fornecendo informações sobre sua principal molécula conteúdo (KAZARIAN; CHAN, 2006; AMI; MEREGHETTI; MARIA, 2013; GLASSFORD; BYRNE; KAZARIAN, 2013).

A técnica baseia-se na aquisição de espectros quando um feixe de radiação infravermelha (IV) incide em um cristal de alto índice de refração, com um ângulo crítico específico, ocorrendo reflexão interna total na interface entre dois meios. A radiação, na realidade, penetra determinada distância no meio menos denso

(amostra). Essa radiação, denominada onda evanescente, pode ser parcialmente absorvida, colocando-se uma amostra em contato com o meio mais denso (mais comumente, diamante, germânio ou seleneto de zinco) (STUART, 2005; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009; SMITH, 2011).

Dessa forma, a onda evanescente pode ser absorvida nos comprimentos de onda em que o material absorve e, como consequência, a radiação refletida terá sua intensidade atenuada nesses comprimentos de onda. Sendo assim, o espectro de infravermelho é o resultado do registro dos comprimentos de onda em que a radiação foi atenuada. O efeito de reflexão ocorre várias vezes ao longo do cristal, e em seguida é quantificada por um detector (**Figura 5**) (STUART, 2005; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009; SMITH, 2011).

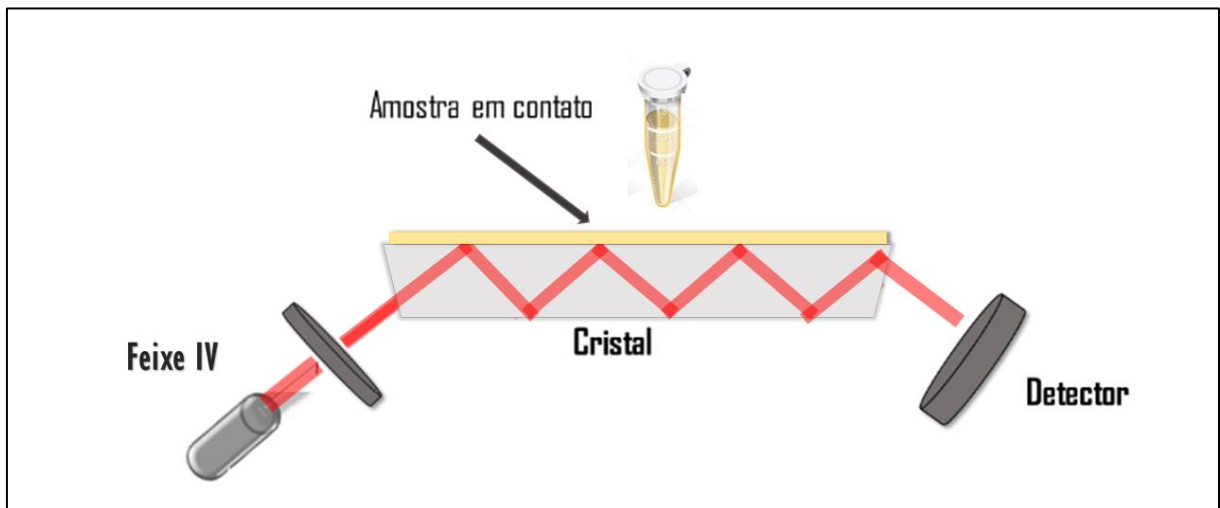


Figura 5 – Representação esquemática de análise bioespectroscópica utilizando ATR-FTIR. A proporção entre as imagens é meramente ilustrativa. Fonte: Adaptado de Ausili; Sánchez; Gómez-Fernández (2015).

Os espectros de FTIR em sistemas biológicos são muito complexos, consistindo na absorção sobreposta das principais biomoléculas. Dessa forma, a aplicação de métodos computacionais adequados é necessária, que possibilitam o correto entendimento do conjunto de dados (AMI; MEREGHETTI; MARIA, 2013).

Posteriormente à aquisição espectral, estudar os dados amostrais é imprescindível para remover informações que não estão associadas com a amostra analisada, realizando o pré-processamento dos dados, que é de fundamental importância para eliminar ou atenuar a flutuação destes (KOWALSKI; BEEBE, 1987). Esse pré-processamento inclui ajustes e correções que se referem a interferências

externas, como ruídos (suavização), desvios na fonte de luz (correção de linha de base), e para selecionar as regiões de interesse (corte na região de impressão digital biológica) (JAIN; DUIN, 2000).

A avaliação desses dados não se trata apenas da análise de dados espectrais (informação primária), mas também da criação de informações secundárias, como o desenvolvimento de modelos de calibração e classificação, de forma que seja possível prever o comportamento de outros dados acrescentados ao modelo criado e conhecer suas características (GASTEIGER; ENGEL, 2003).

Para auxiliar na classificação amostral e redução na dimensionalidade das informações químicas, ferramentas matemáticas foram desenvolvidas, e representam importantes componentes da quimiometria (HIBBERT, 2016) e análise multivariada de dados (JOHNSON; NAIKER, 2019). A quimiometria é a ciência que usa métodos matemáticos e estatísticos para relacionar medidas, realizadas em um sistema ou processo químico, ao estado do sistema (IUPAC, 2008). Os métodos de análise multivariada, em geral, são os métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas variáveis em cada objeto investigado (HERAUD; TOBIN, 2009). Na análise multivariada, os dados podem ser analisados por diferentes ferramentas de estudo, podendo ser utilizados métodos não supervisionados e supervisionados (DAVIS; MAUER, 2010).

Dentre os métodos de análise não supervisionada, a Análise dos Componentes Principais (PCA) é destacada como uma função matemática fundamental para detecção de padrões e redução de dimensionalidade de dados (ABU-MOSTAFA; MAGDON-ISMAIL; LIN, 2012). Em contrapartida, as funções matemáticas como Algoritmo de Projeções Sucessivas (SPA) e Algoritmo genético (GA), e técnicas de classificação como Máquina de Vetores de Suporte (SVM) e Análise de Discriminante Linear (LDA) são destacadas como ferramentas supervisionadas de análise (McCALL, 2005, SOARES et al., 2013).

O SPA e o GA são funções matemáticas que, baseadas em diferentes princípios, selecionam regiões espectrais contínuas localizadas entre intervalos específicos de números de onda. O SPA é baseado na redução do problema da colinearidade, ou seja, elimina informações redundantes (ARAÚJO et al., 2001; SOARES et al., 2013); o GA simula matematicamente os mecanismos da “Teoria da Evolução das Espécies” de Charles R. Darwin, atingindo população de variáveis com

função de aptidão mais alta, os números de onda presentes nesta população serão aqueles selecionados pelo GA (McCALL, 2005; AHN, 2006).

A LDA é uma técnica de classificação que visa discriminar classes com base nas características das amostras de cada classe, usando uma função linear. Os critérios para discriminação por LDA são formulados para maximizar a dispersão entre classes e minimizar a dispersão dentro da classe, para que o LDA possa prever qual classe pertence a uma amostra particular (PARK; PARK, 2008; SHARMA; PALIWAL, 2014).

O SVM é responsável por encontrar a melhor fronteira de separação entre classes para um determinado conjunto de dados que sejam linearmente separáveis. A ideia principal é construir um hiperplano como superfície de decisão de tal forma que a margem de separação entre exemplos positivos e negativos seja máxima (BARZILAY; BRAILOVSKY, 1999; WIDODO; YANG, 2007). Em caso de aplicar SVM a problemas não lineares, um núcleo (kernel) pode ser associado, o qual atua sobre o problema não linear original e o transforma em um problema linear dentro do espaço de dimensão superior. Na análise supervisionada, o kernel de função de base radial (RBF) é uma função popular usada em vários algoritmos de aprendizado (CHANG et al., 2010).

Considerando essas análises, a bioespectroscopia associada à quimiometria pode oferecer uma maneira de detectar infecções por microrganismos de forma precisa. Essa metodologia tem sido utilizada para identificação eficiente de infecções virais (LIMA et al., 2014; SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2020), fúngicas (SANTOS et al., 2010; TAHA et al., 2013; WEHBE; VEZZALINI; CINQUE, 2018), bacterianas (SCHIMITT e FLEMMING, 1998; ZARNOWIEC et al., 2015; FENG et al., 2020), e diferenciação de espécies de *Leishmania* em cultura (AGUIAR et al., 2015; HORNEMANN et al., 2017; AGUIAR et al.; 2018).

4 CAPÍTULO 1

O presente capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista *Parasites & Vectors*, doi: 10.1186/s13071-020-04489-1, qualis A1, traduzido para o vernáculo, como definido pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Fluralaner (Bravecto®) induz mortalidade a longo prazo em *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cães tratados

Tamyres Bernadete Dantas Queiroga¹, Henrique Rafael Pontes Ferreira², Wilo Victor dos Santos², Ana Beatriz Lourenço de Assis², Vicente Toscano de Araújo Neto¹, Antônia Cláudia Jácome da Câmara³, João Ciro Fagundes Neto⁴, Romeika Karla dos Reis⁵, Manuela Sales Lima Nascimento⁶, Renata Antonaci Gama⁶, Paulo Marcos Matta Guedes^{6*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

⁴Centro de Controle de Zoonoses, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

⁵Clínica Veterinária Canis e Catus, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

⁶Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

*Autor para correspondência: pauloguedes@cb.ufrn.br

RESUMO

Leishmania infantum é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo, onde a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e os cães domésticos são considerados os principais vetores e reservatórios, respectivamente. Inseticidas sistêmicos têm sido estudados como alternativa para o controle de doenças transmitidas por vetores, incluindo a LV. Fluralaner, composto pertencente a classe das isoxazolinias, é um inseticida sistêmico utilizado em cães com eficácia comprovada contra diferentes espécies de flebotomíneos. Entretanto, nenhum estudo demonstrou a eficácia de fluralaner sobre a espécie *Lu. Longipalpis* até o momento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito inseticida de fluralaner (Bravecto®) em *Lu. longipalpis* após repasto sanguíneo em cães tratados. Para isso, cães sem raça definida (n = 8) foram recrutados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, e randomizados em dois grupos: tratados com

fluralaner (n = 4) e controle não tratado (n = 4). Espécimes fêmeas de *Lu. Longipalpis*, criadas em colônia (n = 20), foram posicionadas para se alimentarem em todos os cães por 40 minutos antes do tratamento (para cães tratados com fluralaner), no dia 1 após o tratamento e, então mensalmente, até um ano após o tratamento. No grupo tratamento, 100% de mortalidade de *Lu. longipalpis* foi observada por até cinco meses após o início do tratamento, diminuindo para 72,5% após seis meses. A eficácia de fluralaner variou de 100% no dia 1 ($p = 0.0002$) a 68% ($p = 0.0015$) em seis meses, diminuindo para 1,4% em um ano após o tratamento. A mortalidade dos flebotomíneos, alimentados em cães controle não tratados, permaneceu constante $\leq 15\%$. Em conjunto, nossos resultados sugerem que fluralaner pode ser usado como uma estratégia de controle para LV em áreas endêmicas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Fluralaner. Bravecto®. Inseticida sistêmico. *Lutzomyia longipalpis*. Flebotomíneo. Cão.

ABSTRACT

L. infantum is the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the New World, where the sand fly *Lu. longipalpis* and domestic dogs are considered the main vector and host reservoirs, respectively. Systemic insecticides have been studied as an alternative to control vector-borne diseases, including VL. Fluralaner, an isoxazoline class compound, is a systemic insecticide used in dogs, with proven efficiency against different species of phlebotomine sand flies. However, to date no studies have demonstrated the efficacy of fluralaner on *Lu. longipalpis*. The aim of this study was to evaluate the insecticidal effect of fluralaner (Bravecto®) on the sand fly *Lu. longipalpis* after blood meal in treated dogs. Healthy mongrel dogs (n = 8) were recruited from the Zoonoses Control Center in the city of Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, and randomized into two groups: fluralaner treated (n = 4) and non-treated control (n = 4). Colony-reared female specimens of *Lu. longipalpis* (n = 20) were allowed to feed on all dogs for 40 min before treatment (for fluralaner-treated dogs), at day 1 after treatment and then monthly until 1-year post-treatment. In the treatment group, there was 100% mortality of *Lu. longipalpis* for up to 5 months after treatment initiation, decreasing to 72.5% at 6 months post-treatment initiation. The efficacy of fluralaner ranged from 100% at day 1 ($P = 0.0002$) to 68% ($P = 0.0015$) at 6 months, decreasing to 1.4% at 1-year post-treatment. Sand fly mortality carried out blood meal in non-

treated control dogs remained constant at $\leq 15\%$. Taken together, our results suggest that fluralaner may be used as a control strategy for VL in endemic areas.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Fluralaner. Bravecto®. Systemic insecticide. *Lutzomyia longipalpis*. Sand fly. Dog.

4.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *L. infantum* e é considerada um problema de saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica, alto número de casos estimados anualmente (50.000-90.000) e elevada taxa de mortalidade, observada principalmente em crianças desnutridas, idosos e pacientes com coinfeção *Leishmania*-vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nas Américas, a LV é endêmica em 13 países, com aproximadamente 97% dos novos casos reportados pelo Brasil (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010; PAHO, 2021; WHO, 2022).

Os cães são o principal reservatório doméstico e desempenham papel importante na manutenção do ciclo da doença, devido à alta prevalência de infecção por *L. infantum*, a presença de formas amastigotas na pele e a proximidade com os seres humanos (BRAGA et al., 1986; BANETH; SHAW, 2002; ALVAR et al., 2004; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Por isso, os cães são considerados alvos estratégicos para o controle da doença.

A principal via de transmissão de *L. infantum* é por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1999). *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *L. infantum* nas Américas (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Esta espécie de flebotomíneo é amplamente distribuída na maioria dos estados brasileiros e tem se mostrado altamente adaptável ao ambiente urbano (FRANÇA-SILVA et al., 2005; MICHALSKY et al., 2009; DIAS et al., 2011; BRAZIL, 2013).

As ações de controle utilizadas, atualmente, e direcionadas ao vetor e seu principal reservatório parecem apresentar impacto ínfimo na incidência de casos de LV humana e canina devido a várias limitações; incluindo a ineficiência de métodos diagnósticos, ausência de tratamento que elimine o parasito e/ou falta de vacina eficaz

para prevenir a infecção em humanos e cães (COURTENAY et al., 2002; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Estudos anteriores têm explorado o uso de inseticidas sistêmicos como medida de controle. Recentemente, alguns estudos vêm concentrando-se em uma nova classe de fármacos, as isoxazolininas (fluralaner, afoxolaner, saxolaner, lotilaner), que são licenciadas para uso veterinário para proteger contra pulgas, carrapatos e ácaros por meio da inibição do sistema nervoso de artrópodes (GASSEL et al., 2014; LETENDRE et al., 2014; SHOOP et al., 2014; RUFENER et al., 2017).

Entre essa classe de fármacos, o composto fluralaner fornece a proteção mais prolongada de aproximadamente 12 semanas (ROHDICH; ROEPKE; ZSCHIESCHE, 2014; TAENZLER et al., 2014; FOURIE et al., 2015). Fluralaner atua como um antagonista dos canais de cloreto acoplados ao ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo a entrada de íons de cloreto no neurônio pós-sináptico, levando à hiperexcitabilidade do sistema nervoso central do inseto (GASSEL et al., 2014); e apresenta um longo tempo de meia-vida *in vivo* (KILP et al., 2014).

Fluralaner demonstrou ser seguro em cães (WALTHER et al., 2014b) e tem seletividade significativa para os neurônios de insetos em relação aos de mamíferos (OZOE et al., 2010). Estudos experimentais com fluralaner demonstraram atividade inseticida em curtos períodos contra *Triatoma infestans*, o vetor de *Trypanosoma cruzi* (o agente etiológico da doença de Chagas) (LOZA et al., 2017), e contra algumas espécies de flebotomíneos, como *Phlebotomus papatasi* (GOMEZ et al., 2018a; GOMEZ et al., 2018b) e *Phlebotomus perniciosus* (BONGIORNO et al., 2019).

No entanto, não existe estudo demonstrando a ação de fluralaner em *Lu. longipalpis*, o principal vetor de LV no Novo Mundo, até o momento. Neste estudo, avaliamos a atividade inseticida sistêmica de única dose oral de fluralaner contra *Lu. longipalpis* após repasto sanguíneo em cães, baseado em ensaios mensais da atividade de *Lu. longipalpis* durante o período de um ano.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Recrutamento e manutenção dos cães

Os cães foram obtidos pelo CCZ da cidade do Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Com a permissão do CCZ, oito cães sem raça definida (n = 8; proporção de 1:1

de machos e fêmeas), pesando entre 20 e 40kg com idade entre 4 e 10 anos, foram recrutados e mantidos em canis individuais. Eles receberam água *ad libitum* e ração correspondente a 5% do peso corporal e foram observados rotineiramente.

Nenhum tratamento inseticida foi utilizado nos canis ou nos cães durante os ensaios, e os animais foram banhados com xampu neutro duas semanas antes de cada ensaio. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) sob o número de protocolo 136.061/2018 (**Anexo A**).

4.2.2 Manutenção da colônia de flebotomíneos

Uma colônia de flebotomíneos foi estabelecida no Laboratório de Insetos e Vetores (LIVE) da UFRN, a partir de ovos de *Lu. longipalpis* (doado pelo Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil). A colônia foi mantida sob condições padrão (75-80% de umidade relativa, 26-27°C, 12:12h em ciclo claro-escuro). Mistura homogênea fermentada foi utilizada para alimentação das larvas, consistindo em ração para camundongos triturada, fezes de coelho secas e terra vegetal (VOLF; VOLFOVA, 2011).

4.2.3 Desenho do estudo

Cães clinicamente saudáveis foram randomizados em dois grupos: um grupo tratado com fluralaner (n = 4) e um grupo controle não tratado (n = 4), sendo cada grupo composto por dois machos e duas fêmeas. A randomização ocorreu por meio do lançamento de uma moeda na presença de um observador. O grupo tratado recebeu dose oral única de fluralaner (Bravecto[®]; MSD Saúde Animal, Merck Sharp & Dohme) no mesmo dia da randomização, seguindo as recomendações do fabricante.

Os ensaios de repasto de flebotomíneos foram realizados em ambos os grupos 1h antes do tratamento com fluralaner, e nos dias 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 após o tratamento para avaliar a mortalidade. As avaliações foram mensais até completar o período de um ano. Espécimes fêmeas de *Lu. longipalpis*, entre cinco e seis dias após emergir, foram usadas sem alimentação com sangue ou açúcar (12h antes do experimento).

Os cães foram gentilmente contidos por veterinários treinados e posicionados em decúbito dorsal para uma posição mais confortável. Essa etapa foi seguida pela colocação de um pote (plástico, cilíndrico, perfurado, coberto com uma rede e com tampa) na região ventral de cada cão, contendo 20 espécimes fêmeas/5-10 machos de *Lu. longipalpis*, que foram permitidos alimentar por 40 minutos (**Figura 1A**).

Após os ensaios, os flebotomíneos foram mantidos em um insetário sob condições padrão (75-80% de umidade relativa, 26-27°C e 12:12h em ciclo claro-escuro), e os insetos foram alimentados com algodão embebido em uma solução saturada de glicose (**Figura 1B**). Espécimes fêmeas foram monitoradas por 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o repasto sanguíneo para registrar o número de mortes, determinada pela falta de movimento (**Figura 1C**). Os ensaios foram realizados entre novembro de 2018 e novembro de 2019, não sendo constatada a presença de efeitos adversos entre os cães tratados com fluralaner durante o estudo.

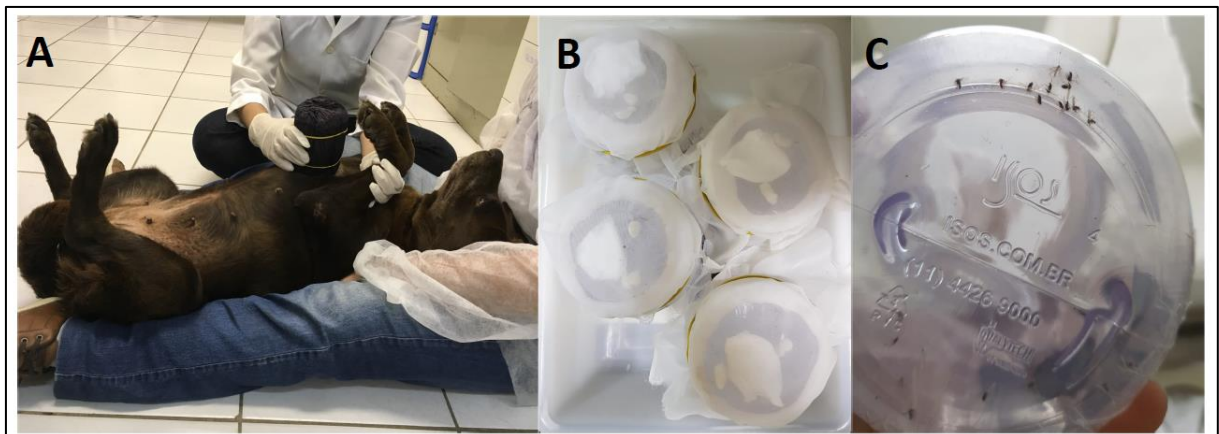


Figura 1 – Ensaios de repasto sanguíneo. *Lu. longipalpis* realiza repasto diretamente em cães tratados com fluralaner. Um pote de plástico cilíndrico coberto com uma rede foi posicionado na região ventral do cão por 40 minutos, contendo 20 espécimes de *Lu. longipalpis* fêmeas/5-10 machos (A). Os insetos foram alimentados com algodão embebido em solução saturada de glicose, mantidos e monitorados em insetário em condições padrão por 24, 48, 72, 96 e 120h pós-repasto sanguíneo para determinar a taxa de mortalidade (B). Espécimes mortas de *Lu. longipalpis* após o período de observação (C) (Fonte: QUEIROGA et al., 2020).

4.2.4 Análises estatísticas

A eficácia inseticida de fluralaner em flebotomíneos foi avaliada usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925). A eficácia foi medida comparando o número de insetos fêmeas mortas após o repasto sanguíneo no grupo tratado e não tratado, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia (\%)} = \left(1 - \frac{n \text{ em T pós-tratamento}}{n \text{ em C pós-tratamento}}\right) \times 100$$

Onde n é a população de flebotomíneos, T é o grupo tratado (cães) e C é o grupo controle (cães). As diferenças entre os grupos foram determinadas usando o teste exato de Fisher em cada dia de teste experimental (GOMEZ et al., 2018a).

Os testes de mortalidade de flebotomíneos foram bicaudais e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As análises de sobrevivência foram conduzidas usando o método de Kaplan-Meier em cada dia de ensaio até 120h após o repasto. As análises foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (Brasil).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Ensaios de mortalidade em cães tratados e não tratados com fluralaner

Todas as fêmeas de *Lu. longipalpis* utilizadas nos ensaios ficaram ingurgitadas com 100% de sucesso na alimentação. Após a administração de única dose oral de fluralaner em cães durante o estudo de acompanhamento de um ano, 100% de mortalidade de fêmeas de *Lu. longipalpis* foi observado em até 150 dias após o tratamento (**Figura 2**).

