



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Felipe Melo Machado

**ESTUDO DOS FLEBÓTOMOS (DIPTERA,  
PHLEBOTOMINAE), VETORES DE *LEISHMANIA* SPP. EM  
CERNACHE, PORTUGAL**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Ecologia orientada pela Professora  
Doutora Isabel Luci Conceição e Professor Doutor Sérgio Eduardo Ramalho de  
Sousa e apresentada ao Departamento de Ciência da Vida, Faculdade de Ciências e  
Tecnologia, Universidade de Coimbra

Novembro de 2021



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

**Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vetores  
de *Leishmania* spp. em Cernache, Portugal**

**Felipe Melo Machado**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, pela Universidade de Coimbra, realizada sob a orientação científica de Prof. Doutora Isabel Luci Conceição e coorientação de Prof. Doutor Sérgio Eduardo Ramalho de Sousa.



Este trabalho foi desenvolvido com a parceria entre a Escola Universitária Vasco da Gama - Departamento de Ciências Veterinárias e Universidade de Coimbra / Departamento de Ciências da Vida / Centro de Ecologia Funcional / Laboratório de Nematologia - Nemato-lab.



**NEMATO**lab



**dcrv.uc**  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA



*“É preciso muita audácia para enfrentarmos os nossos inimigos, mas igual audácia para defendermos os nossos amigos.”*

Harry Potter e a Pedra Filosofal



## Agradecimentos

Essa dissertação compreende a quebra de uma bolha de conforto, na minha saída do Brasil, para tentar atingir grandes sonhos, resultou em deixar a família e os amigos distantes, sendo um grande desafio para mim, enfrentando barreiras, aprendendo com elas a ser sempre um ser humano melhor e com a fé de que tudo aquilo que perdido foi, ouvirei de sua boca: te abençoarei!

Em especial para minha mãe e meu pai, Luciana e Milton, pelo cuidado e pela confiança depositada em mim, acreditando nesse percurso, como uma etapa de aprendizado e crescimento profissional, amo muito vocês!

A minha madrastra e padrasto Simone e Adilson, por cuidarem dos meus pais na minha distância e por acreditarem no melhor que está sempre por vir, todos os dias.

Aos meus irmãos, Matheus, Maressa, Gustavo e Ana Laura, mesmo não sendo de sangue, tenho um carinho muito especial por vocês, no crescimento de cada um, nas vitórias que eu sempre celebrarei e que sempre serei um ombro amigo pra vocês, contem comigo.

A minha orientadora, Professora Doutora Isabel Luci Conceição por mostrar o melhor caminho e os meus votos de que, ser um professor é ser um eterno aprendiz, sempre aprendendo com o próximo, mesmo quando há discordância, estamos sempre aprendendo. Ao Professor Doutor Ruben Heleno pelo cuidado e apoio, além de transmitir sábias palavras em horas mais difíceis, para nunca desistir. Um agradecimento especial ao Professor Macks Wendell Gonçalves pelo suporte neste trabalho.

À Universidade de Coimbra, por acolher um “brazuca” e deixar as portas abertas para quando eu precisasse, pelos encantos de seus muros e arquitetura, pela arte e cultura disponibilizada, pela palavra saudade que está cravejada em todo canto.

A minha melhor amiga Jéssica Nazareth, no qual admiro sua lealdade, companheirismo, até mesmo nas horas mais difíceis, sinto sua falta com essa distância. Um abraço especial para Isabel Fortes, pelas risadas e amizade neste percurso.

Um carinho especial ao Marcelo, por ser companheiro e parceiro para todas horas!

A todos, muito obrigado!





## Resumo

As Leishmanioses são zoonoses transmitidas vectorialmente por flebótomos, quando infetados pelo protozoário do género *Leishmania*. Ocorre em diferentes entidades clínicas, para o homem (cutânea, mucocutânea e visceral), além de outros animais sendo o cão o principal hospedeiro. Estima-se que no mundo 12 milhões de pessoas estão infetadas e cerca de 350 milhões estão em zona de risco de contração da doença.

Neste trabalho, o principal objetivo foi caracterizar a nível ecológico e taxonómico a fauna flebotomínica existente na freguesia de Cernache, situada no Distrito de Coimbra, contribuindo para o conhecimento sobre a Leishmaniose em Portugal.

Entre 16 de junho a 13 de novembro de 2017 e 23 de junho a 27 de julho de 2018, foram amostrados 55 pontos de colheita, em diferentes tipos de biótopos (doméstico, peridoméstico e silvático). Os flebótomos amostrados foram identificados taxonomicamente através da sua morfologia. Foram escolhidas 16 fêmeas alimentadas para deteção de DNA de *Leishmania* com o recurso a técnicas moleculares.