Após o quinto mês, os níveis de mortalidade começaram a decair com o decorrer do tempo de tratamento, para 72,5% no dia 180 pós-tratamento, 62,5% no dia 210 pós-tratamento, 61,2% no dia 240 pós-tratamento, 50% no dia 270 pós-tratamento, 42,5% no dia 300 pós-tratamento, 23,7% no dia 330 pós-tratamento e 15% no dia 360 pós-tratamento (**Figura 2**).

A mortalidade dos flebotomíneos, após repasto sanguíneo em cães tratados, foi maior que no grupo de cães não tratados até o dia 300 pós-tratamento. No entanto, a mortalidade foi semelhante entre os grupos nos dias 330 e 360 pós-tratamento (**Figura 2**). A mortalidade dos flebotomíneos, alimentados com sangue de cães do grupo controle, foi sempre menor ou igual a 15%, variando de 12,5–15%, até 120 horas após o repasto (**Figura 2**).

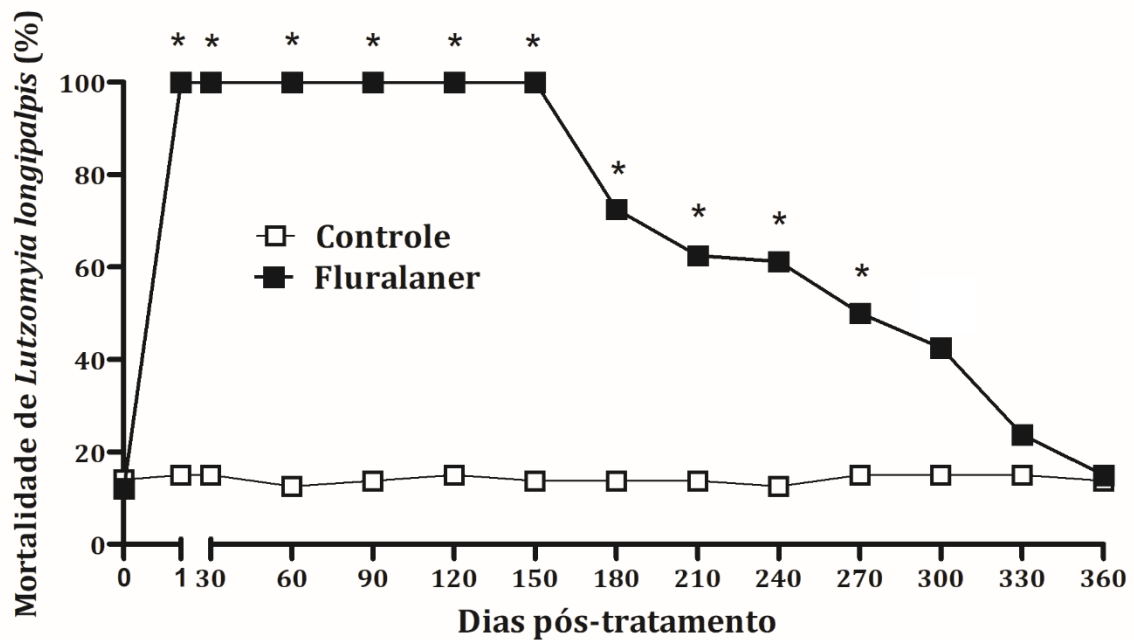


Figura 2 – Mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* (%) após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner e cães não tratados. A mortalidade de *Lu. longipalpis* (n = 20) foi avaliada após única dose oral de Bravecto® nos dias 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360. Os dados são representativos de testes bicaudais e o teste exato de Fisher foi utilizado. *, p <0,05.

As análises da mortalidade de *Lu. longipalpis* foram realizadas em cada ensaio até 120h após o repasto sanguíneo nos cães. No primeiro dia pós-tratamento, 100% dos flebotômíneos morreram 24h após realizar a alimentação nos cães tratados (**Figura 3**). Após o primeiro dia pós-tratamento, o tempo para atingir 100% de mortalidade foi aumentando gradualmente para 48h no dia 30 pós-tratamento, 96h no dia 60 pós-tratamento, 96h no dia 90 pós-tratamento, 120h no dia 120 pós-tratamento e 120h no dia 150 pós-tratamento. Fluralaner proporcionou mortalidade sustentada em 100% por até cinco meses e em até 120h pós-ensaios (**Figura 3**).

Os resultados da mortalidade, observados em até 120h, foram 72,5% no dia 180 pós-tratamento, 62,5% no dia 210 pós-tratamento, 61,2% no dia 240 pós-tratamento, 50% no dia 270 pós-tratamento, 42,5% no dia 300 pós-tratamento, 23,7% no dia 330 pós-tratamento e 15% no dia 360 pós-tratamento (**Figura 3**).

4.3.2 Análise de eficácia de fluralaner

Os cães tratados com fluralaner apresentaram eficácia inseticida significativamente maior entre o dia 1 pós-tratamento ($p = 0,0002$) e o dia 150 (p

<0,0001), com eficácia inseticida mantida em 100%. Em comparação com o acompanhamento subsequente, houve redução da eficácia para 68,1% no dia 180 pós-tratamento ($p = 0,0015$), 56,5% no dia 210 pós-tratamento ($p = 0,0049$), 55,7% no dia 240 pós-tratamento ($p = 0,0022$) e 41,2% no dia 270 pós-tratamento ($p = 0,0171$) (**Tabela 1**).

Nenhuma diferença significativa na eficácia inseticida foi observada no grupo tratado com fluralaner nos dias 300, 330 e 360 pós-tratamento em comparação com o grupo controle (**Tabela 1**). As análises de Kaplan-Meier 120h após o repasto sanguíneo, com o intervalo de confiança de 95% (IC 95%), por grupo e dia de amostragem são relatadas na Tabela 1; o conjunto de dados completo pós-repasto (24, 48, 72, 96, 120h) é fornecido no apêndice B: Tabela 2. Em conjunto, esses resultados mostram que o tratamento de cães com fluralaner é eficaz contra *Lu. longipalpis* até 270 dias após o tratamento.

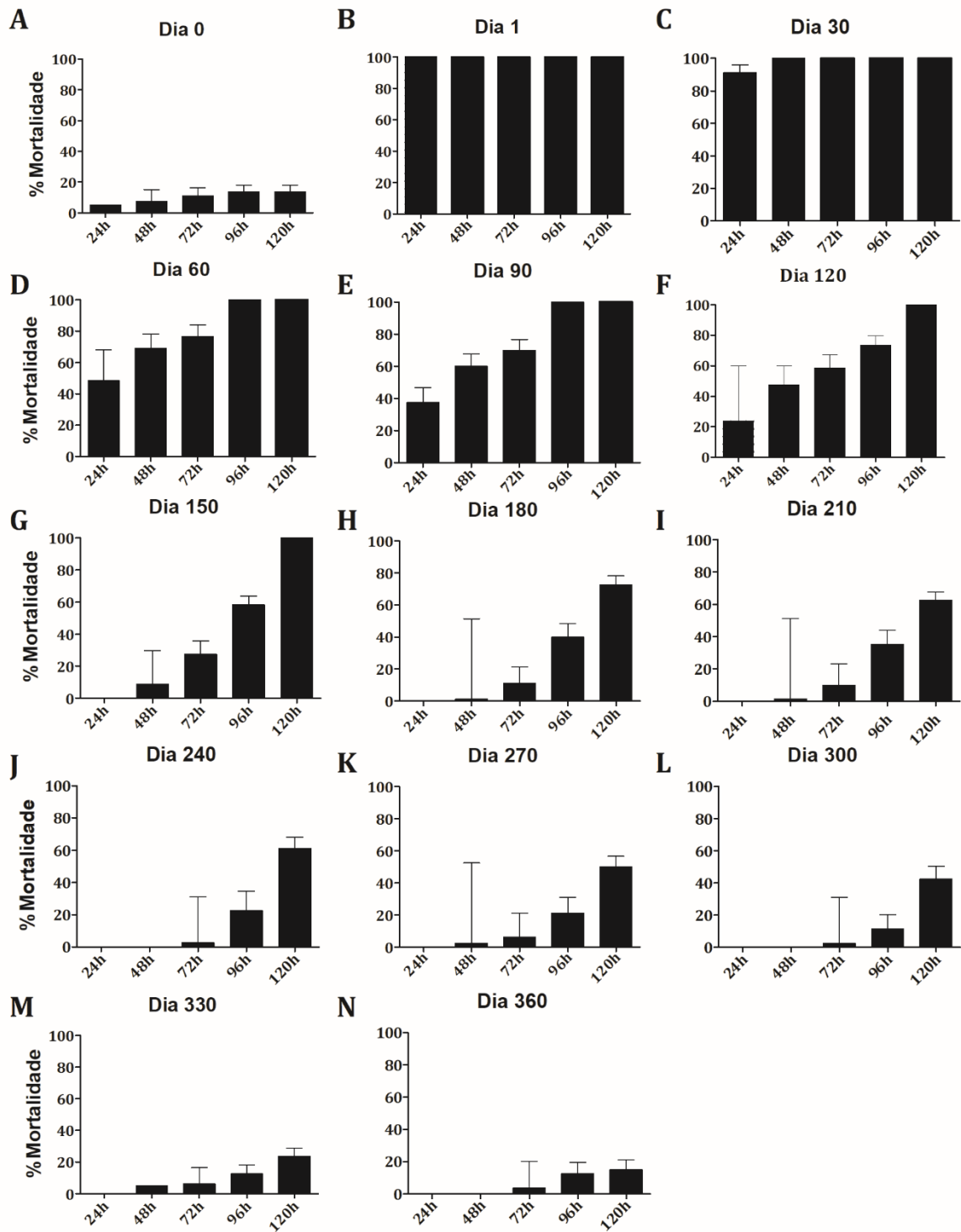


Figura 3 – Mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* por até 120h após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner (Bravecto®). Proporção (%) de espécimes de *Lu. longipalpis* (n = 20) que morreram dentro de 24, 48, 72, 96 e 120h após repasto sanguíneo em cães tratados (n = 4) nos dias 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 pós-tratamento.

Tabela 1 – Acompanhamento da mortalidade de *Lutzomhyia longipalpis* e eficácia inseticida após repasto sanguíneo em cães por até 12 meses (360 dias) pós-tratamento com dose oral única de fluralaner

Dias pós-tratamento	Controle		Fluralaner		Eficácia (%) ^c	p ^d
	Mortalidade (%) ^a	IC 95% ^b	Mortalidade (%) ^a	IC 95% ^b		
1	12 (15)	0.77-0.92	80 (100)	NA ^e	100	0.0002*
30	12 (15)	0.77-0.92	80 (100)	NA	100	0.0002*
60	10 (12.5)	0.80-0.94	80 (100)	NA	100	<0.0001*
90	11 (13.75)	0.78-0.93	80 (100)	NA	100	<0.0001*
120	12 (15)	0.77-0.92	80 (100)	NA	100	0.0002*
150	11 (13.75)	0.78-0.93	80 (100)	NA	100	<0.0001*
180	11 (13.75)	0.77-0.92	58 (72.5)	0.17-0.37	68.1	0.0015*
210	11 (13.75)	0.78-0.93	50 (62.5)	0.26-0.48	56.5	0.0049*
240	10 (12.5)	0.80-0.94	49 (61.25)	0.28-0.49	55.7	0.0022*
270	12 (15)	0.77-0.92	40 (50)	0.39-0.60	41.2	0.0171*
300	12 (15)	0.77-0.92	34 (42.5)	0.46-0.68	32.3	0.0590
330	12 (15)	0.77-0.92	19 (23.75)	0.66-0.85	10.3	0.3001
360	11 (13.75)	0.78-0.93	12 (15)	0.77-0.92	1.4	1.0000

^aMortalidade: número de flebotomíneos mortos no período especificado. Apresentado como o número de flebotomíneos mortos com a porcentagem em parênteses [(fêmeas mortas após repasto sanguíneo/número total de fêmeas alimentadas com sangue) × 100];

^bIC 95%: intervalo da probabilidade de sobrevivência no período especificado calculado usando o método de Kaplan-Meier;

^cEficácia: porcentagem da mortalidade dos flebotomíneos após a exposição ao inseticida usando a fórmula de Abbott;

^dp: Significância da diferença na mortalidade de flebotomíneos entre o grupo controle e o grupo fluralaner usando o teste exato de Fisher. *p ≤ 0,05;

^eNA: Não se aplica. As amostras apresentaram taxa de mortalidade de 100%.

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi observado que única dose oral de fluralaner induz a mortalidade de *Lu. longipalpis* com eficácia inseticida mantida em até 270 dias após o tratamento em cães. Nos cães tratados, o tratamento com fluralaner apresentou eficácia de 100% em fêmeas de flebotomíneos durante os cinco primeiros meses após o tratamento, diminuindo para 68,1% em seis meses. Esses resultados sugerem que fluralaner pode ser uma ferramenta promissora para o controle de flebotomíneos e,

consequentemente, controle da LV em áreas endêmicas, possivelmente pela administração do composto a cada cinco meses.

A mortalidade de 100% de *Lu. longipalpis*, dentro de 120h após o repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner, foi observada por até 150 dias após o tratamento. A suscetibilidade ao fluralaner foi determinada em outras espécies de flebotomíneos, como *Ph. papatasi* e *Ph. perniciosus* (GOMEZ et al., 2018a; BONGIORNO et al., 2019). Uma pesquisa, realizada por Gomez e colaboradores, registrou mortalidade de 100, 96, 89 e 42% em *Ph. papatasi* (24h após repasto sanguíneo diretamente em cães) nos dias 3, 31, 45 e 73 pós-tratamento, respectivamente (GOMEZ et al., 2018a).

Resultados semelhantes foram observados neste estudo durante o mesmo período (24h após o repasto sanguíneo) para *Lu. longipalpis*, com mortalidade de 100, 91,2, 48,7 e 37,5% observada nos dias 1, 30, 60 e 90 pós-tratamento, respectivamente. Outrossim, um estudo desenvolvido com *Ph. perniciosus* demonstrou mortalidade de 100, 100 e 68,6% nos dias 1, 28 e 84 pós-tratamento com fluralaner, respectivamente, 96h após o repasto sanguíneo (BONGIORNO et al., 2019). Neste estudo, 100% de mortalidade de *Lu. longipalpis* foi registrada nos dias 1, 30 e 90 após o tratamento com fluralaner 96h após o repasto, indicando que *Lu. longipalpis* é mais suscetível ao efeito inseticida do fluralaner do que *Ph. perniciosus*.

A eficácia inseticida de fluralaner contra *Ph. papatasi* foi determinada também em um estudo de alimentação por membrana. A mortalidade dos flebotomíneos, 24h após o repasto, foi maior no grupo alimentado com amostras de sangue de cães tratados com fluralaner por até 30 dias (60% de mortalidade) pós-tratamento em comparação com o controle (GOMEZ et al., 2018b).

No presente estudo, fluralaner foi capaz de matar espécimes fêmeas de flebotomíneos dentro de cinco dias após o repasto sanguíneo. As fêmeas de flebotomíneos levam, aproximadamente, sete dias para serem infectantes após a ingestão de sangue de um hospedeiro infectado, com o desenvolvimento da forma infectante no intestino anterior e, possivelmente, transmitir *L. infantum* a outros hospedeiros (SACKS; PERKINS, 1984).

O uso de fluralaner não impede que um flebotomíneo infectado transmita o parasito durante o repasto sanguíneo, porém quando usado em larga escala, pode se tornar uma estratégia alternativa para controlar as populações de *Lu. longipalpis* em áreas de risco a longo prazo. Esses flebotomíneos, que se alimentam de sangue em

cães tratados com fluralaner, serão mortos antes de se tornarem infectantes, evitando assim a transmissão.

Além da ação de fluralaner observada em adultos, as fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas que não morreram no período de 120h pós-repasto em cães tratados (mais de 150 dias pós-tratamento) foram capazes de colocar ovos, embora uma menor quantidade de ovos e larvas foi observada. Essas observações sugerem que fluralaner pode atuar no desenvolvimento e maturação dos ovos (dados não mostrados). Entretanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar essa possível ação.

A eficácia inseticida de fluralaner contra *Lu. longipalpis*, pós-alimentação em cães tratados, foi registrada em até 270 dias com mortalidade de 100% em até 120h após o repasto sanguíneo. Por outro lado, a eficácia de fluralaner contra *Ph. perniciosus* foi de 100, 100 e 52,7% nos dias 1, 28 e 84 pós-tratamento, respectivamente (BONGIORNO et al., 2019). A eficácia prolongada de fluralaner contra *Lu. longipalpis*, quando comparada a outras espécies de flebotomíneos, pode estar associada a variações intra e interespecíficas no tamanho do inseto ou a quantidade de ingestão de sangue durante o repasto, além da atratividade do animal em estudo (DABA et al., 2004; ABBASI; CUNIO; WARBURG, 2009).

Um trabalho desenvolvido por Williams e colaboradores demonstrou que carrapatos coletados de cães tratados com fluralaner pesavam significativamente menos do que carrapatos coletados de cães controle, levando a uma absorção mínima de sangue, porém com exposição suficiente ao composto pelos carrapatos do grupo tratamento e, conseqüentemente, observou-se elevados níveis de mortalidade (WILLIAMS et al., 2015).

No presente estudo, todos os espécimes apresentaram altos níveis de mortalidade após repasto sanguíneo em cães tratados com fluralaner, independentemente da quantidade de sangue ingerida pelas fêmeas de *Lu. longipalpis*. Além disso, os ensaios de repasto de flebotomíneos, com 100% de sucesso na alimentação, foram realizados diretamente na região ventral dos cães, onde há maior concentração de tecido adiposo e, conseqüentemente, maior concentração do fármaco quando comparado a outros tecidos (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2014). Em estudos futuros, novos ensaios devem ser realizados diretamente na orelha dos cães para comparar os resultados com diferentes regiões do corpo do animal.

Ao avaliar inseticidas sistêmicos a serem aplicados em cães, como medida de controle de doenças transmitidas por vetores, alguns pontos devem ser considerados. Para obter maior cobertura em áreas de risco, os inseticidas devem ser de fácil aplicação, eficácia imediata e prolongada e baixo número de reaplicações. Quando existe um bom perfil de segurança, os efeitos adversos para o cão são evitados, aumentando a adesão do tutor (PFISTER; ARMSTRONG, 2016).

Neste contexto, fluralaner parece ser um composto promissor para o controle de flebotomíneos, principalmente populações de *Lu. longipalpis*. Os resultados do presente estudo mostram altos níveis de mortalidade, a atividade residual mais longa relatada contra flebotomíneos e altos níveis de eficácia, por até nove meses. Outro ponto a ser mencionado é que apenas cães sem raça definida foram utilizados no estudo, apresentando idades e pesos variáveis, de modo que os resultados podem se assemelhar bastante ao cenário real.

4.5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados mostram que o tratamento de cães com fluralaner apresenta eficácia inseticida contra *Lu. longipalpis* e representa uma possível estratégia de intervenção de saúde pública para o combate e redução de vetores infectados em áreas endêmicas de LV, reduzindo os casos caninos e humanos da doença.

4.6 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis epidemiological situation. 2022. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/burden/en>. Acesso em: jul 2022.
2. Erza N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2:248–57.
3. Panamerican Health Organization. Epidemiological report of the Americas. *Rep leishmaniases.* 2021;10:1–10.
4. Alvar J, Cañavete C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1–88.
5. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2002;106:315–24.

6. Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará state. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80:143–5.
7. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136:1915–34.
8. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 1999;17:279–89.
9. França-Silva JC, Barata RA, Da Costa RT, Monteiro ÉM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;131:213–20.
10. Michalsky ÉM, França-Silva JC, Barata RA, Silva FOL, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:56–61.
11. Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky ÉM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;176:101–11.
12. Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:263–4.
13. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002;186:1314–20.
14. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e584.
15. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014;45:111–24.
16. Letendre L, Huang R, Kvaternick V, Harriman J, Drag M, Soll M. The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs. *Vet Parasitol.* 2014;201:190–7.
17. Shoop WL, Hartline EJ, Gould BR, Waddell ME, McDowell RG, Kinney JB, et al. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Vet Parasitol.* 2014;201:179–89.
18. Rohdich N, Roepke RK, Zschiesche E. A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™

- (fluralaner) against Frontline (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. *Parasit Vectors*. 2014;7:83.
19. Taenzler J, Wengenmayer C, Williams H, Fourie J, Zschiesche E, Roepke RK, et al. Onset of activity of fluralaner (Bravecto™) against *Ctenocephalides felis* on dogs. *Parasit Vectors*. 2014;7:1–4.
 20. Fourie JJ, Liebenberg JE, Horak IG, Taenzler J, Heckerroth AR, Frénais R. Efficacy of orally administered fluralaner (Bravecto™) or topically applied imidacloprid/moxidectin (Advocate®) against generalized demodicosis in dogs. *Parasit Vectors*. 2015;8:1–7.
 21. Kilp S, Ramirez D, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. *Parasit Vectors*. 2014;7:85.
 22. Walther FM, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. Safety of fluralaner chewable tablets (Bravecto™), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral administration. *Parasit Vectors*. 2014;7:87.
 23. Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:744–9.
 24. Loza A, Talaga A, Herbas G, Canaviri RJ, Cahuasiri T, Luck L, et al. Systemic insecticide treatment of the canine reservoir of *Trypanosoma cruzi* induces high levels of lethality in *Triatoma infestans*, a principal vector of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2017;10:344.
 25. Gomez SA, Lucientes J, Castillo JA, Peris MP, Delacour S, Ortega P, et al. A randomized, blinded, controlled trial to assess sand fly mortality of fluralaner administered orally in dogs. *Parasit Vectors*. 2018;11:627.
 26. Gomez SA, Curdi JL, Hernandez JAC, Peris PP, Gil AE, Velasquez RVO, et al. Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs. *Parasit Vectors*. 2018;11:230.
 27. Bongiorno G, Meyer L, Evans A, Lekouch N, Bianchi R, Khoury C, et al. A single oral dose of fluralaner (Bravecto®) in dogs rapidly kills 100% of blood-fed *Phlebotomus perniciosus*, a main visceral leishmaniasis vector, for at least 1 month after treatment. *Med Vet Entomol*. 2019;240–3.
 28. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol*. 2011;36:1–9.
 29. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*. 1925;18:265–7.
 30. Sacks DL, Perkins P V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 1984;223:1417–9.

31. Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:79–86.
32. Daba S, Daba A, Shehata MG, El Sawaf BM. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol.* 2004;34:173–82.
33. Williams H, Demeler J, Taenzler J, Roepke RKA, Zschiesche E, Heckerroth AR. A quantitative evaluation of the extent of fluralaner uptake by ticks (*Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*) in fluralaner (Bravecto™) treated vs. untreated dogs using the parameters tick weight and coxal index. *Parasit Vectors.* 2015;8:352.
34. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). CVMP assessment report for Bravecto (EMA/V/C/002526/0000). London: European Medicine Agency. 2014.
35. Pfister K, Armstrong R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: A review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. *Parasit Vectors.* 2016;9:436.

5 CAPÍTULO 2

O presente capítulo corresponde ao segundo artigo científico produzido com esta tese, a ser submetido para publicação em revista indexada, com qualis igual ou superior a A2, traduzido para o vernáculo, como definido pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Espectroscopia de infravermelho médio (ATR-FTIR) associada a análise multivariada como ferramenta diagnóstica para leishmaniose visceral canina

Tamyres Bernadete Dantas Queiroga¹, Jéssica Teixeira Jales², Henrique Rafael Pontes Ferreira³, Daniel Lucas Dantas de Freitas⁴, Kássio Michell Gomes de Lima⁴, Renata Antonaci Gama⁵, Paulo Marcos Matta Guedes^{5*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife, Brasil

⁴Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

⁵Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

*Autor para correspondência: pauloguedes@cb.ufrn.br

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave causada por espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, *Leishmania infantum* é o agente etiológico, e o cão doméstico é o principal animal reservatório. Os métodos laboratoriais usados para diagnosticar a LV apresentam limitações, como custo elevado, demora no resultado e baixa sensibilidade, relacionada, entre outros motivos, à forma clínica da doença em cães. Neste contexto, a análise da espectroscopia de infravermelho médio tem o potencial de fornecer resultados rápidos e pode ser adaptado para um método laboratorial com alta sensibilidade e especificidade. Neste estudo, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (ATR-FTIR) combinada com análise multivariada foi empregada para distinguir amostras de cães infectados com *L. infantum* (n = 29), em diferentes formas clínicas, de animais saudáveis não infectados (n = 30). Os melhores valores de sensibilidade (100%) e de especificidade (100%) foram obtidos usando o algoritmo de projeções sucessivas com análise de discriminante linear (SPA-LDA), SPA com máquina de vetores de suporte

(SPA-SVM) e algoritmo genético com LDA (GA-LDA). Esses bons resultados de classificação, além de elevada frequência analítica, preservação da amostra em análise, e a natureza livre de reagentes deste método demonstram seu potencial como ferramenta alternativa para o diagnóstico de LV em cães.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Cães; Formas clínicas; Diagnóstico; Biospectroscopia; FTIR; Algoritmos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious and chronic disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. *Leishmania infantum* is the etiological agent and the domestic dog is the main reservoir in Brazil. Laboratory methods applied to diagnose VL have limitations such as excessive cost, delay in the result, and low sensitivity related to the disease's clinical forms in dogs. Mid-infrared spectroscopy has the potential to provide rapid results and can be adapted to a laboratory method with high sensitivity and specificity. In this study, attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) combined with multivariate analysis was employed to distinguish samples from dogs infected with *L. infantum* with different clinical forms (n = 29) from uninfected animals (n = 30). The best sensitivity (100%) and specificity (100%) values were obtained using the successive projections algorithm with linear discriminant analysis (SPA-LDA), SPA with support vector machine (SPA-SVM), and the genetic algorithm with LDA (GA-LDA). These good classification results in addition to the high analytical frequency, sample preservation, and reagent-free nature of this method demonstrate its potential as an alternative tool for the VL diagnosis in dogs.

Keywords: *Leishmania infantum*; Dogs; Clinical forms; Diagnosis; Biospectroscopy; FTIR; Algorithms.

5.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada um grave problema de saúde pública em vários países do mundo, podendo conduzir mais de 90% dos pacientes a óbito em casos sintomáticos graves, se não forem submetidos à terapia específica (WHO, 2022). Nas Américas, os dados epidemiológicos mostram que o Brasil é

responsável por notificar aproximadamente 97% de novos casos com distribuição em todas as regiões geográficas do país (PAHO, 2021).

A LV, no Brasil, é causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum*, transmitido especialmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) infectadas do complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis*, o qual encontra-se bem adaptado aos ambientes urbanos e periurbanos (AGUIAR; VIEIRA, 2018).

Os cães são considerados o principal reservatório doméstico e têm sido incriminados como responsáveis pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, devido à alta prevalência da doença nesses animais (MORENO; ALVAR, 2002; READY, 2014), à proximidade com os seres humanos (SILVA et al., 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006), e ao intenso parasitismo cutâneo (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; BORJA et al., 2016).

O programa brasileiro de vigilância e controle da LV recomenda a triagem sorológica periódica de todos os cães, seguida da eutanásia dos animais sororreagentes (BRASIL, 2014). Entretanto, a precisão na identificação de cães infectados permanece controversa, pois eles podem não apresentar sinais clínicos da doença, o que pode retardar o diagnóstico precoce (LEMOS et al., 2008; GRIMALDI et al., 2012).

Diversas abordagens são utilizadas para o diagnóstico da LV em cães no Brasil. O método laboratorial considerado padrão-ouro para confirmação da doença é a visualização do parasito no microscópio (REGINA-SILVA et al., 2014). No entanto, além da possibilidade de resultados falso-negativos devido à baixa sensibilidade, esse método direto é de difícil execução e invasivo, dependendo da realização de aspiração de lesões de pele, medula óssea, e linfonodos (REGINA-SILVA et al., 2014).

A detecção sorológica de anticorpos anti-*Leishmania* também é usada, e é preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil para rotina de trabalho de vigilância com distribuição de um teste rápido imunocromatográfico para triagem, seguido do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para confirmação (FARIA; ANDRADE, 2012). Esse teste apresenta alta sensibilidade, mas baixa especificidade, particularmente entre animais assintomáticos (GRIMALDI et al., 2012).

A reação de ELISA tem melhor sensibilidade e especificidade a depender do antígeno empregado, mas pode produzir reação cruzada com outros agentes biológicos, como *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (METTLER et

al., 2005; FERREIRA et al., 2007; ZANETTE et al., 2014, PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015). Sendo assim, testes com boa acurácia devem ser explorados como ferramentas para o rastreamento e confirmação da doença para evitar a eutanásia de cães com diagnósticos falso-positivos.

O diagnóstico molecular, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar o DNA do parasito, apresenta boa sensibilidade em comparação com os imunoenaios (FERREIRA et al., 2006; GALLUZZI et al., 2018). No entanto, a PCR é uma técnica cara e, como tal, raramente é usada para diagnóstico, dificultando seu uso na rotina (ANDRADE et al., 2006; MARY et al., 2006). Novas alternativas para superar essas limitações surgem da análise de espectros moleculares de células, fluidos, e tecidos em estudos biológicos (FIFIELD; KEALEY, 2010; SANTOS et al., 2017).

A análise da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (ATR-FTIR) tem o potencial de fornecer resultados e pode atingir altos valores de sensibilidade e especificidade. Esta técnica exerce enorme interesse na área biológica, pois permite obter de forma rápida uma impressão bioquímica da amostra sob investigação, fornecendo informações sobre sua principal molécula conteúdo (AMI; MEREGHETTI; MARIA, 2013; GLASSFORD; BYRNE; KAZARIAN, 2013).

O ATR-FTIR é baseado na interação da radiação infravermelha com a matéria. A radiação infravermelha é absorvida quando sua frequência (energia) é igual à de um modo vibracional. Essas vibrações são exclusivas para o tipo e arranjo espacial dos átomos em uma amostra (impressão digital) (DAVIS; MAUER, 2010). Dessa forma, as informações bioquímicas, associadas a essa região, representam estrutura e função das biomoléculas baseados nas bandas de vibração (CHIRIBOGA; YEE; DIEM, 2000; MARTIN et al., 2010; KELLY et al., 2011).

A aplicação de técnicas de infravermelho produz imensa quantidade de dados a serem analisados e interpretados. Para estas análises, diferentes modelos matemáticos foram desenvolvidos para auxiliar no pré-processamento, classificação amostral, e redução na dimensionalidade das informações químicas, e representam importantes componentes da quimiometria (HIBBERT, 2016) e análise multivariada de dados (JOHNSON; NAIKER, 2019), podendo ser utilizados métodos não supervisionados e supervisionados (DAVIS; MAUER, 2010).

Nos métodos supervisionados, os algoritmos são ensinados a reconhecer padrões discriminativos. Essas técnicas de classificação apresentam vantagens, pois uma vez que o modelo construído é devidamente validado com as amostras de treinamento, pode ser salvo em um computador e usado quantas vezes for necessário para analisar novas amostras, podendo compor importantes bases de dados para estudos com microrganismos (BZDOK; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2018).

A espectroscopia ATR-FTIR, associada a quimiometria, tem sido aplicada com sucesso para detectar infecções, causadas por vírus, fungos e bactérias (ZARNOWIEC et al., 2015; WEHBE; VEZZALINI; CINQUE, 2018; SILVA et al., 2020). Além de ter sido utilizada na diferenciação de espécies de *Leishmania* em cultura (AGUIAR et al., 2015; HORNEMANN et al., 2017; AGUIAR et al.; 2018), e discriminação de amostras de animais infectados por *L. infantum*, infectados por *Trypanosoma evansi* e animais não infectados (LARIOS et al., 2021).

Diante da necessidade de ferramentas novas, rápidas e com melhor acurácia para diagnóstico da LV em cães, o presente estudo objetivou avaliar a espectroscopia do infravermelho médio por meio do ATR-FTIR, associado à análise multivariada, como ferramenta para diferenciação de grupos de soros caninos, de animais não infectados e naturalmente infectados com *L. infantum* em diferentes formas clínicas.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Amostras de soro

As amostras de soro foram fornecidas pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade do Natal-RN (Brasil). Amostras de 59 cães foram coletadas por punção venosa de veia cefálica em tubos a vácuo de 4 ml sem anticoagulante (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA). Os tubos foram mantidos em repouso vertical em temperatura ambiente por 30 min para retrain o coágulo, depois centrifugados a 4000 rpm por 10 min. As amostras foram transferidas para microtubos de polipropileno (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e, em seguida, armazenadas a -20° C.

Dois grupos foram formados para as análises: grupo controle, animais não infectados (n= 30); e grupo infectado, animais naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentando amostras de cães em diferentes formas clínicas (n = 29). O grupo infectado foi distribuído da seguinte forma: assintomáticos (n = 10), oligossintomáticos

(n= 9), e sintomáticos (n = 10). O ensaio de ELISA e o ensaio imunocromatográfico TR-DPP® (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) foram empregados como testes de validação. O grupo controle não apresentou sintomas clínicos e foram observados resultados negativos nos testes de validação.

Os animais naturalmente infectados por *L. infantum* foram agrupados de acordo com as manifestações clínicas apresentadas, seguindo a classificação dos animais, em: (i) assintomáticos, animais infectados que não apresentam sinais clínicos sugestivos de LV; (ii) oligossintomáticos, animais infectados que possuem até três sinais clínicos da doença, incluindo moderada perda de peso e; (iii) sintomáticos, cães que possuem mais de três sinais clínicos sugestivos da doença, incluindo acentuada perda de peso (GENARO et al., 1988; NICOLATO et al., 2013).

Os sintomas clínicos analisados foram alopecia, ceratoconjuntivite, onicogribose, lesões na pele, apatia, opacificação da córnea, e parestesia das patas. Todos os métodos foram executados de acordo com as orientações e regulamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (número de protocolo 136.061/2018) (**Anexo A**).

5.2.2 Aquisição dos espectros

Espectros de infravermelho médio foram coletados de cada amostra de soro usando o espectrômetro IRAffinity-1S, equipado com o acessório ATR (ATR-FTIR) (*Shimadzu Corporation*, Quioto, Japão) localizado na Central Analítica do Instituto de Química da UFRN (Brasil). Os espectros foram obtidos na faixa de 600 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, usando 10 µL de amostra aplicada diretamente no cristal de ATR, resolução de 4 cm⁻¹, com 32 *scanners* e tempo de medição de 2 segundos por espectro (três espectros por amostra). Antes de iniciar as medições dos espectros, um espectro foi obtido para levar em conta a mudança ambiental, e o cristal ATR foi limpo com álcool (70% v/v) e acetona (P.A.) antes da coleta de cada espectro.

5.2.3 Análise quimiométrica

Os seguintes algoritmos de extração e seleção de características foram testados para diferenciar as amostras do grupo controle e do grupo infectado com *L.*

infantum: análise de componentes principais (PCA), algoritmo de projeções sucessivas (SPA) ou algoritmo genético (GA), seguidos de classificadores de análise discriminante, que foram análise discriminante linear (LDA), ou máquinas de vetores de suporte (SVM). Esses algoritmos foram acoplados como extração/seleção e classificação de recursos como: PCA-LDA, e PCA-SVM; SPA-LDA, e SPA-SVM; e GA-LDA, e GA-SVM.

Para os modelos PCA-LDA/SVM, os escores da análise de componentes principais (PCA) (BRO; SMILDE, 2014) são usados como variáveis de entrada para análise discriminante linear (LDA), ou máquinas de vetores de suporte (SVM) (MORAIS et al., 2017; MORAIS; LIMA, 2018). A PCA decompõe os dados espectrais pré-processados em um pequeno número de componentes principais (PCs) a partir da combinação linear das variáveis originais que resumem o sistema original, reduzindo assim a dimensionalidade e complexidade dos dados (ABDI; WILLIAMS, 2010).

O algoritmo de projeções sucessivas (SPA) (SOARES et al., 2013) e o algoritmo genético (GA) (McCALL, 2005) são algoritmos de seleção de variáveis, o primeiro funciona selecionando números de onda espectrais que minimizam a colinearidade dos dados, e o segundo seleciona o melhor conjunto de números de onda de acordo com uma função de aptidão, seguindo um processo evolutivo natural baseado na teoria de Darwin. O número ótimo de variáveis para SPA-LDA e GA-LDA foi determinado a partir do número mínimo de custo da função G , calculada para um determinado conjunto de dados de validação como:

$$G = \frac{1}{N_v} \sum_{n=1}^{N_v} g_n \quad (1)$$

Onde N_v é o número de amostras de validação e g_n é definido como:

$$g_n = \frac{r^2(x_n, m_{I(n)})}{\min_{I(m) \neq I(n)} x^2(x_n, m_{I(n)})} \quad (2)$$

Onde o numerador é o quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto x_n do índice de classe $I(n)$ e a média amostral $m_{I(n)}$ de sua classe verdadeira; e o

denominador é o quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto x_n e o centro da classe errada mais próxima. Em GA, as probabilidades de mutação e reprodução foram mantidas constantes a 10% e 40%, respectivamente, com população inicial de 40 indivíduos e 20 gerações.

Análise de discriminante linear (LDA) e SVM foram usados como técnicas de classificação acopladas as variáveis selecionadas de SPA e GA. O algoritmo LDA é baseado no cálculo da distância de Mahalanobis entre as amostras. Este assume classes com estruturas de variância semelhantes, usando uma matriz de covariância agrupada. A pontuação de classificação LDA para amostra i da classe k (L_{ik}) é calculado como a seguir (DIXON; BRERETON, 2009):

$$L_{ik} = (x_i - \bar{x}_k)^T C_{pooled}^{-1} (x_i - \bar{x}_k) \quad (3)$$

Onde x_i é um vetor com as variáveis de entrada para a amostra i ; \bar{x}_k é a média da classe k ; e C_{pooled} é a matriz de covariância agrupada entre as classes. O algoritmo SVM é um classificador linear binário, usando um passo não linear, que transforma o espaço amostral de entrada em um recurso espaço utilizando uma função *kernel* que maximiza as margens de separação entre os grupos amostrais (CORTES; VAPNIK, 1995). Neste estudo, a função de base radial (RBF) foi utilizada por ser capaz de adaptar-se a diferentes distribuições de dados (MORAIS et al., 2020). A regra de classificação SVM pode ser obtida pela seguinte equação (MORAIS et al., 2017):

$$f(x) = \text{sign} \left(\sum_{i=1}^{N_{sv}} \alpha_i y_i k(x_i, z_j) \right) + b \quad (4)$$

Onde N_{sv} é o número de vetores de suporte, α_i é o multiplicador de Lagrange, y_i é a pertinência da classe (± 1), $k(x_i, z_j)$ é a função do kernel, e b é o parâmetro de polarização. A função RBF pode ser calculada com a seguinte equação (DIXON; BRERETON, 2009):

$$k(x_i, z_j) = \exp(-\gamma \|x_i - z_j\|^2) \quad (5)$$

Onde x_i e z_j são vetores de medidas da amostra, e γ é um parâmetro de ajuste que controla a largura de RBF.

5.2.4 Performance dos modelos supervisionados

A acurácia (6), sensibilidade (7), especificidade (8), valor preditivo positivo (PPV) (9), valor preditivo negativo (NPV) (10), índice de Youden (YOU) (11), razão de probabilidade positiva (LR+) (12) e razão de probabilidade negativa (LR-) (13) foram calculados no conjunto de testes para avaliar os desempenhos de classificação dos modelos. A acurácia avalia a proporção de todos os testes corretos (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, sobre todos os resultados obtidos); a sensibilidade representa a proporção de amostras positivas classificadas corretamente; a especificidade representa a probabilidade de resultado negativo para uma amostra negativa.

O PPV mede a proporção de exemplos positivos corretamente atribuídos com valor variando entre 0 e 1; NPV mede a proporção de exemplos negativos atribuídos corretamente e seu valor varia entre 0 e 1; YOU avalia a capacidade do classificador de evitar falhas; LR+ representa a razão entre a probabilidade de prever um exemplo como positivo quando realmente é positivo, e a probabilidade de prever um exemplo como positivo quando na verdade não é positivo; e LR- que representa a razão entre a probabilidade de prever um exemplo como negativo quando na verdade é positivo, e a probabilidade de prever um exemplo como negativo quando realmente é negativo. As equações utilizadas para os cálculos podem ser observadas abaixo:

$$\text{Acurácia (\%)} = \frac{VP+VN}{VP+VN+FP+FN} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{PPV} = \frac{VP}{VP+FP} \quad (9)$$

$$\text{NPV} = \frac{VN}{VN+FN} \quad (10)$$

$$YOU = SENS - (1 - ESPEC) \quad (11)$$

$$LR (+) = \frac{SENS}{1-ESPEC} \quad (12)$$

$$LR (-) = \frac{1-SENS}{ESPEC} \quad (13)$$

Onde FN é falso negativo, FP é falso positivo, VP é verdadeiro positivo, e VN é verdadeiro negativo. SENS é definido como sensibilidade, e ESPEC como especificidade.

5.2.5 Análise de dados

Os dados de importação e pré-tratamento, bem como as construções do modelo quimiométrico foram realizados com auxílio do *software* MATLAB R2014b (*Mathworks Inc.*, Natick, EUA), usando o PLS-Toolbox versão 7.9.3 (*Eigenvector Research Inc.*, Wenatchee, EUA) e rotinas feitas em laboratório. O seguinte pré-processamento foi aplicado para o conjunto de dados: corte para a região de impressão digital biológica (900–1800 cm^{-1}), suavização de Savitzky-Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964) para remover ruído aleatório (janela = 15 pontos), além de correção de linha de base automática de mínimos quadrados ponderados (AWLS).

A centralização média foi aplicada a todos os espectros antes de realizar a variável seleção e calibração de subconjuntos. Cada classe foi tratada separadamente para os modelos. As amostras foram divididas em conjuntos de treinamento (70%), validação (15%) e teste (15%) aplicando o algoritmo de amostragem uniforme clássico Kennard–Stone (KS) aos espectros de infravermelho (IV) (KENNARD; STONE, 1969).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Diferenciação dos grupos por ATR-FTIR

Os espectros médios de infravermelho para cada classe (controle, linha vermelha; infectado, linha verde) são representados na figura 1, pré-processados na faixa de impressão digital biológica e com correção de linha de base e suavização.

Um total de 177 espectros foram coletados de amostras de soro de cães infectados e não infectados com *L. infantum*.

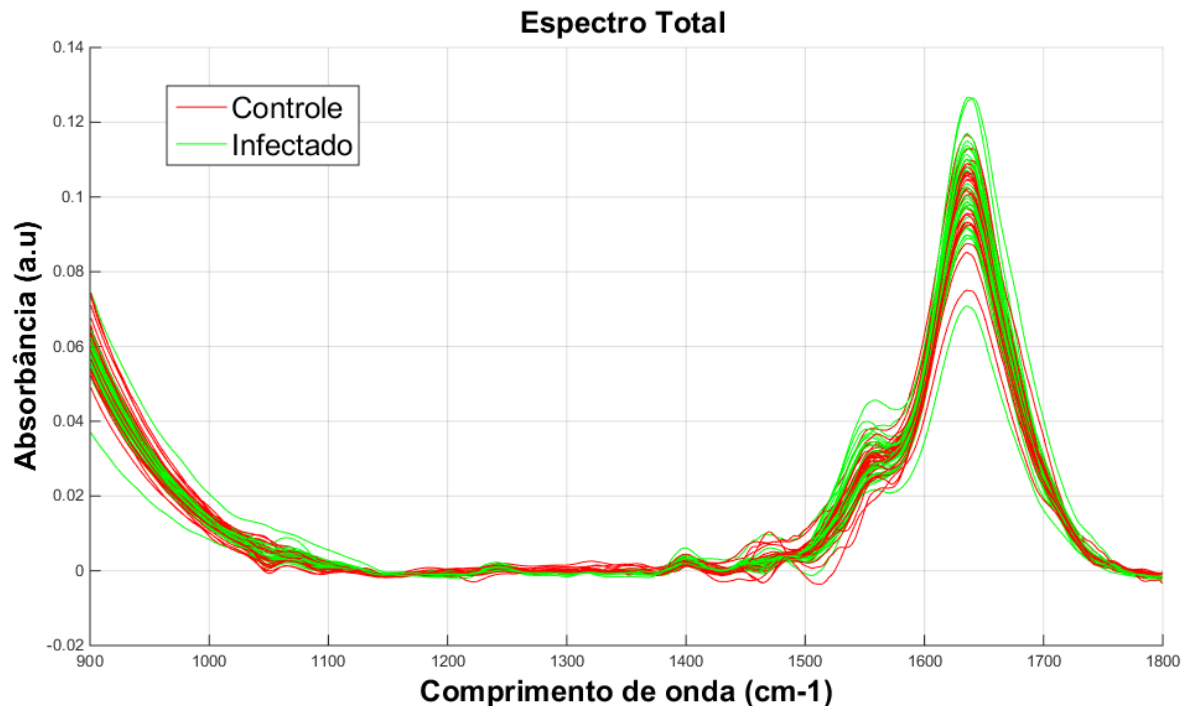


Figura 1 - Representação gráfica das médias espectrais de duas classes. Os espectros médios do grupo controle são mostrados em vermelho; aqueles do grupo infectado são mostrados em verde.

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada em conjunto com dois algoritmos de análise supervisionada (LDA e SVM). O gráfico da pontuação de Fisher 2D para PCA-LDA (**Figura 2A**) e PCA-SVM (**Figura 2B**) pode ser observado na figura 2, mostrando os pontos espectrais derivados de cada amostra.

Os modelos PCA-LDA e PCA-SVM foram construídos com base em cinco componentes principais, sendo observada 96% de variância acumulada em ambos. Ao considerar a análise dos grupos, as funções discriminantes não apresentaram uma segregação muito clara para o PCA-LDA e PCA-SVM, devido à sobreposição dos vetores (**Figuras 2A e 2B**).

Algoritmo de projeções sucessivas com LDA e SVM (SPA-LDA e SPA-SVM), e algoritmo genético com LDA e SVM (GA-LDA e GA-SVM) foram aplicados ao conjunto de dados para obter o número ótimo de variáveis pelo custo mínimo. Os gráficos de análise das funções discriminantes mostram uma eficiência semelhante entres esses algoritmos para separação amostral (**Figuras 2C, 2D, 2E e 2F, respectivamente**). Nestes modelos, boa homogeneidade interclasses foi observada, com separação

satisfatória entre classes. Os grupos foram eficientemente discriminados em todos os modelos (**Figuras 2C, 2D, 2E e 2F**).