Para a análise dos dados, trabalhou-se a distribuição das populações de cada espécie a partir do cálculo das frequências relativas, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo, além da utilização da correlação de Spearman na exploração individual de cada descritor com a distribuição das populações de cada espécie e construção de modelos preditivos a partir da Análise de Regressão Linear adotando o método *Backward*.

Do total de 666 flebótomos amostrados observaram-se as seguintes abundâncias relativas: *Phlebotomus perniciosus* com 80,78%, *P. ariasi* com 16,67%, *P. sergenti* com 2,40% e *Sergentomyia minuta* com 0,15%. *Phlebotomus papatasi* não foi identificado neste estudo. Na análise molecular, os resultados foram negativos, não tendo sido detetada a presença de *Leishmania* nas fêmeas selecionadas.

Há a necessidade de continuar os estudos, com a monitorização dos flebótomos e da investigação sobre os hospedeiros com doença, como também a recolha de dados relacionados com a Leishmaniose, não somente na Freguesia de Cernache, mas alargar a todo o Distrito de Coimbra.

PALAVRAS-CHAVE: Flebótomos, *Leishmania* spp., Biótopos, Cernache, Portugal



## Abstract

The Leishmaniasis are zoonoses transmitted vectorially by *Phlebotomus*, infected by the protozoan of the genus *Leishmania*. It occurs in different clinical entities, for man, being cutaneous, mucocutaneous, and visceral, and other animals being the dog the main host. It is estimated that in the world 12 million people are infected and about 350 million are at risk of contracting the disease.

For this work, the main objective was the ecological and taxonomic characterization of the phlebotomine fauna existing in the parish of Cernache, located in the District of Coimbra, contributing to the knowledge about Leishmaniasis in Portugal.

Between June 16 to November 13, 2017, and June 23 to July 27, 2018, 55 collection points were prospected, in different types of biotopes (domestic, peridomestic and sylvatic). The sampled phlebotomus were identified taxonomically by their morphology and 16 females were chosen to detect *Leishmania* DNA using molecular analysis.

For data analysis, the population distribution of each species was calculated by the relative frequencies, mean, standard deviation, median, minimum, and maximum, Spearman's correlation was used to explore each descriptor individually with the population distribution of each species, and predictive models were built based on Linear Regression Analysis using the backward method.

From the total of 666 phlebotomus sampled, the relative abundances were: *Phlebotomus perniciosus* with 80.78%, *P. ariasi* with 16.67%, *P. sergenti* with 2.40% and *Sergentomyia minuta* with 0.15%. *Phlebotomus papatasi* was not detected in this study. In the molecular analysis, it was not detected the presence of *Leishmania* in the chosen females.

There is the need to continue the studies, monitoring of phlebotomus, doing research with the hosts affected by the disease, as well as the reporting of data related to Leishmaniasis, not only in the Parish of Cernache but also for the District of Coimbra in general.