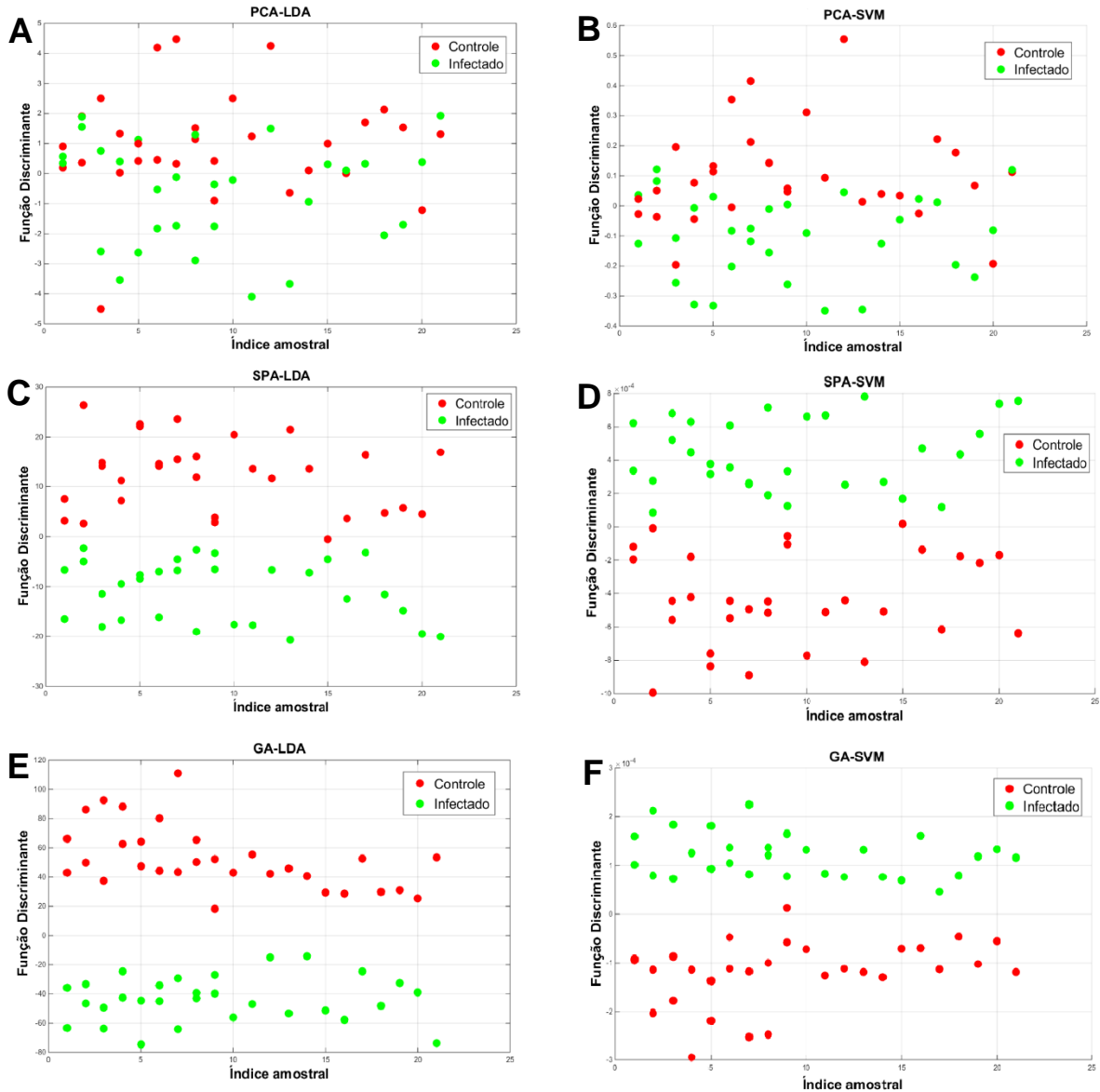


Figura 2 - Funções discriminantes calculadas para diferenciação entre grupo controle e grupo infectado com aplicação de modelos matemáticos. Diferenciação das classes utilizando PCA-LDA (A), PCA-SVM (B), SPA-LDA (C), SPA-SVM (D), GA-LDA (E), e GA-SVM (F).

Os modelos SPA-LDA e SPA-SVM resultaram na seleção de 24 variáveis utilizadas no cálculo dos scores de Fisher para os grupos (**Figura 3**). A análise das variáveis selecionadas demonstrou que as principais alterações bioquímicas usadas para discriminação entre as classes, quando da aplicação do SPA-LDA e SPA-SVM, foram proteínas [amida I e II (1400-1700 cm^{-1})]; regiões de vibrações de estiramento

simétrico de fosfato (vsPO₂⁻) e glicogênio (1000-1100 cm⁻¹), região de lipídeos (1740 cm⁻¹), e região de fosforilação proteica (900 cm⁻¹, 970 cm⁻¹) (**Figura 3**).

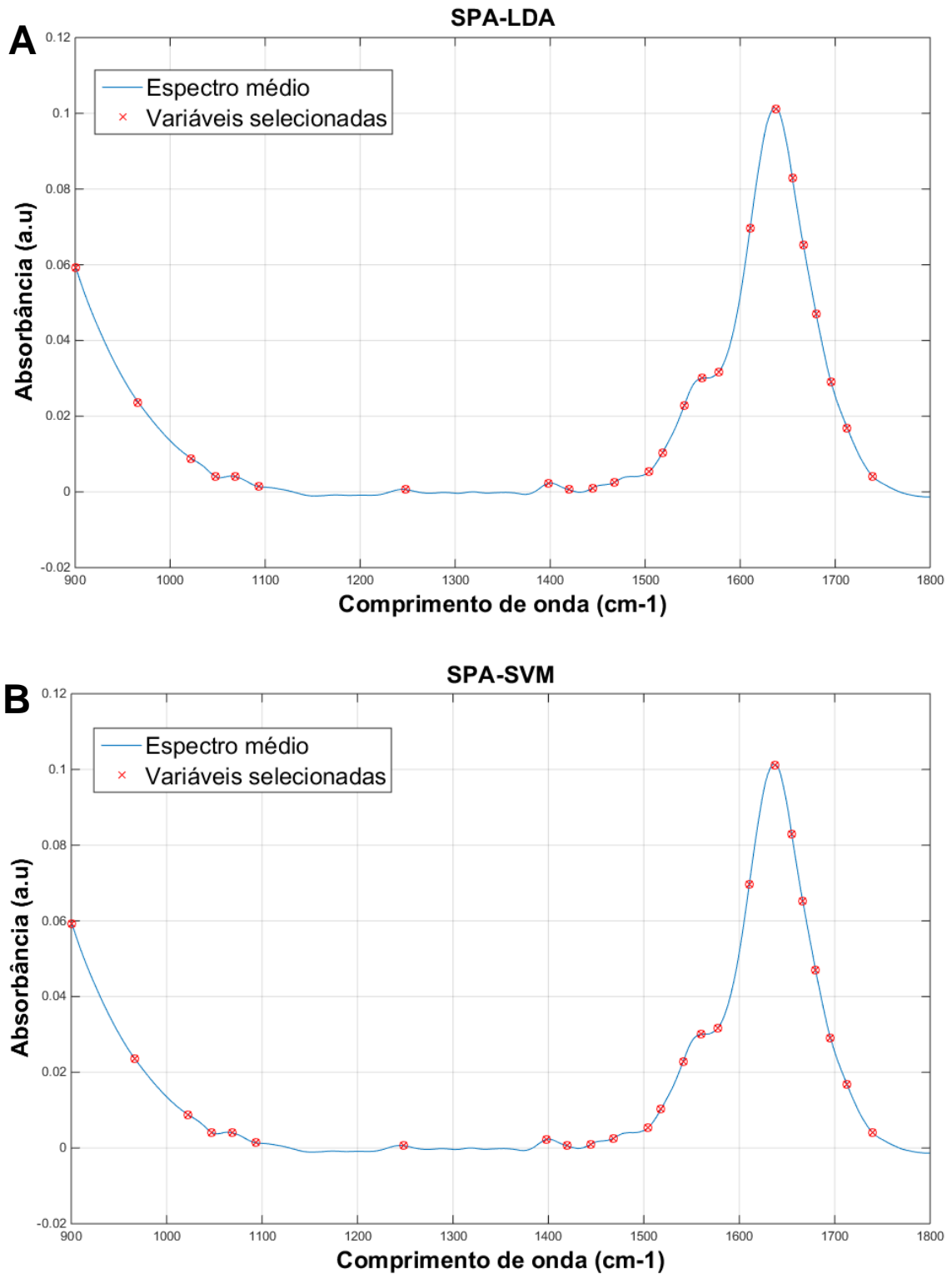


Figura 3 - Variáveis selecionadas para construção dos modelos SPA-LDA (A) e SPA-SVM (B).

Os modelos GA-LDA e GA-SVM selecionaram cinco variáveis para o cálculo dos scores de Fisher (**Figura 4**). A análise das variáveis selecionadas mostrou que a

região de proteína, amida I (1650 cm^{-1}) e amida II (1470 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1550 cm^{-1}), e região de fosforilação proteica (900 cm^{-1}) foram importantes para a discriminação dos grupos (**Figura 4**).

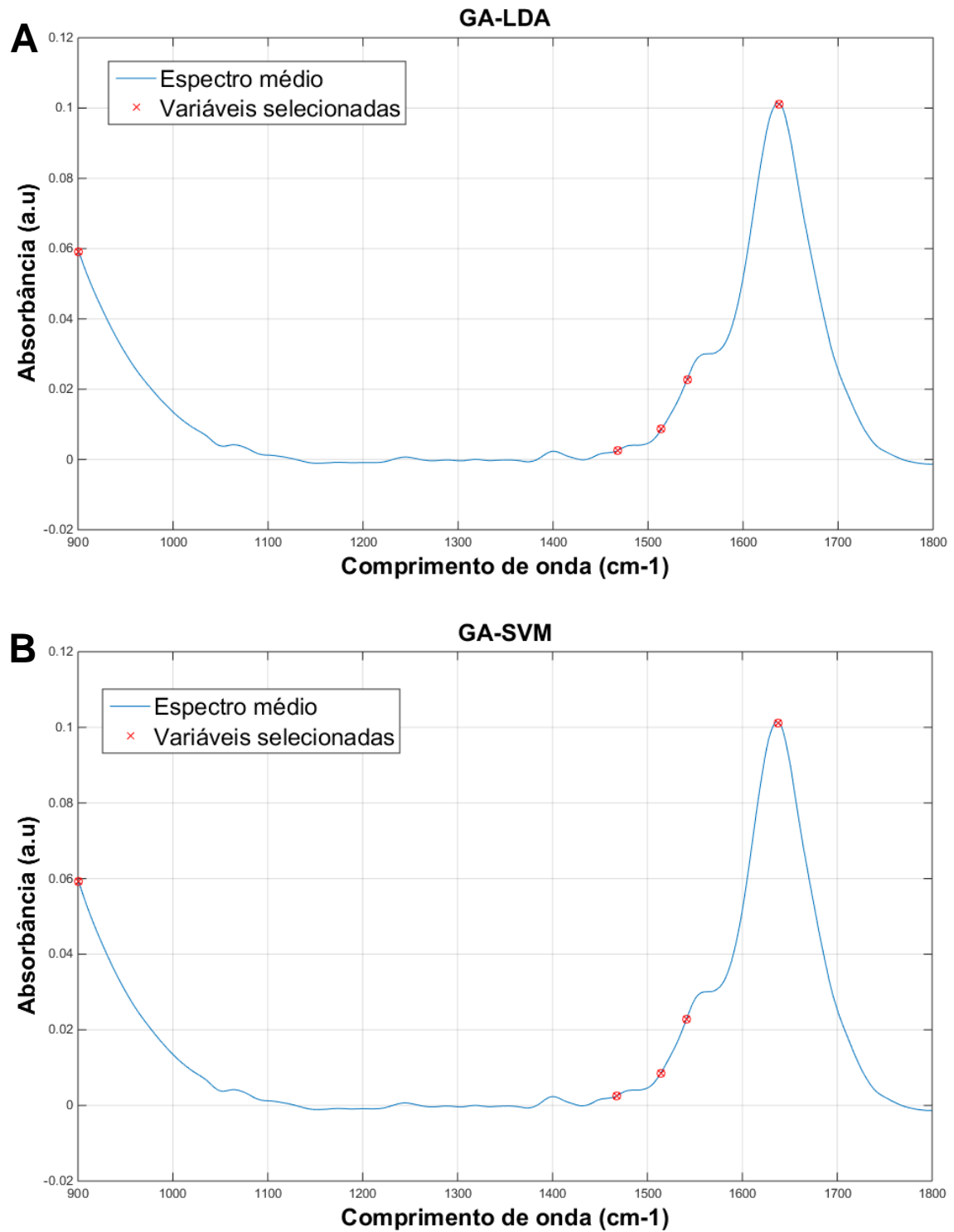


Figura 4 - Variáveis selecionadas para construção dos modelos GA-LDA (A) e GA-SVM (B).

5.3.2 Performance dos métodos

Sensibilidade média de 100% foi observada para correta classificação amostral quando SPA-LDA, SPA-SVM, e GA-LDA foram utilizados, apresentando maior sensibilidade para diferenciação entre os grupos, além de especificidade média de 100% (**Tabela 1**). Em contrapartida, PCA-LDA exibiu sensibilidade média de 100%, entretanto a especificidade foi de 44,44% (**Tabela 1**).

Os modelos PCA-SVM e GA-SVM apresentaram resultados semelhantes para sensibilidade e especificidade, com 88,88% e 100% para PCA-SVM, e 77,77% e 100% para GA-SVM, respectivamente (**Tabela 1**). Os cálculos das figuras de mérito estão descritos na tabela 1. Em conjunto, esses resultados mostram que a espectroscopia ATR-FTIR associada a poderosas abordagens quimiométricas tem o potencial de diferenciar amostras de cães infectados ou não infectados por *L. infantum*.

Tabela 1 - Valores das figuras de mérito dos modelos de classificação (PCA-LDA, PCA-SVM, SPA-LDA, SPA-SVM, GA-LDA e GA-SVM) para separação dos grupos controle e infectado.

	PCA-LDA	PCA-SVM	SPA-LDA	SPA-SVM	GA-LDA	GA-SVM
Acurácia	72.22	94.44	100	100	100	88.88
Sensibilidade	100.00	88.88	100	100	100	77.77
Especificidade	44.44	100	100	100	100	100
PPV^a	64.28	100	100	100	100	100
NPV^b	100	90	100	100	100	81.81
LR+^c	1.8	-	-	-	-	-
LR-^d	0	0.1	0	0	0	0.2
YOU^e	44.44	88.88	100	100	100	77.77

^aPPV = valor preditivo positivo; ^bNPV = valor preditivo negativo; ^cLR + = razão de probabilidade positiva; ^dLR - = razão de probabilidade negativa; ^eYOU = índice de Youden.

5.4 DISCUSSÃO

A espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) tem se mostrado uma ferramenta útil para aplicações biomédicas com muitos estudos mostrando alta especificidade e sensibilidade para detecção e classificação de doenças (GAJJAR et al., 2013; LIMA et al., 2014; SANTOS et al., 2017; WEHBE; VEZZALINI; CINQUE, 2018; SILVA et al., 2020; BANERJE et al., 2021). No entanto, pouco ainda se sabe sobre a aplicabilidade dessa técnica na diferenciação de amostras de animais infectados com *L. infantum* (LARIOS et al., 2021).

Neste estudo, foi observado que ATR-FTIR mostrou-se eficiente na discriminação de amostras de soro de cães não infectados e infectados com *L. infantum* em diferentes formas clínicas. A identificação de amostras infectadas foi realizada com sucesso em três diferentes modelos supervisionados, SPA-LDA, SPA-SVM e GA-LDA, com precisão de classificação de 100%, representando os possíveis modelos de escolha para análise dos dados espectrais em amostras de cães infectados com *L. infantum*.

Em estudo desenvolvido por Larios e colaboradores, acurácia acima de 85% foi observada na diferenciação de amostras de soro de cães não infectados, infectados com *L. infantum* e infectados com *T. evansi*, usando a análise de componentes principais (PCA) com os algoritmos SVM e análise discriminante (DA) (LARIOS et al., 2021). Métodos supervisionados tentam descobrir uma função matemática, que representa a relação entre a matriz X de variáveis de entrada (valores de absorbância) e uma variável para prever (parâmetro clínico da amostra, por exemplo) (BZDOK; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2018).

Esses métodos são muito eficazes para encontrar correlações complexas entre a variável de entrada e um parâmetro clínico. A separação dos conjuntos de dados de calibração e validação das amostras biológicas é uma das partes principais do processo, e algoritmos como Kennard-Stone são usados para garantir a representatividade de ambos os conjuntos (DASZYKOWSKI; WALCZAK; MASSAR, 2002). Se a aplicação do modelo matemático consegue ser validada e apresenta boa acurácia, pode ser classificada como um bom modelo para diferenciação dessas amostras (PEREZ-GUAITA et al., 2012; PEREZ-GUAITA et al., 2013).

Neste estudo, algoritmo de projeções Sucessivas (SPA) e algoritmo genético (GA) melhoraram significativamente a homogeneidade e poder de classificação do

modelo LDA e SVM, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade para correta discriminação entre os grupos amostrais. O grupo infectado apresentou boa homogeneidade interclasse, mesmo com a inserção de amostras de soro de animais assintomáticos. Em estudos desenvolvidos em cães no Brasil, os imunoenaios preconizados para rotina de trabalho e vigilância mostram-se com valores de sensibilidade e especificidade controversas. Para o teste imunocromatográfico DPP, valores elevados de sensibilidade (98%) e especificidade (96%) são observados em animais sintomáticos, entretanto em animais assintomáticos, essa sensibilidade diminui para 47% (GRIMALDI et al., 2012).

Em relação ao ensaio de ELISA, o seu desempenho está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste. Foram demonstrados para o antígeno rK39, 58% de sensibilidade em cães assintomáticos e 96,7%, em sintomáticos, enquanto o antígeno solúvel de promastigotas não apresenta diferença entre sintomáticos e assintomáticos (sensibilidade de 100% em ambos os grupos) (METTLER et al., 2005). Em estudo desenvolvido por Lopes e colaboradores, o diagnóstico oficial de LV em cães em áreas endêmicas brasileiras não acusou um número expressivo de animais infectados e foi observado o impacto de uma baixa acurácia dos testes sorológicos, com um em cada cinco cães soronegativos estando infectados, confirmados por diagnóstico molecular (LOPES et al., 2017).

No presente estudo, os modelos SPA-LDA e SPA-SVM selecionaram 24 variáveis que foram responsáveis pela separação de classes (grupo controle e infectado). Estas incluíram região de amida I e II (1400-1700 cm^{-1}), vibrações de estiramento simétrico de fosfato e glicogênio (1000-1100 cm^{-1}), lipídeos (1740 cm^{-1}), e região de fosforilação proteica (900 cm^{-1} , 970 cm^{-1}). Para o modelo GA-LDA, cinco variáveis foram selecionadas, incluindo região de proteína, amida I (1650 cm^{-1}) e amida II (1470 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1550 cm^{-1}), e região de fosforilação proteica (900 cm^{-1}).

Frequências de absorção de pico identificáveis nessas diferentes regiões bioquímicas, especialmente em região de proteínas, já foram descritas em outros estudos para separação de *L. infantum* (AGUIAR et al; 2015, HORNEMANN et al., 2017; AGUIAR et al, 2018; LARIOS et al, 2021). A discriminação das classes ocorreu possivelmente pela detecção de alterações metabólicas ocasionadas pela infecção por *L. infantum*. A informação espectral responsável pela diferenciação dos grupos,

relacionada à região de proteínas, pode ser justificada pelo aumento dos níveis de anticorpos em resposta a antígenos de *L. infantum*. É observada grande produção de imunoglobulinas com maior proporção entre diferentes subclasses a depender da forma clínica desenvolvida pelo cão (GARCÍA-CASTRO et al., 2022).

No que concerne à fosforilação de proteínas, esta mostra um papel importante na transferência de informação dentro da célula, regulando vias de transdução de sinais, comunicação intercelular durante o desenvolvimento, e na ativação do sistema imune (RAGGIASCHI; GOTTA; TERSTAPPEN, 2005). Análises demonstram presença de fosfoproteínas que apresentam fosforilação estágio-específico para espécies de *Leishmania*, envolvidas em resposta ao estresse e choque térmico, renovação de RNA/proteína, metabolismo e sinalização (MORALES et al., 2008; MORALES et al., 2010; HEM et al., 2010).

As elevadas sensibilidade e especificidade associadas aos algoritmos de análise multivariada demonstram o potencial da espectroscopia de infravermelho médio, usando ATR-FTIR, para detecção de infecção por *L. infantum*. Pensando na implementação da espectroscopia combinada com modelos quimiométricos em possível rotina para LV, milhares de amostras são necessárias para aprimorar o modelo de classificação. Além disso, o analista deve considerar os fatores que podem gerar confusão e as fontes de variabilidade que precisam ser contempladas no experimento, como a similaridade com outros tripanossomatídeos, por exemplo (ZANETTE et al., 2014, PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015; MORAIS et al., 2019).

O desenvolvimento bem-sucedido deste método em uma rotina de vigilância epidemiológica pode auxiliar na otimização e no diagnóstico precoce de cães infectados, inclusive em animais assintomáticos. A prevalência de infecção por *L. infantum* é frequentemente elevada em cães em áreas endêmicas de LV, com uma grande proporção de assintomáticos (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006). Esses animais podem permanecer infectados por *L. infantum* sem exibir sinais clínicos aparentes de LV por anos e até mesmo por toda a vida e serem competentes em transmitir o parasito (MORENO; ALVAR, 2002; LAURENTI et al., 2013).

As abordagens espectroscópicas associadas a ferramentas quimiométricas são vantajosas em comparação com os métodos moleculares tradicionais, pois estas fornecem uma impressão bioquímica da amostra sob interrogação, gerando assim regiões amplamente conhecidas como "regiões de impressão digital". Esses métodos também se mostram rápidos, reduzem o custo com insumos, a necessidade de

pessoal, bem como mantém viável a amostra (não destrutivo), além de melhorar o desempenho diagnóstico (TREVISAN et al., 2012; JALES et al., 2021). No entanto, as técnicas de espectroscopia vibracional também apresentam algumas limitações como qualquer outro método analítico (BAKER et al., 2014).

Antes dos estudos com FTIR, a otimização de configurações instrumentais, como a preparação da amostra e o modo de operação também devem ser conduzidos a fim de melhorar sua qualidade e sensibilidade molecular. De forma geral, as barreiras acima mencionadas podem ser superadas após uma análise cuidadosa do projeto experimental (BAKER et al., 2014; ANDREW CHAN; KAZARIAN, 2016; PILLING; GARDNER, 2016). A aplicação de testes rápidos e simplificados desempenha um avanço para o diagnóstico da LV. Um método que apresente bom desempenho, combinado com facilidades na sua aplicação, proporciona maior acesso a serviços de diagnóstico da doença, principalmente, em áreas endêmicas (FIGUEIREDO et al., 2018).

5.5 CONCLUSÃO

A espectroscopia ATR-FTIR juntamente com a aplicação de análise multivariada proporciona o desenvolvimento de uma abordagem diagnóstica alternativa para leishmaniose visceral canina, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade. A aplicação de diferentes modelos matemáticos (SPA-LDA, SPA-SVM e GA-LDA) foi capaz de discriminar amostras de animais não infectados e infectados por *L. infantum* com elevada acurácia, independente da forma clínica apresentada pelo cão, podendo ser implementada como uma ferramenta útil e eficiente para detecção da infecção por *L. infantum*.

5.6 REFERÊNCIAS

1. ABDI, H.; WILLIAMS, L.J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, p. 433–459, 2010.
2. AGUIAR, G.M.; VIEIRA, V.R. Regional distribution and habitats of Brazilian phlebotomine species. In RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian sand flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Springer International Publishing, 2018.

3. AGUIAR, J.C. et al. Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 5, p. 80-85, 2015.
4. AGUIAR, J.C. et al. Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. **Exp Parasitol**, v. 192, p. 46-51, 2018.
5. AMI, D.; MEREGHETTI, P.; MARIA, S. **Multivariate analysis for Fourier transform infrared spectra of complex biological systems and processes**. In: Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences. [s.l.] InTech, 2013.
6. ANDREW CHAN, K.L.; KAZARIAN, S.G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chem Soc Rev**, v. 45, p. 1850–1864, 2016.
7. ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.
8. BAKER, M.J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc**, v. 9, p. 1771–1791, 2014.
9. BANERJEE, A. et al. Rapid classification of COVID-19 severity by ATR-FTIR spectroscopy of plasma samples. **Anal Chem**, v. 93, p. 10391-10396, 2021.
10. BORJA, L.S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet Parasitol**, v. 15, p. 110-117, 2016.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 122p.
12. BRO, R.; SMILDE, A.K. Principal component analysis. **Anal. Methods**, v. 6, p. 2812–2831, 2014.
13. BZDOK, M.D.; KRZYWINSKI, N. A. Machine learning: supervised methods. **Nature Methods**, v. 15, p. 5–6, 2018.
14. CHIRIBOGA, L.; YEE, H.; DIEM, M. Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VI: a comparative study of histopathology and infrared micro-spectroscopy of normal, cirrhotic, and cancerous liver tissue. **Applied Spectroscopy**, v. 54, p. 1-8, 2000.
15. CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Mach Learn**, v. 20, p. 273–297, 1995.
16. DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 48, p.151-156, 2006.

17. DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 54-60, 2006.
18. DASZYKOWSKI, M.; WALCZAK, B.; MASSART, D.L. Representative Subset Selection. **Anal Chim Acta**, v. 468, p. 91–103, 2002.
19. DAVIS, R.; MAUER, L.J. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy : A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Current Research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, 2010. p. 1582–1594.
20. DIXON, S.J.; BRERETON, R.G. Comparison of performance of five common classifiers represented as boundary methods: euclidean distance to centroids, linear discriminant analysis, quadratic discriminant analysis, learning vector quantization and support vector machines, as dependent on data structure. **Chemometr Intell Lab Syst**, v. 95, p. 1–17, 2009.
21. FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 3, p. 47-57, 2012.
22. FERREIRA, E.C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v. 146, p. 235-241, 2007.
23. FERREIRA, M.P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, p. 215-217, 2006.
24. FIFIELD, F.W.; KEALEY, D. **Principles and practice of analytical chemistry**, 5th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. p. 378–91.
25. FIGUEIREDO, F.B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, e180260, 2018.
26. GAJJAR, K. et al. Fourier-Transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: A novel diagnostic approach for ovarian cancer. **Analyst**, v. 138, 3917–3926, 2013.
27. GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 11, 273, 2018.
28. GARCÍA-CASTRO, A. et al. Humoral and cellular immune response in asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis: a review. **Vaccines**, v. 10, 947, 2022.

29. GENARO, O. et al. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 43, 1988.
30. GLASSFORD, S.E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S.G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, p. 2849-2858, 2013.
31. GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, p. 54–59, 2012.
32. HEM, S. et al. Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. **Proteomics**, v. 10, p. 3868-3883, 2010.
33. HIBBERT, D.B. Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations). **Pure Applied Chemistry**, v. 88, n. 4, 2016.
34. HORNEMANN, A. et al. A pilot study on fingerprinting *Leishmania* species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, p. 6907-6923, 2017.
35. JALES, J.T. et al. Spectroscopy and forensic entomology: can this union work? A literature review. **J forens science**, v. 66, p. 2080-2091, 2021.
36. JOHNSON, J.B.; NAIKER, M. Seeing red: A review of the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in entomology. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 55, p. 1-30, 2019.
37. KELLY, J.G. et al. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure : a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **J Proteom Res**, v. 10, p. 1437–1448, 2011.
38. KENNARD, R.W.; STONE, L.A. Computer-aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, p. 137-148, 1969.
39. LARIOS, G. et al. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. **J Biophotonics**, v. 14, e202100141, 2021.
40. LEMOS, E. M. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Trop**, v. 107, p. 205-207, 2008.
41. LIMA, M.G. et al. Classification of cervical cytology for human papilloma virus (HPV) infection using biospectroscopy and variable selection. **Analytical Methods**, p. 9643–9652, 2014.

42. LOPES, EG. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiol Infect**, v. 145, p. 2436-2444, 2017.
43. MARTIN, F.L. et al. Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. **Nat Protoc**, v. 5, p. 1748–1760, 2010.
44. MARY, C. et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in differential clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **Am J Med Trop Hyg**, v. 75, p. 858-863, 2006.
45. McCALL, J. Genetic algorithms for modelling and optimization. **J Comput Applied Mathematics**, v. 184, p. 205–222, 2005.
46. METTLER, M. et al. 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. **J Clin Microb**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.
47. MORAIS, C.L.M.; LIMA, K.M.G. Principal component analysis with linear and quadratic discriminant analysis for identification of cancer samples based on mass spectrometry. **J Braz Chem Soc**, v. 29, p. 472–481, 2018.
48. MORAIS, C.L.M. et al. Standardization of complex biologically derived spectrochemical datasets. **Nat Protoc**, v.14, p. 1546–1577, 2019.
49. MORAIS, C.L.M. et al. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. **Nat Protoc**, v. 15, p. 2143–2162, 2020.
50. MORAIS, C.L.M. et al. Variable selection with a support vector machine for discriminating *Cryptococcus* fungal species based on ATR-FTIR spectroscopy. **Anal. Methods**, v. 9, p. 2964–2970, 2017.
51. MORALES, M.A. et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 8381-8386, 2010.
52. MORALES, M.A. et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. **Proteomics**, v. 8, p. 350-363, 2008.
53. MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 399-405, 2002.
54. NICOLATO, R.C et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, v. 8, e82947, 2013.

55. PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological report of the Americas. **Rep leishmaniases**, n. 10, p. 1–10, 2021.
56. PEIXOTO, H.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; ROMERO, G.A.S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health**, v. 20, p. 334–352, 2015.
57. PEREZ-GUAITA, D. et al. Protein determination in serum and whole blood by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 404, p. 649–656, 2012.
58. PEREZ-GUAITA, D. et al. Evaluation of infrared spectroscopy as a screening tool for serum analysis impact of the nature of samples included in the calibration set. **Microchem J**, v. 106: p. 202-211, 2013.]
59. PILLING, M.; GARDNER, P. Fundamental developments in infrared spectroscopic imaging for biomedical applications. **Chem Soc Rev**, v. 45, p. 1935–1957, 2016.
60. RAGGIASCHI, R.; GOTTA, S., TERSTAPPEN, G.C. Phosphoproteome analysis. **Biosci Rep**, v. 25, p. 33-44, 2005.
61. READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol**, v. 3, p. 147-154, 2014.
62. REGINA-SILVA, S. et al. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Braz. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 47, p. 462-468, 2014.
63. SANTOS, M.C.D. et al. ATR-FTIR spectroscopy coupled with multivariate analysis techniques for the identification of DENV-3 in different concentrations in blood and serum : a new approach. **RSC Advances**, v. 7, p. 25640–25649, 2017.
64. SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Anal Chem**, v. 36, p. 1627–1639, 1964.
65. SILVA, E.S. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 285-291, 2001.
66. SILVA, L.G. et al. ATR-FTIR spectroscopy in blood plasma combined with multivariate analysis to detect HIV infection in pregnant women. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-7, 2020.
67. SOARES, S.F.C. et al. The successive projections algorithm. **Trends Analyt Chem**, v. 42, p. 84–98, 2013.
68. TREVISAN, J. et al. Extracting biological information with computational analysis of Fourier- transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: Current practices to future perspectives. **Analyst**, v. 137, p. 3202–3215, 2012.

69. WEHBE K, VEZZALINI M, CINQUE G. Detection of mycoplasma in contaminated mammalian cell culture using FTIR microspectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 410, p. 3003-3016, 2018.
70. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis epidemiological situation**, 2022. Disponível em: < www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: jul 2022.
71. ZANETTE, M.F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, p. 105-107, 2014.
72. ZARNOWIEC, P. et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a tool for the identification and differentiation of pathogenic bacteria. **Curr Med Chem**, v. 22, p. 1710-1718, 2015.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos capítulos da presente tese, resultados de análises sobre possíveis novas abordagens para controle e diagnóstico da LV foram apresentados e discutidos. No primeiro capítulo, o efeito inseticida do composto fluralaner, princípio ativo do Bravecto[®], foi avaliado contra fêmeas de *Lu. longipalpis* alimentadas em cães tratados. Durante os ensaios, altos níveis de mortalidade de *Lu. longipalpis* foram observados por até seis meses após o início do tratamento. Esse resultado incorpora informações relevantes para a discussão do desenvolvimento de novas ferramentas para controle da LV no Brasil.

Levando em consideração que os cães infectados são os principais animais reservatórios de *L. infantum* e desempenham papel essencial na transmissão do parasito ao homem em áreas urbanas, diversos estudos sobre estratégias de controle são voltados para esses animais. Pensando na utilização do fluralaner como uma possível abordagem de controle, este poderia tornar-se uma medida alternativa para diminuir as populações de *Lu. longipalpis* em áreas de risco a longo prazo. Os flebotomíneos, que se alimentarem do sangue de cães tratados, serão mortos antes de se tornarem infectantes, evitando assim a transmissão.

Além disso, pode-se considerar o medicamento como uma medida de proteção individual para cães infectados e em processo de tratamento. A utilização do Bravecto[®] poderia se tornar uma alternativa para o uso de compostos repelentes para o inseto durante o tratamento. Considerando o bem-estar do animal, esse cão permaneceria com cuidados e não haveria risco de transmissão para outros mamíferos, mantendo esse protocolo até esse animal permanecer clinicamente saudável.

A presente tese acrescenta informações inovadoras também sobre um método para detecção da infecção por *L. infantum* em cães. No segundo capítulo, a bioespectroscopia por meio do ATR-FTIR foi avaliada juntamente com a quimiometria para separar amostras de soro de cães infectados ou não com *L. infantum*. A identificação das amostras infectadas foi realizada com sucesso em três diferentes modelos supervisionados, como demonstrado, com acurácia de 100%. O desenvolvimento bem-sucedido deste método em uma rotina de vigilância epidemiológica pode auxiliar na otimização e no diagnóstico precoce de cães

infectados, inclusive em animais assintomáticos, podendo ser utilizado como uma ferramenta para triagem da infecção por *L. infantum*.

Dessa forma, esta técnica direcionaria animais “positivos” para confirmação por sorologia, pensando em reduzir custos e garantir a confirmação da infecção nesses animais. A bioespectroscopia associada a análise multivariada apresenta alta frequência analítica, reduz o custo com insumos, e mantém a viabilidade da amostra para ser usada em outros ensaios. Ademais, este método pode possivelmente contornar limitações presentes nos testes laboratoriais usados na rotina.

A LV é um crescente problema de saúde pública no mundo e encontra-se em franca expansão geográfica no Brasil nos últimos anos. Essa expansão, observada nas cinco regiões brasileiras, está ligada a inúmeros fatores, como mencionado anteriormente, que incluem falhas nas medidas de controle preconizadas, negligência com o vetor, como também o uso de métodos de diagnóstico laboratorial que podem apresentar baixa acurácia na detecção da infecção por *L. infantum*.

Neste contexto, este trabalho forneceu subsídios científicos capazes de ampliar o conhecimento sobre novas ferramentas para controle e diagnóstico da LV no Brasil. Considerando a implementação dessas estratégias como novas medidas de saúde pública para a redução de casos de LV, estudos devem ser conduzidos, envolvendo intervenções em larga escala, em áreas controladas e endêmicas para a LV, com a finalidade de avaliar a viabilidade dessas medidas em possível rotina.

Em relação a estudos para avaliar o fluralaner em larga escala, devem ser considerados o impacto da estratégia de controle na fauna flebotomínica, a incidência de casos caninos e humanos, e a custo-efetividade dessa medida quando comparada a outras já preconizadas para controle da LV. No que concerne ao uso da bioespectroscopia associada a quimiometria para detecção da infecção por *L. infantum* em cães, estudos devem ser desenvolvidos com a inserção de milhares de amostras de animais infectados em diferentes localidades do Brasil, inclusive por outros tripanossomatídeos, para aprimorar o modelo de classificação, a fim de considerar as fontes de variabilidade que precisam ser contempladas e o modelo ser capaz de discriminar animais infectados de animais não infectados.

Por fim, a impopularidade e complexidade da execução das atividades voltadas para o manejo de reservatórios, além das limitações dos testes laboratoriais usados como rotina, devem impulsionar o próprio Ministério da Saúde a priorizar o estudo de medidas alternativas no âmbito da pesquisa científica. Além disso, deve-se pensar

especialmente em ações integradas com a educação em saúde, com o propósito de que ferramentas inovadoras e com elevada aplicabilidade sejam de fato disseminadas e implementadas nas diferentes regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L.J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, p. 433–459, 2010.
- ABU-MOSTAFA, Y.S.; MAGDON-ISMAIL, M.; LIN, H.T. Learning from data, AMLBook, 2012.
- AGUIAR, G.M.; VIEIRA, V.R. Regional distribution and habitats of Brazilian phlebotomine species. In RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian sand flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Springer International Publishing, 2018.
- AGUIAR, J.C. et al. Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 5, p. 80-85, 2015.
- AGUIAR, J.C. et al. Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. **Exp Parasitol**, v. 192, p. 46-51, 2018.
- AHN, C.W. Advances in Evolutionary Algorithms: Theory, Design and Practice. V. 8, Springer-Verlag, Berlin.
- ALENCAR, R.B. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. **Acta Amaz**, v. 37, p. 287-292, 2007.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Med Vet. Entomol**, v. 17, p. 1-18, 2003.
- ALLEN, K. et al. Evaluation of oral fluralaner (Bravecto®) for efficacy against nymphs of *Amblyomma americanum* and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasit Vectors**, v. 13, 315, 2020.
- ALMEIDA, P.S. et al. Ecological aspects of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Ponta Porã municipality, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 723-727, 2010.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, p. 371– 378, 1994.
- ALVAR, J. et al. WHO Leishmaniasis Control Team, the W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. 1–12, 2012.
- ALVES, E.B. et al. Dificuldades operacionais no uso de coleiras caninas impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose visceral, Montes Claros, MG, 2012. **Epidemiol Serv Saude**, v. 27, e2017469, 2018.

ALVES, E.B. et al. Effectiveness of insecticide-impregnated collars for the control of canine visceral leishmaniasis. **Prev Vet Med**, v. 182, 105104, 2020.

AMI, D.; MEREGHETTI, P.; MARIA, S. **Multivariate analysis for Fourier Transform Infrared Spectra of complex biological systems and processes**. In: Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences. [s.l.] InTech, 2013.

ANDRADE, A.R. et al. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, state of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, p. 488-493, 2009.

ANDRADE FILHO, J.D. et al. Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **J Med Entomol**, v. 54, p. 1430-1434, 2017.

ANDRADE FILHO, J.D. et al. Sazonalidade dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) dos arredores da gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. **Rev Bras Entomol**, v. 42, p. 93-95, 1998.

ANDRADE, H.M. et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 231-238, 2006.

ARAUJO, M.C.U. et al. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. **Chem Intel Lab Systems**, v. 57, p. 65-73, 2001.

ASAHI, M. et al. Differential mechanisms of action of the novel γ -aminobutyric acid receptor antagonist ectoparasiticides fluralaner (A1443) and fipronil. **Pest Manag Sci**, v. 71, p. 91-95, 2014.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, R.W. What it takes to be a reservoir host. **Belgian Journal of Zoology**, v. 127, p. 85-90, 1997.

ASSIS, T.M. et al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 53, e20200680, 2020.

AUSILI, A.; SÁNCHEZ, M.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. **Biomed Spect Imaging**, v. 4, p. 159-170, 2015.

BADARO R. et al. Evaluation of micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies in American visceral leishmaniasis antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 35, p. 72-78, 1986a.

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 154, p. 1003-1011, 1986b.

BADARO, R. et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 3, p. 758-761, 1996.

BADARO, R.; REED, S.G.; CARVALHO, E.M. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensibility and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, p. 480-484, 1983.

BAKER, M.J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature protocols**, v. 9, p. 1771-1791, 2014.

BALBINO, V.Q. et al. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Trop**, v. 98, p. 15-24, 2006.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 4, p. 324-330, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 106, p. 315–324, 2002.

BARATA, R.A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, p. 421-425, 2005.

BARZILAY, O.; BRAILOVSKY, V.L. On domain knowledge and feature selection using a support vector machine. **Pattern Recognition Letters**, v. 20, p. 475-484, 1999.

BASSO, M.A. et al. Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. **J. Feline Med, Surg. Open Rep**, 2016.

BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, v. 4, p. 601-609, 2004.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Paras**, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BATISTA, J.F. et al. Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 29, 2020.

BERROZPE, P. et al. Environmental suitability for *Lutzomyia longipalpis* in a subtropical city with a recently established visceral leishmaniasis transmission cycle, Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 674–680, 2017.

BONGIORNO, G. et al. A single oral dose of fluralaner (Bravecto®) in dogs rapidly kills 100% of blood-fed *Phlebotomus perniciosus*, a main visceral leishmaniasis vector, for at least 1 month after treatment. **Med Vet Entomol**, v. 34, p. 240–243, 2019.

BONGIORNO, G. et al. Insecticidal efficacy against *Phlebotomus perniciosus* in dogs treated orally with fluralaner in two different parallel-group, negative-control, random and masked trials. **Parasit Vectors**, v. 15, 18, 2022.

BORJA, L.S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet Parasitol**, v. 15, p. 110-117, 2016.

BRAGA, R.R. et al. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 143-145, 1986.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, p. 291-296, 2003.

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

BRASIL. Decreto nº 51.838 de 14 de março de 1963. Baixa normas técnicas especiais para o combate as leishmanioses, 1963.

BRASIL. Instrução normativa interministerial nº 31, de 9 de julho de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 3v. 286p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 122p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Validação dos kits de diagnóstico da leishmaniose visceral canina - Relatório Técnico, 2011a.

BRASIL. Nota técnica conjunta nº 01/2011- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011b.

BRASIL. Nota técnica conjunta nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, 2016.

BRASIL. Nota técnica Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS, 2021.

BRAZIL, R.P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, p. 263–264, 2013.

BRERETON, R. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2003.

BRIANTI, E. et al. Field evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniasis in a highly endemic area. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, e0004987, 2016.

BRO, R.; SMILDE, A. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2812–2831, 2014.

CAMPINO, L.M. In: FARREL, J. ed.: **World Class Parasites: Leishmania**, v. 4. Kluwer Academic Publishes, 2003.

CAMPOS, A.M. et al. Photoperiod differences in sand fly (Diptera: Psychodidae) species, richness and abundance in caves in Minas Gerais state, Brazil. **J Med Entomol**, v. 54, p 100–105, 2017.

CARRASCO, J.; MORRISON, A.; PONCE, C. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 92, p. 869-876, 1998.

CARRIÓN, J. et al. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. **Parasit Vectors**, v. 27, e150, 2011.

CARVALHO, F.A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, p. 289–295, 2002.

CARVALHO, F. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiol Infect**, v. 146, p. 571-576, 2018.

CARVALHO, M.R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 16, p. 108-110, 2010.

CARVALHO, S.F.G. et al. Performance of recombinant K39 antigen in diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, p 321-324, 2003.

CASANOVA, C. A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 273-275, 2001.

CASANOVA, C. et al. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, e2443, 2013.

CEVA. **Lista de Produtos–Leish-Tec**, 2022. Disponível em: <www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/LEISH-TEC>. Acesso em: jun 2022.

CHANG, Y. W. et al. Training and testing low-degree polynomial data mappings via linear SVM. **J Mach Learn Research**, v. 11, p. 1471–1490, 2010.

CHAVES, L.F. et al. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. **Trends in Parasitol**, v. 23, p. 311-316, 2007.

CHAVES JR, S.P.; SHIMABUKURO, P.H.F.; ANDRADE, A.J. Description of the female and redescription of the male of *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), including the description of four new species of the genus *Sciopemyia* Barretto, 1962 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 5195, p. 301-336, 2022.

CHIRIBOGA, L.; YEE, H.; DIEM, M. Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VI: a comparative study of histopathology and infrared micro-spectroscopy of normal, cirrhotic, and cancerous liver tissue. **Applied Spectroscopy**, v. 54, p. 1-8, 2000.

CHIUMMO, R. et al. Efficacy of orally and topically administered fluralaner (Bravecto®) for treatment of client-owned dogs with sarcoptic mange under field conditions. **Parasit Vectors**, v. 13, e524, 2020.

CHOI, C.M.; LERNER, E.A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 6, p. 175-182, 2001.

CORREDOR, A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 40, p. 480-486, 1989.

COSTA, C.H.N. 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**, v. 44, p. 232-242, 2011.

COSTA, D.N.C.C. et al. Culling Dogs in scenarios of imperfect control: Realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, e2355, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, v. 9, e91009, 2014.

COURTENAY, O. et al. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLOS Pathogens**, v. 13, e1006571, 2017.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1314–1320, 2002.

COURTENAY, O. et al. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 90, p. 498-502, 1996.
CUNHA, R.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, p. 269–273, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 48, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**, v. 2, p. 1-8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol**, v.28, p. 531-538, 2012.

DAVID, J.R. et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 839-847, 2001.

DAVIS, R.; MAUER, L.J. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy : A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Current Research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, 2010. p. 1582–1594.

DE ANDRADE, A.R.O. et al. Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasit Vectors**, v. 7, e260, 2014.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em áreas endêmicas de Calazar, no Ceará. **Hospital**, v. 48, p. 79-98, 1955.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p.198–212, 1962.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, J.S. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, p. 341-352, 1999.

DHIMAN, C.; YADAV, R.S. Insecticide resistance in phlebotomine sand flies in Southeast Asia with emphasis on the Indian subcontinent. **Infect. Dis. Poverty**, v. 5, p. 106, 2016.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**, v. 3, e276, p. 276-287, 2012.

DRYDEN, M.W. et al. Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto®) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. **Parasit Vectors**, v. 8, e364, 2015.

DRUZIAN, A.F. et al. Risk factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil. **PLoS negl trop dis**, v. 9, e0003982, 2015.

DUTHIE, M.S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v. 34, p. 881-890, 2018.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, p. 125-130, 1996.

EVANS, T.G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis**, v. 166, p. 1124-1132, 1992.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). CVMP assessment report for Bravecto (EMA/V/C/002526/0000). London, 2014. 22p.

EZRA, N.; OCHOA, M.T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, p. 248-257, 2010.

FALCÃO DE OLIVEIRA, E. et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, e5401, 2017.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. **Med Vet Entomol**, v. 18, p. 7061-7067, 2004.

FENG, B. et al. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. **Anal Chim Acta**, v. 15, p. 75-82, 2020.

FERNANDES, C.B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 5, p. 1287-1295, 2014.

FERNÁNDEZ, M.S. et al. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Trop**, v. 114, p. 81–87, 2010.

FERREIRA, E.C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet Parasitol**, v. 146, p. 235-241, 2007.

FERREIRA, G.R. et al. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, p. 126-133, 2018.

FERRO, C. et al. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol**, v. 34, p. 719-728, 1997.

FERROGLIO, E; POGGI, M; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of 65% Permethrin Spot-on and Deltamethrin-impregnated Collars for Canine *Leishmania infantum* Infection Prevention. **Zoo Public Health**, v. 5, p. 145-148, 2008.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, e180260, 2018.

FOGLIA MANZILLO, V. et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet Parasitol**, v. 142, p. 142-145, 2006.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher/ Universidade de São Paulo, 4ed., 1973.

FOURIE, J.J. et al. Efficacy of orally administered fluralaner (Bravecto™) or topically applied imidacloprid/moxidectin (Advocate®) against generalized demodicosis in dogs. **Parasit Vectors**, v. 8, e187, 2015.

FOURIE, J.J.; MEYER, L.; THOMAS, E. Efficacy of topically administered fluralaner or imidacloprid/moxidectin on dogs with generalised demodicosis. **Parasit Vectors**, v.12, e59, 2019.

FRAGA, D.B.M. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Vet Parasitol**, v. 190, p. 591-594, 2012.

FUJIWARA, R.T. et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**, v. 36, p. 827-838, 2005.

GALATI, E.A.B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.

GALATI, E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa. In RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian sand flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Springer International Publishing, 2018.

GALATI, E.A.B. Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. **Bol Dir Mal San Amb**, v. 35, p. 133-42, 1995.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 11, 273, 2018.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Detection of *Pintomyia fischeri* (Diptera: Psychodidae) With *Leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) Promastigotes in a Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil, **J Med Entomol**, v. 58, p. 830–836, 2021.

GARCÍA-REYNAGA, P. et al. New GABA/Glutamate receptor target for [³H]isoxazoline insecticide. **Chem Res Toxicol**, v. 26, p. 514–516, 2013.

GASSEL, M. et al. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 45, p. 111–124, 2014.

GASTEIGER, J.; ENGEL, T. **Chemoinformatics**. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.

GAVGANI, A.S.M. et al. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, v. 360, p. 374-379, 2002.

GEYER, J; JANKO, C. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, p. 969–986, 2012.

GIUNCHETTI, R.C. et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, p. 623-638, 2008.

GIUNCHETTI, R.C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J Comp Pathol**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GLASSFORD, S.E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S.G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, p. 2849-2858, 2013.

GOMES, R.B. et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Tran R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, p. 127-133, 2007.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C. et al. *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. **Parasitol**, v.144, p. 1980-1986, 2017.

GOMEZ, S.A. et al. A randomized, blinded, controlled trial to assess sand fly mortality of fluralaner administered orally in dogs. **Parasit Vectors**, v. 11, e627, 2018a.

GOMEZ, S.A. et al. Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs. **Parasit Vectors**, v. 11, e230, 2018b.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, p. 338–349, 2004.

GORDON, R.; CREWE, W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. **Annu Trop Med Parasit**, v. 42, p. 335-356, 1952.

GOSSAGE SM, ROGERS ME, BATES PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int J Parasitol**, v. 33, p. 1027-1034, 2003.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Vet Parasitol**, v. 208, p. 94–100, 2015.

GRAEPP-FONTOURA, I. et al. Epidemiological aspects and spatial patterns of human visceral leishmaniasis in Brazil. **Parasitol**, v. 147, p. 1665-1677, 2020.

GRAMER, I. et al. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. **Vet J**, v. 189, p. 67–71, 2011.

GRAMICCIA, M.; GRANDONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control (Invited review). **Int J Parasitol**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GRIFFITHS, P.R; HASETH, J.A. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy**, 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc. 2007.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, p. 54–59, 2012.

GRIMALDI, G. et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**, v. 12, e0185438, 2017.

GUIMARÃES, V.C.F.V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit Vectors**, v. 9, e159, 2016.

GÜRTLER, R.E. et al. Treatment of dogs with fluralaner reduced pyrethroid-resistant *Triatoma infestans* abundance, *Trypanosoma cruzi* infection and human-triatomine contact in the Argentine Chaco. **Parasit Vectors**, v. 15, 25, 2022.

HANDMAN, E; BULLEN, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v.18, p. 332-334, 2002.

HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 403–409, 2011.

HAYDON, D.T. et al. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 1468-1473, 2002.

HERAUD, P.; TOBIN, M.J. The emergence of biospectroscopy in stem cell research. **Stem Cell Res**, v. 3, p. 12-14, 2009.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HIBBERT, D.B. Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations). **Pure Applied Chemistry**, v. 88, n. 4, 2016.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. **Bull Inst Pasteur**, v. 75, p. 5-102, 1978.

HORNEMANN, A. et al. A pilot study on fingerprinting *Leishmania* species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, p. 6907-6923, 2017.

HOSHINO, T. et al. Long-term follow-up of a single dose of fluralaner in nine dogs with demodicosis. **Vet Dermatology**, v. 32, p. 368, e102, 2021.

HUMBERG, R.M. et al. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, p. 470-472, 2012.

International Union of Pure and Applied Chemistry. A glossary of concepts and terms in chemometrics. **Chemistry Int**, v. 30, n. 6, 2008.

JAIN, A.; DUIN, P. Statistical pattern recognition: a review. **IEEEET Pattern Anal**, v. 22, p. 4–37, 2000.

JAIN, K.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J Immunol Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

JANSEN, A.M; ROQUE, A.L.R. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. In: Tellerian, J. Tibyarenc, M (eds)., **American Trypanosomiasis - Chagas Disease**, Elsevier, London, 2010.

JERONIMO, S.M. et al. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow up. **Clin Infect Dis**, v. 30, p. 608-609, 2000.

JOHNSON, J.B.; NAIKER, M. Seeing red: A review of the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in entomology. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 55, p. 1-30, 2019.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, p. 439-445, 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat Rev Microb**, v. 9, p. 604–615, 2011.

KAZARIAN, S.G.; CHAN, K.L. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. **Biochim Biophys Acta**, v. 1758, p. 858–865, 2006.

KAZIMOTO, T.A. et al. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 18, p. 356-363, 2018.

KELLY, J.G. et al. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure : a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **J Proteom Res**, v. 10, p. 1437–1448, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 11, p. 105-111, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.J.; READY, P.D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 13, p. 429-440, 1977.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol**, v. 4, p. 1–24, 1990a.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, v. 17, p. 279-289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Comp Hum**, v. 65, p. 37–42, 1990b.

KILP, S. et al. Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. **Parasit Vectors**, v. 7, e85, 2014.

KOWALSKI, B.R.; BEEBE, K.R. An Introduction to Multivariate calibration and Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1007–1017, 1987.

LACERDA, M.M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 489-495, 1994.

LAIÑO, M.A. et al. An oral dose of fluralaner administered to dogs kills pyrethroid-resistant and susceptible Chagas disease vectors for at least four months. **Vet Parasitol**, v. 266, p. 98-104, 2019.

LAIÑO, M.A. et al. Control of pyrethroid-resistant populations of *Triatoma infestans*, the main vector of *Trypanosoma cruzi*, by treating dogs with fluralaner in the Argentine Chaco. **Med Vet Entomol**, v. 36, p. 149-158, 2022.

LAINSON, R. et al. **A Leishmania e as leishmanioses**. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Serviços de Saúde Pública, Belém, Pará, 1986. p. 83-124.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, p.135–137, 1990.

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, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **Evolution, classification and geographical distribution**. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, London: Academic Press, v. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 63, p. 134-145, 1988.

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

LAURENTI, M.D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet Parasitol**, v. 196, p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M.D. et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 205, p. 444-450, 2014.

LEMESRE, J.L. et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, p. 4223-4234, 2007.

LEMIRANI, M. et al. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. **J Infect Dev Ctries**, v. 3, p. 115-122, 2009.

- LETENDRE, L. et al. The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs. **Vet Parasitol**, v. 201, p. 190–197, 2014.
- LIMA, M.G. et al. Classification of cervical cytology for human papilloma virus (HPV) infection using biospectroscopy and variable selection. **Analytical Methods**, p. 9643–9652, 2014.
- LINDOSO, J.A.L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV AIDS (Auckl)**, v. 10, p. 193-201, 2018.
- LOPES, EG. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiol Infect**, v. 145, p. 2436-2444, 2017.
- LOPES, E.G. et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of Leishmania infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 146, p. 401-406, 2018.
- LOZA, A. et al. Systemic insecticide treatment of the canine reservoir of *Trypanosoma cruzi* induces high levels of lethality in *Triatoma infestans*, a principal vector of Chagas disease. **Parasit. Vectors**, v. 10, 2017.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 82-95, 1912.
- LUZ, Z.M.P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, p. 249-254, 2001.
- MACHADO DE ASSIS, T.S. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde**, v.17, p.105-116, 2008.
- MADEIRA, M.F et al. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 8, p. 440-444, 2004.
- MAIA, C. et al. First case of feline leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. **J. Feline Med. Surg. Open Rep.** 1, 2015.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol**, v.158, p.274-287, 2008.
- MANCIANTI, F. et al. 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**, v. 82, p. 566-567, 1988.

- MANZILLO, V.F. et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet Parasit**, v. 142, p. 142-145, 2006.
- MARCONDES, C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomological News**, v. 118, p. 351-356, 2007.
- MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol**, v. 145, p. 357–360, 2007.
- MARTIN, F.L. et al. Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. **Nat Protoc**, v. 5, p. 1748–1760, 2010.
- MARTINS, V.T. et al. A *Leishmania*- specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 8, 363, 2015.
- MARY, C. et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in differential clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **Am J Med Trop Hyg**, v. 75, p. 858-863, 2006.
- MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-357, 1985.
- McCALL, J. Genetic algorithms for modelling and optimization. **J Comput Applied Mathematics**, v. 184, p. 205–222, 2005.
- MEADOWS, C.; GUERINO, F.; SUN, F. A randomized, blinded, controlled USA field study to assess the use of fluralaner topical solution in controlling feline flea infestations. **Parasit Vectors**, v. 10, e37, 2017.
- MEALEY, K.L. et al. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. **Pharmacogenetics**, v. 11, p. 727–733, 2001.
- MENDONÇA, I.L. et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol**, v. 280, 109058, 2020.
- MENDONÇA, I.L. et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Rev Inst Trop Med São Paulo**, v. 59, e39, 2017.
- METTLER, M. et al. 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. **J Clin Microb**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.

METZDORF, I.P. et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 166, p. 121-125, 2017.

MICHALSKY, É.M. et al. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1191–1193, 2009.

MIGONE, L.E. Um caso de kala-azar à Assuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société Pathologie Exotique**, v. 6, p.118-120, 1913.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**, v. 24, p. 371-377, 2008.

MISSAWA, N.A.; DIAS, E.S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p. 913–918, 2007.

MISSAWA, N.A. et al. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 76–78, 2011.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 365-368, 2008.

MORAIS, A.N. et al. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, p. 225–229, 2013.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 399-405, 2002.

MOREIRA, E.D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, p. 393–397, 2003.

MORRISON, A.C. et al. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol**, v. 30, p. 427-35, 1993.

MORRISON, A.C. et al. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol**, v. 32, p. 538-548, 1995.

MSD. **Scalibor**®, 2022. Disponível em: < <https://www.msd-saude-animal.com.br/produto/scalibor/>>. Acesso em: jun 2022.

OBINAJU, B.E.; MARTIN, F.L. Novel biospectroscopy sensor technologies towards environmental health monitoring in urban environments. **Environ Pollut**, v. 183, p. 46-53, 2013.

OLIVEIRA, A.G. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop**, v. 105, p. 55–61, 2008.

OLIVEIRA, A.M. et al. Dispersion of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: identification of associated factors through survival analysis. **Parasit Vectors**, v. 11, e503, 2018.

OLIVEIRA, A.R. et al. Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. **PLOS Neg Trop Dis**, v. 13, e0007313, 2019.

ORTEGA-PACHECO, A. et al. Evaluation of the effectiveness of fluralaner against adult stages of *Rhodnius prolixus* in dogs. **Parasitol Inter**, v. 87, 102508, 2022.

OTRANTO, D. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. **Vet Parasitol**, v. 251, p. 68-77, 2018.

OZOE, Y. et al. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, p. 744-749, 2010.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 510–517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, p. 1–15, 2012.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological report of the Americas. **Rep leishmaniases**, n. 10, p. 1–10, 2021.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas. 2ed, p. 1-160, 2022a.

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Unprecedented progress against neglected tropical diseases reported**, 2022b. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13172:unprecedented-progress-against-neglected-tropical-diseases-reported&Itemid=1926&lang=en#gsc.tab=0>. Acesso em: jun de 2022.

PARK, C.H.; PARK, H. A comparison of generalized linear discriminant analysis algorithms. **Pattern Recognition**, v. 41, p. 1083-1097, 2008.

- PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, e822, 2010.
- PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Med**, v. 18, p. 940-950, 1934.
- PENNISI, M.G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasit Vectors**, v. 8, 302. H, 2015.
- PEIXOTO, H.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; ROMERO, G.A.S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health**, v. 20, p. 334–352, 2015.
- PETERSON, A.T. et al. Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Psychodidae: Phlebotominae). **Int J Parasitol**, v. 47, p. 667–674, 2017.
- PIMENTA, P. et al. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). **Vet Parasitol**, p. 65–69, 2015.
- PIMENTA, P.F.P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359-369, 1997.
- PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Ac Trop**, v. 107, p. 66-69, 2008.
- PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol**, v. 4, p. 544-548, 2007.
- POTIER, O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation. **J Biotechnol**, v. 113, p. 211–230, 2004.
- PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 561-566, 2011.
- QUARESMA, P.F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med and Hyg**, v. 105, p. 579-585, 2011.
- QUEIROGA, T.B.D. et al. Insecticidal efficacy of fluralaner (Bravecto®) against *Triatoma brasiliensis*, a major vector of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 14, e456, 2021.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitol**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

QUINNELL, R.J. et al. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitol**, v. 115, p. 143-156, 1997.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003. 367p

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 12, p. 2948-2952, 2008.

RANJAN, S., YOUNG.; SUN, F. A single topical fluralaner application to cats and to dogs controls fleas for 12 weeks in a simulated home environment. **Parasit Vectors**, v.11, 385, 2018.

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

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol**, v. 3, p. 147-154, 2014.

REGINA-SILVA, S. et al. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Braz. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 47, p. 462-468, 2014.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, p. 2233–2239, 2016.

REIS, A.B. et al. Systemic and compartmentalized immune responses in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopa**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REIS, L.L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, p. 638-645, 2017.

REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **Int. J Parasitol**, v. 34, p. 55-62, 2004.

RICHTER, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; KRUDEWIG, C. Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. **Schweiz. Arch. Tierheilkd**, v. 156, p. 289–294, 2014.

ROCHA, D.A. et al. Methods for detecting insecticide resistance in sand flies: a systematic review, **Acta Trop**, p. 105747, 2020.

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

ROHDICH, N., ROEPKE, R.K.A., ZSCHIESCHE, E. A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. **Parasit Vectors**, v. 7, e83, 2014.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, e584, 2010.

ROQUE; A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas, **Int J Parasit: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251–262, 2014.

ROQUE, A.L.R. et al. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, e589, 2010.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **Br Med J**, v. 2, p. 1401, 1903.

RÜFENACHT, S. et al. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **Vet Rec**, v. 156, p. 542-545, 2005.

RUFENER, L. et al. The novel isoxazoline ectoparasiticide lotilaner (Credelio™): a non-competitive antagonist specific to invertebrate γ -aminobutyric acid-gated chloride channels (GABACs). **Parasit Vectors**, v. 10, e530, 2017.

SACKS, D. L. et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformation changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **J Exp Med**, v. 181, p. 685-697, 1995.

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

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417–1419, 1984.

SALOMÓN, O.D. et al. Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Providence of Corrientes, 2008. **Medicina**, v. 69, p.625-630, 2009.

SALOMÓN, O.D. et al. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 831–846, 2015.

SALOMÓN, O.D.; ORELLANO, P.W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475–476, 2005.

SANGIORGI B. et al. Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia state. **Brazil. J Trop Med**, 124068, 2012.

SANTINI, M.S. et al. Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. **Med Vet Entomol**, v. 32, p. 197-120, 2017.

SANTOS, A.A. et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, p. 85–193, 2007.

SANTOS, C. et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Res Microbiol**, v. 161, p.168-75, 2010.

SANTOS, M.C.D. et al. ATR-FTIR spectroscopy coupled with multivariate analysis techniques for the identification of DENV-3 in different concentrations in blood and serum : a new approach. **RSC Advances**, v. 7, p. 25640–25649, 2017.

SANTOS, M.C.D. et al. Molecular fluorescence spectroscopy with multi-way analysis techniques detects spectral variations distinguishing uninfected serum versus dengue or chikungunya viral infected samples. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-13, 2020.

SANTOS, S.O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SANTOS, T.R. et al. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. **Ac Trop**, v.140, p.137-140, 2014.

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

SCHALLIG, H.D. et al. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vect Born Zoo Dis**, v. 7, p. 387-393, 2007.

SCHMITT, J.; FLEMMING, H. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 1-11, 1998.

SCHONIAN, G. et al. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends Parasitol**, v. 24, p.135-42, 2008.

SECUNDINO, N.F.C. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. **J Med Entomol**, v. 42, p. 928-938, 2005.

- SERAFIM, T.D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nat Microbiol**, v.3, p. 548-555, 2018.
- SEVÁ, A.P. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, e0160058, 2016.
- SEVÁ, A.D.P. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLOS Negl Trop Dis**, v. 11, e0005353, 2017.
- SEVÁ, A.D.P.; FERREIRA, F.; AMAKU, M. How much does it cost to prevent and control visceral leishmaniasis in Brazil? Comparing different measures in dogs. **PLoS ONE**, v. 15, e0236127, 2020.
- SHARMA, A.; PALIWAL, K.K. Linear discriminant analysis for the small sample size problem: an overview. **Int J Mach Learn Cyber**, 2014.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.
- SHERLOCK, I.A. **Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos**. In RANGEL, E.F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p.15-21.
- SHERLOCK, I.A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.
- SHIMABUKURO, P.H.F.; DE ANDRADE, A.J.; GALATI, E.A.B. Check-list of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, p. 67–106, 2017.
- SHOOP, W.L. et al. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. **Vet Parasitol**, v. 201, p. 179–189, 2014.
- SILVA, E.A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M.R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, p. 420–425, 2007.
- SILVA, E.S. et al. Application of Direct Agglutination Teste (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 4, p. 1-5, 2005.
- SILVA, E.S. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 285-291, 2001.
- SILVA, L.G. et al. ATR-FTIR spectroscopy in blood plasma combined with multivariate analysis to detect HIV infection in pregnant women. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-7, 2020.

SILVA, R.A. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Rev Bras Parasitol Veterinária**; v. 2961, p. 320–327, 2014.

SILVA, R.A. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, e170377, 2018.

SILVA, S.M.S. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 174, p. 150-154, 2010.

SILVEIRA, F.T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, p. 529-535, 2010.

SILVEIRA, T.F. et al. Leishmaniose cutânea experimental III—aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Primates: Cebidae) por *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, p. 387–394, 1990.

SINAN, 2022. Leishmaniose visceral - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: jul de 2022.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SMITH, B. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. 2nd edition, 2011.

SOARES, S.F.C. et al. The successive projections algorithm. **Trends Analytical Chemistry**, v. 42, 2013.

SOLANO-GALLEGO et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends Parasitol**, v. 33, n. 9, 2017.

SOUZA, N.A; BRAZIL, R.P; ARAKI, A.S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 161-174, 2017.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, p. 1-6, 2011.

STANNECK, D. et al. Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. **Parasit Vectors**, v. 31, e66, 2012.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**, 1st ed. England: John Wiley and Sons Inc. 2005.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, p. 951-958, 2002.

TAENZLER, J. et al. Onset of activity of fluralaner (Bravecto™) against *Ctenocephalides felis* on dogs. **Parasit Vectors**, v. 7, e567, 2014.

TAENZLER, J. et al. Efficacy of fluralaner against *Otodectes cynotis* infestations in dogs and cats. **Parasit Vectors**, v. 10, e30, 2017.

TAHA, M. et al. Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of Yeasts isolated from human and animals. **Int J Vet Science Medicine**, v. 1, p. 15–20, 2013.

TEODORO, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev Saude Publica**, v. 27, p. 242–249, 1993.

TOYOTA, M. et al. Efficacy of orally administered fluralaner in dogs against laboratory challenge with *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Parasit Vectors**, v. 12, 43, 2019.

TRAVI, B.L. et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am JTrop Med Hyg**, v. 50, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B.L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomedica**, v. 34, p. 7–12, 2014.

TRENCH, F.J.P. et al. First report of autochthonous visceral leishmaniosis in humans in Foz do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Ann Clin Cytol Pathol**, v. 2, e1041, 2016.

TREVISAN, J. et al. Extracting biological information with computational analysis of Fourier- transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: Current practices to future perspectives. **Analyst**, v. 137, p. 3202–3215, 2012.

VIANNA, E.N. et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral *Leishmaniasis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 302-310, 2016.

VIEIRA, J.B.; LACERDA, M.M.; MARSDEN, P.D. National reporting of Leishmaniasis: the Brazilian experience. **Parasit Today**, v. 10, p. 339-340, 1990.

WALTERS, L.L. et al. Formation and compositions of the peritrophic membrane in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotomidae). **J Med Entomol**, v. 30, p. 179-198, 1993.

- WALTERS, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. **J Euk Microbiol**, v. 40, p. 196-206, 1993.
- WALTHER, F.M. et al. Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(-/-) Collies after oral administration. **Parasit Vectors**, v. 7, e86, 2014a.
- WALTHER, F.M. et al. Safety of oral administration of flavored chewable tablets containing fluralaner (Bravecto™), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral administration. **Parasit Vectors**, v. 7, e87, 2014b.
- WALTHER, F.M. et al. The effect of food on the pharmacokinetics of oral fluralaner in dogs. **Parasit Vectors**, v. 7, e84, 2014c.
- WARD, R.D. et al. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas, and its significance to kala-azar distribution in South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 269-80, 1983.
- WATTS, P.C. et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, p. 734-743, 2005.
- WEHBE K, VEZZALINI M, CINQUE G. Detection of mycoplasma in contaminated mammalian cell culture using FTIR microspectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 410, p. 3003-3016, 2018.
- WENGENMAYER, C. et al. The speed of kill of fluralaner (Bravecto™) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. **Parasit Vectors**, v. 18, e525, 2014.
- WERNECK, G.L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Pública**, v. 26, p. 644-645, 2010.
- WERNECK, G.L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle?. **Cad Saude Publica**, v. 32, S0102-311X2016000600201, 2016.
- WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saude Publica**, v. 48, p. 851-856, 2014.
- WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, p. 647-662, 2011.
- WIDODO, A.; YANG, B.S. Support vector machine in machine condition monitoring and fault diagnosis. **Mec Systems Signal Processing**, v. 21, p. 2560-2574, 2007.
- WILSON R. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, e816, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis epidemiological situation**, 2022a. Disponível em: < www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: jul 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**, 2022b. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: jun 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide**, 2020. Disponível em: < https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2020>. Acesso em: jul 2022.

ZANETTE, M.F. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, p. 105-7, 2014.

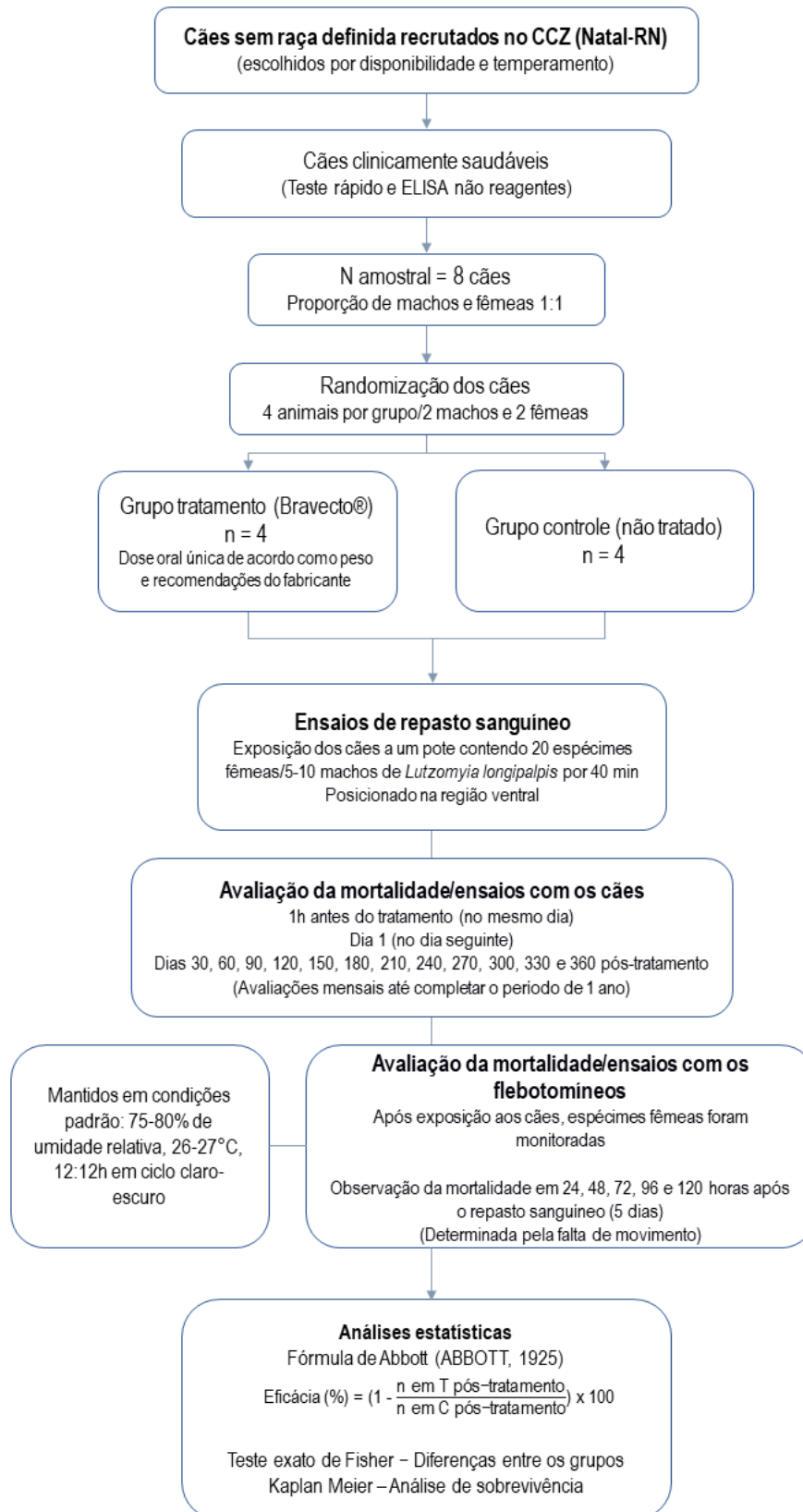
ZARNOWIEC, P. et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a tool for the identification and differentiation of pathogenic bacteria. **Curr Med Chem**, v. 22, p. 1710-1718, 2015.

ZELEDON, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 455-459, 1984.

ZOHLAMI, Z. et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. **Acta Trop**, v. 139, p. 32-38, 2014.

ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian visceral leishmaniasis control program in large cities. **Cad Saúde Pública**, v. 32, e00087415, 2016.

APÊNDICE A – Delineamento experimental do capítulo 1



APÊNDICE B – Análise de sobrevivência por grupo e dia amostral

Tabela 2 – Mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* (%) após repasto sanguíneo (determinada em até 120h pós-alimentação) em cães tratados com fluralaner (Bravecto®) por até 12 meses após o tratamento

Grupo	Dias pós-tratamento														
	0	1	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	
	Mortalidade (%) IC 95%														
Controle	24h	0 (0) 0.99-1.00	4 (5) 0.90-0.99	6 (7.5) 0.86-0.98	5 (6.25) 0.88-0.99	3 (3.7) 0.92-1.00	2 (2.5) 0.94-1.00	3 (3.75) 0.92-1.00	4 (5) 0.90-0.99	4 (5) 0.90-0.99	5 (6.25) 0.88-0.99	6 (7.5) 0.86-0.98	4 (5) 0.90-0.99	4 (5) 0.90-0.99	4 (5) 0.90-0.99
	48h	3 (3.7) 0.92-1.00	0 (5) 0.90-0.99	3 (11.2) 0.81-0.95	2 (8.75) 0.85-0.97	2 (6.25) 0.88-0.99	2 (5) 0.90-0.99	2 (6.25) 0.88-0.99	2 (7.5) 0.86-0.98	1 (6.25) 0.88-0.99	2 (8.75) 0.85-0.97	2 (10) 0.83-0.96	0 (5) 0.90-0.99	4 (10) 0.83-0.96	1 (6.25) 0.88-0.99
	72h	4 (8.75) 0.85-0.97	4 (10) 0.83-0.96	0 (11.25) 0.81-0.95	1 (10) 0.83-0.96	3 (10) 0.83-0.96	3 (8.7) 0.85-0.97	3 (10) 0.83-0.96	3 (11.25) 0.81-0.95	3 (10) 0.83-0.96	1 (10) 0.83-0.96	1 (11.25) 0.81-0.95	4 (10) 0.83-0.96	0 (10) 0.83-0.96	3 (10) 0.83-0.96
	96h	3 (12.5) 0.80-0.94	2 (12.5) 0.80-0.94	0 (11.2) 0.81-0.95	2 (12.5) 0.80-0.94	2 (12.5) 0.80-0.94	4 (13.7) 0.78-0.93	2 (12.5) 0.80-0.94	3 (13.75) 0.77-0.92	2 (12.5) 0.80-0.94	2 (12.5) 0.80-0.94	0 (11.25) 0.81-0.95	2 (12.5) 0.80-0.94	2 (12.5) 0.80-0.94	2 (12.5) 0.80-0.94
	120h	2 (15) 0.77-0.92	2 (15) 0.77-0.92	3 (15) 0.77-0.92	0 (12.5) 0.80-0.94	1 (13.75) 0.78-0.93	1 (15) 0.77-0.92	1 (13.75) 0.78-0.93	0 (13.75) 0.77-0.92	1 (13.75) 0.78-0.93	0 (12.5) 0.80-0.94	3 (15) 0.77-0.92	2 (15) 0.77-0.92	2 (15) 0.77-0.92	1 (13.75) 0.78-0.93

Tabela 2 – Mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* (%) após repasto sanguíneo (determinada em até 120h pós-alimentação) em cães tratados com fluralaner (Bravecto®) por até 12 meses após o tratamento

Grupo	Dias pós-tratamento														
	0	1	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	
Fluralaner	Hora	Mortalidade (%) IC 95%													
	24h	5 (6.25) 0.87-0.98	80 (100)	73 (91.25) 0.02-0.14	39 (48.75) 0.40-0.62	30 (37.5) 0.51-0.73	19 (23.75) 0.66-0.85	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00	0 (0) 0.99-1.00
	48h	3 (10) 0.82-0.96	NA	7 (100)	24 (69) 0.12-0.30	18 (60) 0.29-0.50	19 (47.5) 0.41-0.63	7 (8.75) 0.85-0.97	1 (1.25) 0.96-1.00	1 (1.25) 0.96-1.00	0 (0) 0.99-1.00	2 (2.5) 0.94-1.00	0 (0) 0.99-1.00	4 (5) 0.90-0.99	0 (0) 0.99-1.00
	72h	0 (10) 0.82-0.96	NA	NA	11 (76) 0.01-0.13	8 (70) 0.19-0.40	9 (58.75) 0.30-0.52	15 (27.5) 0.62-0.82	8 (11.25) 0.81-0.95	7 (10) 0.83-0.96	2 (2.5) 0.94-1.00	3 (6.25) 0.88-0.99	2 (2.5) 0.94-1.00	1 (6.25) 0.88-0.99	3 (3.75) 0.92-1.00
	96h	0 (10) 0.82-0.96	NA	NA	6 (100)	24 (100)	12 (73.75) 0.16-0.35	29 (58.25) 0.25-0.46	23 (40) 0.49-0.70	20 (35) 0.54-0.75	16 (22.5) 0.68-0.86	12 (21.25) 0.69-0.87	7 (11.25) 0.81-0.95	5 (12.5) 0.80-0.94	7 (12.5) 0.80-0.94
	120h	3 (13.75) 0.77-0.93	NA	NA	NA	NA	21 (100)	29 (100)	26 (72.5) 0.17-0.37	22 (62.5) 0.26-0.48	31 (61.25) 0.28-0.49	23 (50) 0.39-0.60	25 (42.5) 0.46-0.68	9 (23.75) 0.66-0.85	2 (15) 0.77-0.92

APÊNDICE C – Artigo publicado

Queiroga et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:609
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04489-1>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Fluralaner (Bravecto®) induces long-term mortality of *Lutzomyia longipalpis* after a blood meal in treated dogs

Tamyres Bernadete Dantas Queiroga¹, Henrique Rafael Pontes Ferreira², Wilo Victor dos Santos², Ana Beatriz Lourenço de Assis², Vicente Toscano de Araújo Neto¹, Antônia Cláudia Jácome da Câmara³, João Ciro Fagundes Neto⁴, Romeika Karla dos Reis⁵, Manuela Sales Lima Nascimento⁶, Renata Antonaci Gama⁶ and Paulo Marcos Matta Guedes^{6*}

Abstract

Background: *Leishmania infantum* is the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the New World, where the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and domestic dogs are considered the main vector and host reservoirs, respectively. Systemic insecticides have been studied as an alternative to control vector-borne diseases, including VL. Fluralaner, an isoxazoline class compound, is a systemic insecticide used in dogs, with proven efficiency against different species of phlebotomine sand flies. However, to date no studies have demonstrated the efficacy of fluralaner on *Lu. longipalpis*. The aim of this study was to evaluate the insecticidal effect of fluralaner (Bravecto®) on the sand fly *Lu. longipalpis* after blood meal in treated dogs.

Methods: Healthy mongrel dogs ($n = 8$) were recruited from the Zoonoses Control Center in the city of Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, and randomized into two groups: fluralaner treated ($n = 4$) and non-treated control ($n = 4$). Colony-reared female specimens of *Lu. longipalpis* ($n = 20$) were allowed to feed on all dogs for 40 min before treatment (for fluralaner-treated dogs), at day 1 after treatment and then monthly until 1 year post-treatment.

Results: In the treatment group, there was 100% mortality of *Lu. longipalpis* for up to 5 months after treatment initiation, decreasing to 72.5% at 6 months post-treatment initiation. The efficacy of fluralaner ranged from 100% at day 1 ($P = 0.0002$) to 68% ($P = 0.0015$) at 6 months, decreasing to 1.4% at 1 year post-treatment. Sand fly mortality carried out blood meal in non-treated control dogs remained constant at $\leq 15\%$.

Conclusions: Taken together, our results suggest that fluralaner may be used as a control strategy for VL in dogs in VL endemic areas.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Fluralaner, Bravecto®, Systemic insecticide, *Lutzomyia longipalpis*, Sand fly, Dog

Background

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by the protozoan parasite *Leishmania infantum* and is considered to be a public health concern due to its wide geographic distribution, high number of estimated cases annually (50,000–90,000) and high mortality rate, mainly in malnourished children, old-aged individuals and patients

*Correspondence: pauloguedes@cb.ufrn.br

⁶ Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



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

with *Leishmania*–human immunodeficiency virus coinfection. In the Americas, VL is endemic in 12 countries, with approximately 96% of new cases reported in Brazil [1–3]. Dogs are the main domestic reservoir and play an important role in maintaining the disease cycle due to the high prevalence of *L. infantum* infection in dogs, the presence of amastigote forms in their skin and their proximity to humans [4–7]. For this reason, dogs are considered to be strategic targets for disease control.

The main *L. infantum* transmission route is through the bite of the blood-feeding female phlebotomine sand fly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) belonging to the genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World [8]. *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of *L. infantum* in the Americas [7]. This sand fly species is widely distributed throughout most Brazilian states, and has shown to be highly adaptable to the urban environment [9–12]. The control actions currently used to target the vector and its main reservoir are controversial and appear to have a limited impact on the incidence of human and canine VL cases due to several limitations, including inefficiency of diagnostic methods, absence of a treatment that eliminates the parasite and/or lack of an effective vaccine to prevent infection in humans and dogs [13, 14].

Previous studies have explored the use of systemic insecticides as a control measure. Recently, some studies have focused on a new class of drugs, isoxazolines (fluralaner, afoxolaner, saxolaner), which are licensed for veterinary use to protect against fleas, ticks and mites through its inhibition of the arthropod nervous system [15–17]. Among this class of drugs, the fluralaner compound provides the most prolonged protection, approximately 12 weeks [18–20]. Fluralaner acts as an antagonist of the gamma-aminobutyric acid (GABA)-gated chloride ion (Cl⁻) channels, preventing the entry of Cl⁻ into the postsynaptic neuron, which in turn leads to hyperexcitability of the insect central nervous system [15]; it has a very long half-life *in vivo* [21]. Fluralaner has been shown to be safe in dogs [22] and has a significant selectivity for insects over mammalian receptors [23]. Experimental studies with fluralaner have shown insecticide activity within short periods of time against *Triatoma infestans*, the vector of *Trypanosoma cruzi* (the etiologic agent of Chagas disease [24]) and against some species of phlebotomine sand flies, such as *Phlebotomus papatasi* [25, 26] and *P. perniciosus* [27]. However, to date, there has been no study demonstrating fluralaner action on *Lu. longipalpis*, the main vector of VL in the New World. In this study, we evaluated the systemic insecticidal activity of a single oral dose of fluralaner against *Lu. longipalpis* after blood feeding on dogs, based on monthly assays of *Lu. longipalpis* activity during 1 year.

Methods

Dog recruitment and maintenance

Dogs were obtained from the Zoonoses Control Center (ZCC) in the city of Natal, Rio Grande do Norte (Brazil). With permission of the ZCC, eight healthy mongrel dogs ($n=8$; 1:1 ratio of male and female), weighing ≥ 20 kg were recruited and maintained in individual kennels. They were provided with water *ad libitum* and food corresponding to 5% of their body weight and routinely observed. No insecticide treatment was used in the kennels or on the dogs during the assays, and the animals were bathed with neutral shampoo 2 weeks before each assay.

Sand fly colony maintenance

A sand fly colony was established in the Laboratory of Insects and Vectors of the Federal University of Rio Grande do Norte (Brazil), starting with eggs of *Lu. longipalpis* (donated by the Laboratory of Physiology of Hematophagous Insects of the Federal University of Minas Gerais, Brazil). The colony was maintained under standard conditions (75–80% relative humidity, 26–27 °C, 12:12 light:dark cycle). A homogeneous fermented mixture consisting of crushed mouse food, dried rabbit feces and soil was used for larval feeding [28].

Study design

The dogs were randomized into two groups: a fluralaner-treated ($n=4$) group and an untreated control group ($n=4$), with each group comprising two male and two female dogs. Randomization was by tossing a coin in the presence of an observer. The fluralaner-treated group received a single oral dose of fluralaner (Bravecto[®]; Merck Animal Health, Merck Sharp & Dohme, Kenilworth, NY, USA) on the same day as randomization, following the manufacturers' recommendations. The sand fly feeding assays were performed on both groups 1 h prior to fluralaner treatment and on days 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 and 360 (i.e. monthly assessments) to evaluate mortality.

Female sand flies (5–6 days old) of *Lu. longipalpis*, without blood- or sugar-feeding (12 h before the experiment), were used. The dogs were gently restrained by trained veterinarians and positioned upright or lying down for more comfortable position. This was followed by the placement of a cylindrical plastic pot fitted with a tight lid that was perforated and covered with a net onto the ventral region of each dog, with each pot containing 20 female/5–10 male specimens of *Lu. longipalpis*, which were allowed to feed for 40 min (Fig. 1a). After the assays, sand flies were maintained in an insectary under standard conditions (relative humidity 75–80 %, 26–27 °C and 12:12 light:dark cycle), and the insects were fed with

cotton soaked in a glucose-saturated solution (Fig. 1b). All female specimens were monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h post-blood meal to record the number of dead females, determined by the lack of movement (Fig. 1c).

Statistical analysis

The efficacy of fluralaner for killing sand flies was assessed using Abbott's formula [29]. Efficacy was measured by comparing the number of dead female insects after a blood meal from the treated and untreated group using the following formula:

$$\text{Efficacy (\%)} = \left(1 - \frac{n \text{ in T after treatment}}{n \text{ in Co after treatment}} \right) \times 100$$

where n is the sand fly population, T is treated (dogs) and Co is the control (dogs). Differences between the groups were determined using Fisher's exact test on each experimental test day [25]. Sand fly mortality tests were two-tailed and differences between groups were considered to be significant when $P \leq 0.05$. Survival analyses were conducted using the Kaplan Meier method on each assay day until 120 h post-feeding. The analyses were performed using BioEstat 5.0 software (Brazil).

Results

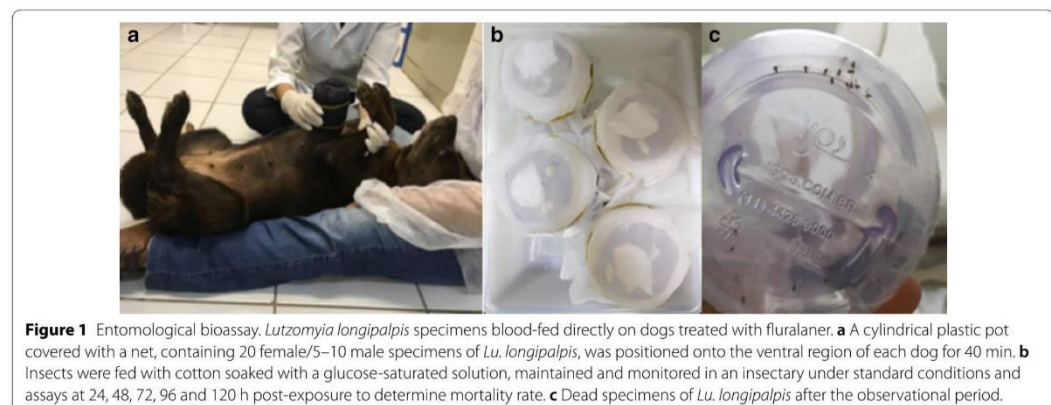
No side effects were observed in dogs treated with fluralaner

The assays were conducted between November 2018 and November 2019. Recruited dogs weighed between 20 and 40 kg and aged between 4 and 10 years. There were no significant differences in the weight or ages of dogs between the untreated control and fluralaner-treated dogs. No side effects among fluralaner-treated dogs were observed during the study.

Fluralaner (Bravecto®) induces 100% mortality of *Lu. longipalpis* up to 5 months after treatment in dogs

All female *Lu. longipalpis* specimens used in the assays were engorged, with 100% feeding success. Following the administration of a single oral dose of fluralaner to dogs, during the 1-year follow-up study we recorded 100% mortality of female *Lu. longipalpis* specimens up to 150 days after treatment (Fig. 2). After the fifth month, mortality levels started to decline with increasing time from treatment, to 72.5% on post-treatment day 180, 62.5% on post-treatment day 210, 61.2% on post-treatment day 240, 50% on post-treatment day 270, 42.5% on post-treatment day 300, 23.7% on post-treatment day 330 and 15% on post-treatment day 360. The mortality of the sand flies after the blood meal in treated dogs was higher than that in the control dogs until post-treatment day 300 (Fig. 2). However, mortality was similar between groups at post-treatment days 330 and 360 (Fig. 2). The mortality of sand flies blood-fed on control dogs was always $\leq 15\%$ (range 12.5–15%) up to 120 h after the feeding (Fig. 2).

Analyses of *Lu. longipalpis* mortality was performed in each experiment until 120 h after blood-feeding on dogs. On the first day post-treatment, 100% of the sand flies had died by 24 h after the blood meal on the treated dogs (Fig. 3). After post-treatment day 1, the time to reach 100% mortality gradually increased, to 48 h on post-treatment day 30, 72 h on post-treatment day 60, 96 h on post-treatment day 90, 120 h on post-treatment day 120 and 120 h on post-treatment day 150. Fluralaner provided sustained mortality (100%) for up to 5 months according to the 120 h post-test (Fig. 3). Mortality results observed after 120 h were 72.5% on post-treatment day 180, 62.5% on post-treatment day 210, 61.2% on post-treatment day 240, 50% on post-treatment day 270, 42.5%



on post-treatment day 300, 23.7% on post-treatment day 330, and 15% on post-treatment day 360 (Fig. 3).

Fluralaner (Bravecto®) has insecticidal efficacy against *Lu. longipalpis* for up to 9 months after treatment in dogs

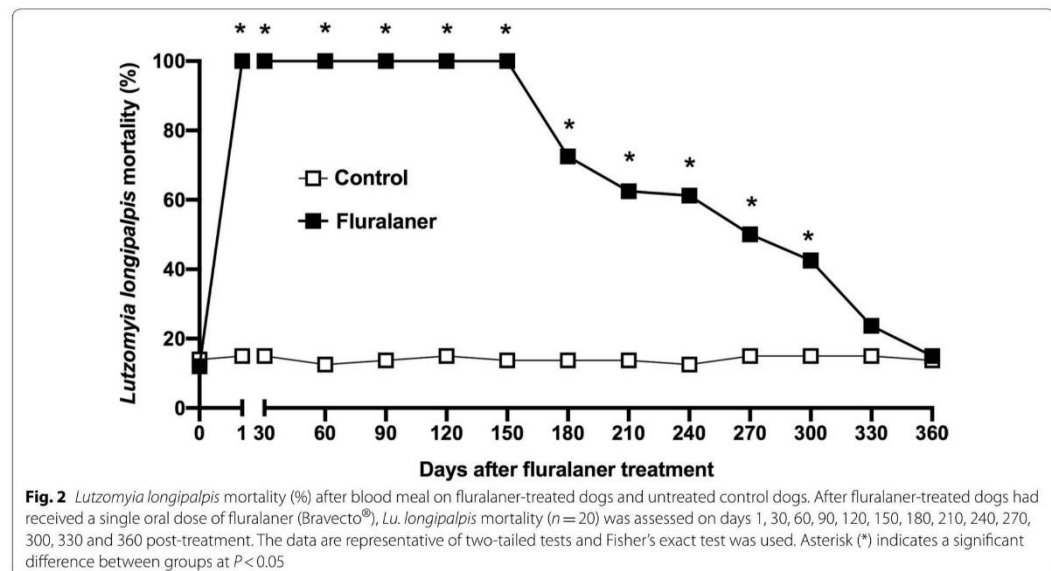
The fluralaner-treated dogs had a significantly higher insecticidal efficacy between post-treatment day 1 ($P=0.0002$) and day 150 ($P<0.0001$), with insecticidal efficacy maintained at 100%, than during the subsequent follow-up, with efficacy decreasing to 68.1% on post-treatment day 180 ($P=0.0015$), 56.5% on post-treatment day 210 ($P=0.0049$), 55.7% on post-treatment day 240 ($P=0.0022$) and 41.2% on post-treatment day 270 ($P=0.0171$) (Table 1). No significant differences in insecticidal efficacy were observed in the fluralaner-treated group on post-treatment days 300, 330 and 360 compared to the control group (Table 1). Kaplan–Meier analyses at 120 h post-feeding (95% confidence interval) per group and sampling day are reported in Table 1; the complete post-feeding data set (24, 48, 72, 96, 120 h) is provided in Additional file 1: Table S1. Taken together, these results show that the treatment of dogs with fluralaner is effective against *Lu. longipalpis* up to 270 days after treatment.

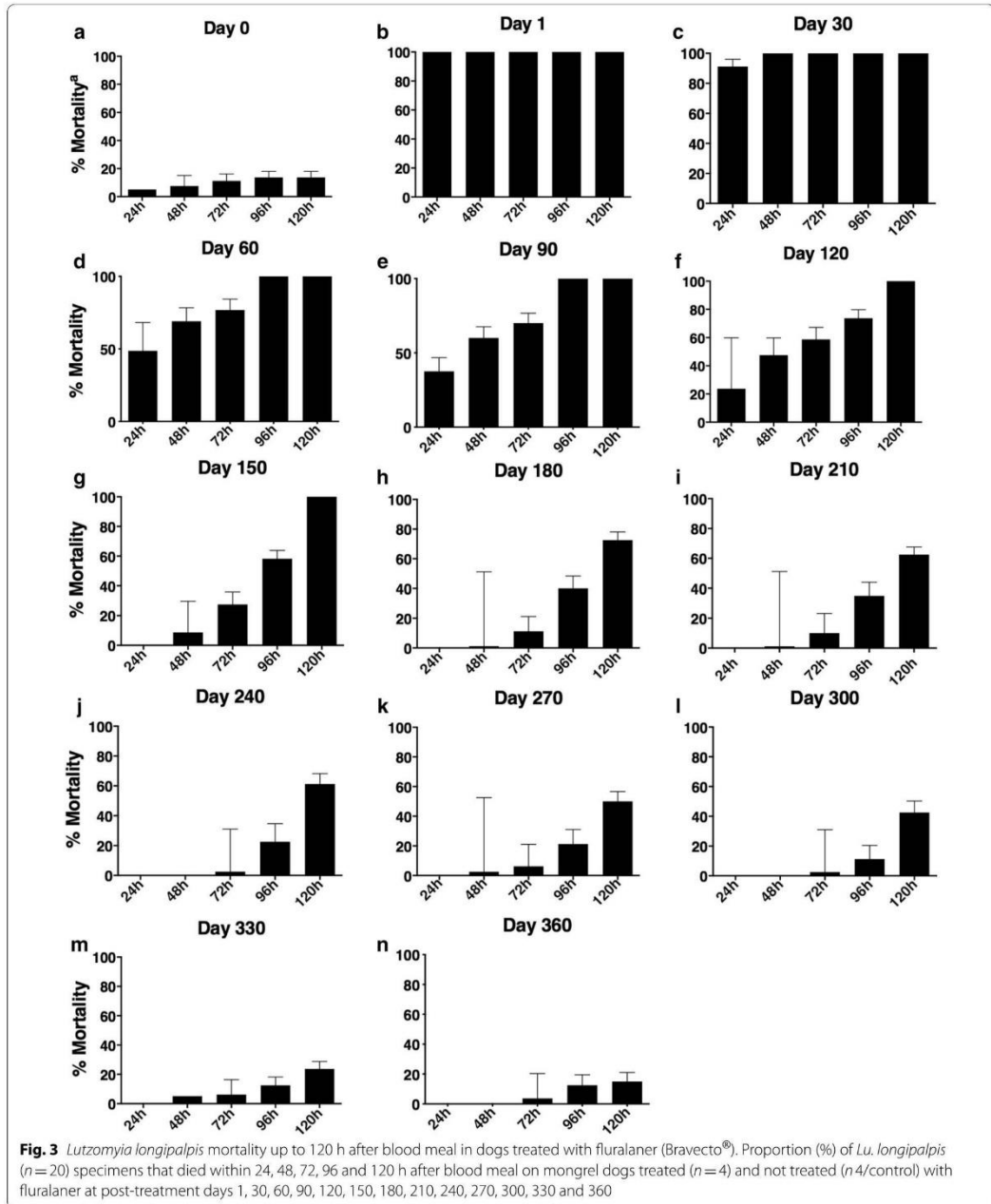
Discussion

In this study, we observed that a single oral dose of fluralaner induces *Lu. longipalpis* mortality, with insecticidal efficacy maintained up to 270 days after treatment

in dogs. In the treated dogs, fluralaner treatment had an efficacy of 100% on female phlebotomine sand flies for the first 5 months post treatment, decreasing to 68.1% at 6 months. These results suggest that fluralaner may be a promising tool for VL control in dogs in endemic areas, possibly by administering the agent every 5 months.

There was a 100% mortality rate in *Lu. longipalpis* within 120 h post-blood meal on fluralaner-treated dogs for up to 150 days post-treatment. Susceptibility to fluralaner has been determined in other sand fly species, such as *Phlebotomus papatasi* and *P. perniciosus* [25, 27]. A survey by Gomez and co-workers noted mortality of 100, 96, 89 and 42% in *P. papatasi* (24 h post-blood meal directly on dogs) on post-treatment days 3, 31, 45 and 73, respectively [25]. We observed similar results in our study during the same period of time (24 h after blood meal) for *Lu. longipalpis*, with observed mortality of 100, 91.2, 48.7 and 37.5 on post-treatment days 1, 30, 60 and 90, respectively. Furthermore, a study with *P. perniciosus* showed that 96 h after blood meal, there was 100, 100 and 68.6% mortality on days 1, 28 and 84 post-fluralaner treatment, respectively [27]. In our study, 96 h after a blood meal, 100% mortality was recorded in *Lu. longipalpis* on days 1, 30 and 90 after fluralaner treatment, indicating that *Lu. longipalpis* is more susceptible to the insecticide effect of fluralaner than *P. perniciosus*. The insecticidal efficacy of fluralaner against *P. papatasi* was determined in a membrane-feeding study. Sand fly mortality 24 h post-feeding was higher in the group fed blood





samples from fluralaner-treated dogs up to 30 days (60% mortality) post-treatment compared to the control [26].

In the present study, fluralaner was able to kill the female specimens of sand flies within 5 days after blood-feeding. Female sand flies take approximately 7 days to become infected after ingesting a blood meal, with development of the infective form in the foregut and possibly transmitting *L. infantum* to other hosts [30]. The use of fluralaner will not prevent an infected sand fly from transmitting the parasite during blood-feeding, but when used on a large scale it can become an alternative strategy to control *Lu. longipalpis* populations in risk areas in the long term because sand flies blood-feeding on fluralaner-treated dogs will die before becoming infectious, thereby preventing the transmission. In addition to fluralaner's action in adult sand flies, engorged sand fly females which did not die within the 120-h post-blood feeding period on treated dogs (> day 150 post-treatment) were able to lay eggs, although fewer eggs and larvae were observed. These observations suggest that fluralaner could act in preventing egg development and maturation (data not shown). However, further studies should be performed to elucidate this possible action.

We recorded the efficacy of fluralaner efficacy to kill *Lu. longipalpis* after blood-feeding on treated dogs for up to 270 days and observed 100% fluralaner efficacy against

Lu. longipalpis 96 h after a blood meal. On the other hand, fluralaner efficacy against sand fly *P. perniciosus* was 100, 100 and 52.7 on days 1, 28 and 84 post-treatment, respectively [27]. The prolonged efficacy of fluralaner against *Lu. longipalpis*, when compared to other species of sand flies, may be associated with intra- and inter-specific variations in size or ingestion of the blood meal and the attractiveness of the animal under study [31, 32]. A study developed by William and co-workers showed that ticks collected from fluralaner-treated dogs weighed significantly less than ticks collected from the control dogs, leading to minimal blood absorption, which results in a sufficient exposure of ticks to the fluralaner and consequently high levels of mortality [33]. In the present study, we observed that all specimens showed high levels of mortality after feeding on fluralaner-treated dogs, regardless of the quantity of blood ingested by the *Lu. longipalpis* females. In addition, we performed a sand fly feeding assay, with 100% of feeding success, directly on the ventral region of dogs, where there is a greater concentration of fat and consequently a higher drug concentration than in other tissues [34]. In future studies, we intend to perform the feeding assays directly on the ear of the dogs and compare the results to assays on other body regions.

Table 1 Follow-up of *Lutzomyia longipalpis* mortality and insecticidal efficacy after blood meal on dogs for up to 12 months (360 days) after treatment with a single oral dose of fluralaner (Bravecto®)

Days after treatment	Control		Fluralaner		Efficacy (%) ^c	P value ^d
	Mortality (%) ^a	95% Confidence interval ^b	Mortality (%) ^a	95% Confidence interval ^b		
1	12 (15)	0.77–0.92	80 (100)	NA ^e	100	0.0002*
30	12 (15)	0.77–0.92	80 (100)	NA	100	0.0002*
60	10 (12.5)	0.80–0.94	80 (100)	NA	100	<0.0001*
90	11 (13.75)	0.78–0.93	80 (100)	NA	100	<0.0001*
120	12 (15)	0.77–0.92	80 (100)	NA	100	0.0002*
150	11 (13.75)	0.78–0.93	80 (100)	NA	100	<0.0001*
180	11 (13.75)	0.77–0.92	58 (72.5)	0.17–0.37	68.1	0.0015*
210	11 (13.75)	0.78–0.93	50 (62.5)	0.26–0.48	56.5	0.0049*
240	10 (12.5)	0.80–0.94	49 (61.25)	0.28–0.49	55.7	0.0022*
270	12 (15)	0.77–0.92	40 (50)	0.39–0.60	41.2	0.0171*
300	12 (15)	0.77–0.92	34 (42.5)	0.46–0.68	32.3	0.0590
330	12 (15)	0.77–0.92	19 (23.75)	0.66–0.85	10.3	0.0301
360	11 (13.75)	0.78–0.93	12 (15)	0.77–0.92	1.4	1.0000

^a Mortality indicates the number of sand flies dead at the specified time point. Presented as the number of dead sand flies with the percentage [(dead females after blood-feeding/total number of blood-fed females) × 100] in parentheses

^b 95% Confidence interval is the interval of the probability of survival at the specified time point calculated using the Kaplan–Meier method

^c Efficacy is the percentage of sand fly mortality after exposure to the insecticide using Abbott's formula

^d P value: Significance of difference in sand fly mortality between control group and fluralaner group using Fisher's exact test. *Significant difference between treated dogs and control dogs at $P \leq 0.05$

^e NA: Samples showed 100% death rate

When evaluating systemic insecticides to be applied to dogs as a control measure for vector-borne diseases, some points should be considered. To achieve greater coverage in risk areas, insecticides should be easy to apply, present immediate and prolonged efficacy and require a low number of reapplications. When there is a good safety profile, side effects to the dog are avoided, increasing owner's adherence [35]. In this context, fluralaner appears to be a promising compound for sand fly control, especially *Lu. longipalpis* populations. The results of our study show high levels of mortality, the longest reported residual activity against sand flies and high efficacy levels for up to 9 months. Another point to be mentioned is that only mongrel dogs were used in the study, presenting variable ages and weights, so the results may closely resemble the real-life situation.

Conclusions

Taken together, our results show that fluralaner treatment in dogs has an insecticide efficacy against *Lu. longipalpis* and represents a possible public health intervention strategy for combating and reducing infected vectors in endemic areas of VL, thereby reducing canine and human cases of this disease.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04489-1>.

Additional file 1: Table S1. *Lutzomyia longipalpis* mortality (%) after blood meal (determined up to 120 h after blood meal) on fluralaner (Bravecto®)-treated dogs for up to 12 months post-treatment.

Abbreviations

NA: Not applicable; VL: Visceral leishmaniasis; ZCC: Zoonoses Control Center.

Acknowledgements

We thank Marcos Horacio, Nelder Gontijo and César Nonato from the Laboratory of Physiology of Hematophagous Insects of the Federal University of Minas Gerais, who kindly provided the eggs to start our own sand fly colony and the experiments.

Authors' contributions

TBDQ, RAG, ACJM and PMMG designed the study protocol. HRPF and ABLA cared for the sand fly colony. TBDQ, WVS, JCFN, VTAN and RKRL performed the sand fly feeding assays. TBDQ and HRPF observed sand fly mortality. TBDQ and RAG performed the statistical analysis. TBDQ, MSLN and PMMG were the main contributors to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital Universal—Grant No. 409271/2018-7) and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. The authors (PMMG and MSLN) receive a scientific productivity scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The author TBDQ received a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted at the Federal University of Rio Grande do Norte and Zoonoses Control Center, Natal, Brazil. All experimental protocols were performed according to the Brazilian National Animal Care Ethical Council and the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Rio Grande do Norte under protocol number 136.061/2018.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ² Graduate Program in Parasitology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ³ Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ⁴ Zoonoses Control Center, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ⁵ Canis and Catus Veterinary Clinic, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ⁶ Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Received: 7 October 2020 Accepted: 19 November 2020

Published online: 04 December 2020

References

- World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. *WER* 2017;38:557–72.
- Erza N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2:248–57.
- Panamerican Health Organization. Epidemiological report of the Americas. *Rep leishmaniases*. 2019;7:1–8.
- Alvar J, Cañavete C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1–88.
- Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2002;106:315–24.
- Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXII: characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912 isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará state. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80:143–5.
- Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009;136:1915–34.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17:279–89.
- França-Silva JC, Barata RA, Da Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;131:213–20.
- Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Silva FOL, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:56–61.
- Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais. *Brazil Vet Parasitol*. 2011;176:101–11.
- Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:263–4.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*. 2002;186:1314–20.

14. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America—a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e584.
15. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;45:111–24.
16. Letendre L, Huang R, Kvaternick V, Harriman J, Drag M, Soll M. The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs. *Vet Parasitol*. 2014;201:190–7.
17. Shoop WL, Hartline EJ, Gould BR, Waddell ME, McDowell RG, Kinney JB, et al. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Vet Parasitol*. 2014;201:179–89.
18. Rohdich N, Roepke RK, Zschiesche E. A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. *Parasites Vectors*. 2014;7:83.
19. Taenzler J, Wengenmayer C, Williams H, Fourie J, Zschiesche E, Roepke RK, et al. Onset of activity of fluralaner (Bravecto™) against *Ctenocephalides felis* on dogs. *Parasites Vectors*. 2014;7:1–4.
20. Fourie JJ, Liebenberg JE, Horak IG, Taenzler J, Heckerroth AR, Frénais R. Efficacy of orally administered fluralaner (Bravecto™) or topically applied imidacloprid/moxidectin (Advocate®) against generalized demodicosis in dogs. *Parasites Vectors*. 2015;8:1–7.
21. Kílþ S, Ramírez D, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. *Parasites Vectors*. 2014;7:85.
22. Walther FM, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. Safety of fluralaner chewable tablets (Bravecto™), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral administration. *Parasites Vectors*. 2014;7:87.
23. Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:744–9.
24. Loza A, Talaga A, Herbas G, Canaviri RJ, Cahuasiri T, Luck L, et al. Systemic insecticide treatment of the canine reservoir of *Trypanosoma cruzi* induces high levels of lethality in *Triatoma infestans*, a principal vector of Chagas disease. *Parasites Vectors*. 2017;10:344.
25. Gomez SA, Lucientes J, Castillo JA, Peris MP, Delacour S, Ortega P, et al. A randomized, blinded, controlled trial to assess sand fly mortality of fluralaner administered orally in dogs. *Parasites Vectors*. 2018;11:627.
26. Gomez SA, Curdi JL, Hernandez JAC, Peris PP, Gil AE, Velasquez RVO, et al. Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs. *Parasites Vectors*. 2018;11:230.
27. Bongiorno G, Meyer L, Evans A, Lekouch N, Bianchi R, Khoury C, et al. A single oral dose of fluralaner (Bravecto®) in dogs rapidly kills 100% of blood-fed *Phlebotomus perniciosus*, a main visceral leishmaniasis vector, for at least 1 month after treatment. *Med Vet Entomol*. 2019;34:240–3.
28. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol*. 2011;36:1–9.
29. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*. 1925;18:265–7.
30. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 1984;223:1417–9.
31. Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2009;9:79–86.
32. Daba S, Daba A, Shehata MG, El Sawaf BM. A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol*. 2004;34:173–82.
33. Williams H, Demeler J, Taenzler J, Roepke RKA, Zschiesche E, Heckerroth AR. A quantitative evaluation of the extent of fluralaner uptake by ticks (*Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*) in fluralaner (Bravecto™) treated vs untreated dogs using the parameters tick weight and coxal index. *Parasites Vectors*. 2015;8:352.
34. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). CVMP assessment report for Bravecto (EMA/V/C/002526/0000). London: European Medicine Agency. 2014.
35. Pfister K, Armstrong R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasitides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. *Parasites Vectors*. 2016;9:436.

Publisher's Note

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

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



APÊNDICE D – Artigos publicados durante o doutorado

Parasitology Research
<https://doi.org/10.1007/s00436-022-07595-4>

RESEARCH



The repellency effect of icaridin nanostructural solution applied on cotton knitting fabric against *Lutzomyia longipalpis*

Henrique Rafael Pontes Ferreira¹ · Rivaldo Leonn Bezerra Cabral² · Tamyres Bernadete Dantas Queiroga³ · Paulo Marcos Matta Guedes¹ · Ana Beatriz Lourenço de Assis¹ · Taciano de Moura Barbosa¹ · José Heriberto Oliveira do Nascimento² · Renata Antonaci Gama¹

Received: 28 April 2022 / Accepted: 4 July 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Queiroga et al. *Parasites Vectors* (2021) 14:456
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04978-x>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access

Insecticidal efficacy of fluralaner (Bravecto[®]) against *Triatoma brasiliensis*, a major vector of *Trypanosoma cruzi* in Brazil



Tamyres Bernadete Dantas Queiroga¹, Luanderson Cardoso Pereira Gomez², Eduardo Rodrigues de Sena², Wilo Victor dos Santos², Henrique Rafael Pontes Ferreira², Vicente Toscano de Araújo-Neto¹, Andressa Noronha Barbosa-Silva¹, Carlos Ramon do Nascimento Brito³, Romeika Karla dos Reis Lima⁴, João Ciro Fagundes-Neto⁵, Lúcia Maria da Cunha Galvão³, Henrique Rocha de Medeiros⁶, Antônia Cláudia Jácome da Câmara³, Manuela Sales Lima Nascimento⁷, Renata Antonaci Gama⁷ and Paulo Marcos Matta Guedes⁷



Virulence of *Trypanosoma cruzi* Strains Is Related to the Differential Expression of Innate Immune Receptors in the Heart

Tamyres Bernadete Dantas Queiroga¹, Nathalie de Sena Pereira², Denis Dantas da Silva¹, Cléber de Mesquita Andrade³, Raimundo Fernandes de Araujo Júnior⁴, Carlos Ramon do Nascimento Brito⁵, Lúcia Maria da Cunha Galvão⁵, Antônia Cláudia Jácome da Câmara⁵, Manuela Sales Lima Nascimento⁶ and Paulo Marcos Matta Guedes^{6*}

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

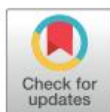
RESEARCH ARTICLE

NOD2 receptor is crucial for protecting against the digestive form of Chagas disease

Nathalie de Sena Pereira^{1,2}, Tamyres Bernadete Dantas Queiroga³, Denis Dantas da Silva³, Manuela Sales Lima Nascimento³, Cléber Mesquita de Andrade⁴, Janeusa Trindade de Souto⁵, Mayra Fernanda Ricci⁵, Rosa Maria Esteves Arantes⁵, Dario Simões Zamboni⁶, Egler Chiari¹, Antônia Cláudia Jácome da Câmara⁷, Lúcia Maria da Cunha Galvão^{1,7}, Paulo Marcos Matta Guedes^{3*}

1 Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Potiguar University, Natal, Brazil, **3** Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, **4** Department of Biomedical Sciences, University of Rio Grande do Norte State, Mossoró, Brazil, **5** Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **6** Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, **7** Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

* pauloguedes@cb.ufm.br



RESEARCH ARTICLE

Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients

Nathalie de Sena Pereira^{1,2,3}, Tamyres Bernadete Dantas Queiroga², Daniela Ferreira Nunes¹, Cléber de Mesquita Andrade⁴, Manuela Sales Lima Nascimento⁵, Maria Adelaide Do-Valle-Matta⁶, Antônia Cláudia Jácome da Câmara⁷, Lúcia Maria da Cunha Galvão¹, Paulo Marcos Matta Guedes^{2*}, Egler Chiari¹



1 Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, **3** School of Health, Potiguar University, Natal, RN, Brazil, **4** Department of Biomedical Sciences, University of Rio Grande do Norte State, Rio Grande do Norte, Mossoró, Brazil, **5** Edmond and Lily Safra International Institute of Neurosciences, Rio Grande do Norte, Macaíba, Brazil, **6** Laboratory of Cellular Ultrastructure, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **7** Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

 OPEN ACCESS

* pauloquedes@cb.ufrn.br

ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
 Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
 Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



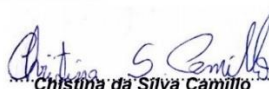
CERTIFICADO

Natal (RN), 13 de novembro de 2018.

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade do Fluralaner (Bravecto™) no controle da leishmaniose visceral**”, protocolo 061/2018, **CERTIFICADO n.º 136.061/2018**, sob a responsabilidade de **Paulo Marcos da Matta Guedes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada, após adequações, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Vigência do Projeto	Dezembro 2021					
RELATÓRIO	DEZEMBRO 2021					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	Total
<i>Canis familiaris</i>	Sem raça definida	6 meses - 5 anos	≥ 5 kg	x	x	≈987
<i>Mus musculus</i>	Swiss Webster	6-8 semanas	12-22g	14		14
Origem	Cães – Centro de Zoonoses e dos bairros de Felipe Camarão e Guarapes Camundongos – Centro de Ciências da Saúde – UFRN					
Manutenção	Cães – Centro de Zoonoses Natal/RN Camundongos – Centro de Ciências da Saúde – UFRN					

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. **O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.**


Cristina da Silva Camillo
 Coordenadora da CEUA-UFRN