KEY WORDS: *Phlebotomus*, *Leishmania*, Biotopes, Cernache, Portugal



# Índice

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Resumo</b> .....   | <b>i</b>    |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>iii</b>  |
| <b>Índice de Figuras</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>Índice de Tabelas</b> .....  | <b>xiii</b> |
| <b>Lista de abreviaturas e símbolos</b> .....   | <b>xv</b>   |
| <b>1 Introdução</b> .....   | <b>1</b>    |
| 1.1 Histórico.....  | 1           |
| 1.2 Leishmaniose .....  | 2           |
| 1.2.1 Etiologia .....   | 2           |
| 1.2.2 Epidemiologia.....  | 3           |
| 1.2.3 Transmissão .....   | 5           |
| 1.2.4 Reservatórios .....   | 6           |
| 1.2.5 Fatores de risco .....  | 7           |
| 1.2.6 Aspetos clínicos em humanos.....  | 7           |
| 1.2.7 Aspetos clínicos em canídeos e felinos .....                                    | 8           |
| 1.2.8 Morfologia e ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....                        | 9           |
| 1.2.9 Desenvolvimento intravetorial de <i>Leishmania</i> spp. ....                    | 12          |
| 1.3 Flebótomos.....   | 14          |
| 1.3.1 Histórico .....   | 14          |
| 1.3.2 Taxonomia .....   | 14          |
| 1.3.3 Distribuição geográfica.....  | 14          |
| 1.3.4 Morfologia do flebótomo .....   | 16          |
| 1.3.5 Ciclo de vida.....  | 22          |
| 1.3.6 Biologia geral dos flebótomos.....  | 24          |
| 1.4 Os flebótomos e a Leishmaniose em Portugal.....                                   | 25          |
| 1.4.1 Leishmaniose .....  | 25          |
| 1.4.2 Controlo da Leishmaniose .....  | 26          |
| 1.4.3 Estudo dos flebótomos em Portugal .....   | 26          |
| 1.4.4 Controlo dos flebótomos .....   | 27          |
| 1.4.5 Distribuição de flebótomos em Portugal .....                                    | 29          |
| 1.5 Planeamento.....  | 30          |
| 1.5.1 Métodos de captura dos vetores .....  | 30          |
| 1.5.2 Métodos de identificação e deteção de <i>Leishmania</i> spp. em flebótomos..... | 31          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 1.6      | Objetivos.....  | 35        |
| <b>2</b> | <b>Materiais e métodos .....</b>  | <b>37</b> |
| 2.1      | Obtenção de dados.....  | 37        |
| 2.2      | Área de estudo .....  | 37        |
| 2.2.1    | Geomorfologia, Geologia e Hidrografia .....                               | 39        |
| 2.2.2    | Clima .....   | 39        |
| 2.2.3    | Flora e Fauna.....  | 41        |
| 2.3      | Captura de Flebótomos: amostragem e armadilhas.....                       | 41        |
| 2.3.1    | Etapas de captura.....  | 41        |
| 2.3.2    | Armadilha.....  | 42        |
| 2.4      | Métodos de amostragem e ficha de campo.....                               | 43        |
| 2.4.1    | Biótopos .....  | 44        |
| 2.4.2    | Preparação e identificação dos flebótomos .....                           | 45        |
| 2.5      | Identificação taxonómica.....   | 46        |
| 2.5.1    | Chave dicotómica.....   | 47        |
| 2.6      | Análise Estatística.....  | 47        |
| 2.7      | Análise Molecular.....  | 47        |
| 2.7.1    | Preparação dos flebótomos fêmeas .....                                    | 47        |
| 2.7.2    | Extração de DNA dos flebótomos fêmeas .....                               | 48        |
| 2.7.3    | Deteção de DNA .....  | 48        |
| 2.7.4    | Amplificação do kDNA com sequências iniciadoras MC .....                  | 49        |
| 2.7.5    | Amplificação do rDNA com sequências iniciadoras ITS1 .....                | 50        |
| 2.7.6    | Restrição de DNA-RFLP e Polimorfismo.....                                 | 51        |
| <b>3</b> | <b>Resultados e Discussão .....</b>                                       | <b>52</b> |
| 3.1      | Dados gerais dos flebótomos.....  | 52        |
| 3.1.1    | Diversidade de Espécies.....  | 52        |
| 3.1.2    | Abundância relativa das espécies.....                                     | 53        |
| 3.1.3    | Distribuição Geográfica .....   | 54        |
| 3.1.4    | Sexos .....   | 65        |
| 3.2      | Aspetos ecológicos dos flebótomos.....                                    | 66        |
| 3.2.1    | Temperaturas e humidades relativas .....                                  | 66        |
| 3.2.2    | Distribuição e periodicidade.....   | 68        |
| 3.2.3    | Caracterização ecológica dos biótopos e distribuição das populações ..... | 70        |
| 3.3      | Fatores de riscos para atividade flebotomínica.....                       | 74        |
| 3.3.1    | <i>Phlebotomus (Larrousius) ariasi</i> Tonnoir, 1921 .....                | 74        |

|   |   |             |
|---|---|-------------|
| 3.3.2                                       | <i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> Newstead, 1911 ..... | 75          |
| 3.3.3                                       | <i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> Parrot, 1917 .....  | 76          |
| 3.3.4                                       | <i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> Rondani, 1843.....      | 77          |
| 3.4   | Análise Molecular .....   | 77          |
| <b>4</b>                                    | <b>Conclusões.....</b>  | <b>80</b>   |
| <b>5</b>                                    | <b>Referências Bibliográficas .....</b>                           | <b>82</b>   |
| <b>Anexos.....</b>                          |   | <b>xvii</b> |
| <b>Anexo 1 – Ficha de Campo.....</b>        |   | <b>xvii</b> |
| <b>Anexo 2 – Folheto de Divulgação.....</b> |   | <b>xix</b>  |





## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea em 2019 [1].   | 3  |
| <b>Figura 2</b> – Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral em 2019 [1].  | 4  |
| <b>Figura 3</b> – Distribuição mundial de coinfeção de <i>Leishmania</i> /HIV em 2019 [1].  | 5  |
| <b>Figura 4</b> – Distribuição mundial de <i>Leishmania infantum</i> em 2019 [1].   | 6  |
| <b>Figura 5</b> – Fatores de risco maioritários para a Leishmaniose no mundo [1].   | 7  |
| <b>Figura 6</b> – Quadros clínicos: 1) Alopecia periocular, 2) Hiperqueratose nasal, 3) Alopecia na ponta da cauda, 4) Dermatite descamativa na ponta da orelha, 5) Dermatite descamativa na região cervico-torácica, 6) Lesão em região perilabial [10]. | 9  |
| <b>Figura 7</b> – <i>Leishmania</i> spp.: A) morfologia amastigota; B) morfologia promastigota [11].  | 10 |
| <b>Figura 8</b> – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.: representação dividida em estágio com reservatório hospedeiro a) canino e b) humano [12].  | 11 |
| <b>Figura 9</b> – Diagrama do trato digestivo de um flebótomo fêmea e desenvolvimento intravetorial de <i>Leishmania</i> spp. [8, 13, 14].  | 12 |
| <b>Figura 10</b> – Cabeça de <i>Phlebotomus papatasi</i> , pormenores de macho e fêmea [26].  | 17 |
| <b>Figura 11</b> – Detalhe do torso e cerdas com importância taxonómica para identificação de <i>Phlebotomus</i> spp. [27].   | 18 |
| <b>Figura 12</b> – Asa de <i>Phlebotomus papatasi</i> e suas respectivas nervuras [28].   | 19 |
| <b>Figura 13</b> – Detalhe do abdómen de <i>Phlebotomus</i> spp. [29].  | 20 |
| <b>Figura 14</b> – Detalhe do aparelho reprodutor de <i>Phlebotomus perniciosus</i> macho [29].   | 20 |
| <b>Figura 15</b> – Detalhe do aparelho reprodutor de <i>Phlebotomus perniciosus</i> fêmea [29].   | 21 |
| <b>Figura 16</b> – Duração das fases do ciclo de vida dos flebótomos [30].  | 22 |
| <b>Figura 17</b> – Ciclo de vida de flebótomo [30]. Foto (Adulto: Macho) em microscópio com aumento de 40x, por Felipe Melo Machado, 2019.  | 23 |
| <b>Figura 18</b> – Seroprevalência de Leishmaniose Canina em Portugal, 2010 [37].   | 25 |
| <b>Figura 19</b> – Linha temporal dos trabalhos e investigações de cientistas portugueses sobre os flebótomos [8, 35, 49, 50, 51, 52].  | 27 |
| <b>Figura 20</b> – Abundância relativa das espécies em Portugal, em destaque a espécie com maior abundância [49, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66].   | 29 |
| <b>Figura 21</b> – Esquema da organização do minicírculo de <i>Leishmania</i> spp.; Posição dos primers para <i>Leishmania</i> spp.(A) e <i>L. donovani</i> (B). Adaptado de [85].  | 32 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 22</b> – Esquema do RNA mini-exão ou <i>spliced leader</i> /SL de <i>Leishmania</i> e posição dos <i>primers</i> para identificação. Adaptado de [85].   | 33 |
| <b>Figura 23</b> – Mapa de Portugal e referência da área de estudo: Cernache   | 37 |
| <b>Figura 24</b> – Dados climatológicos, histórico simulado entre 1971 e 2000. Estatística Média de 30 anos. Modelo Global e Regional: Ensemble [76].  | 40 |
| <b>Figura 25</b> – Exemplo montado da armadilha luminosa do tipo CDC (B), anexada com um termômetro e medidor de humidade (A) para medição na altura da amostragem (Foto de Felipe Melo Machado, 2020).                              | 42 |
| <b>Figura 26</b> – Pontos de amostragem em Cernache no ano de 2017; classificação dos biótopos. 1 – Conjunto arbóreo, 2 – Jardim, 3 – Conjunto arbóreo, 4 – Quintal, 5 – Horticultura [Google Earth ® 2021].                         | 44 |
| <b>Figura 27</b> – Pontos de amostragem em Cernache no ano de 2018; classificação dos biótopos. 7 – Depósito de lenha, 8 – Galinheiro, 9 – Canil, 10 – Toca de Coelho, 11 – Armazém, 12 – Pocilga [Google Earth ® 2021].             | 45 |
| <b>Figura 28</b> – Termociclador Biorad®T100™ Thermal Cycler utilizado para a amplificação do DNA.   | 49 |
| <b>Figura 29</b> – Condições de amplificação do kDNA com os “primers” MC1 e MC2.   | 50 |
| <b>Figura 30</b> – Condições de amplificação do rDNA com os “primers” IST1 (LITSR e L5.8S)   | 50 |
| <b>Figura 31</b> – Diversidade total de espécies flebotomínicas capturadas na Freguesia de Cernache, Distrito de Coimbra, Portugal nos anos de 2017 e 2018.  | 52 |
| <b>Figura 32</b> - Abundância relativa (%) das espécies de flebótomos capturados na Freguesia de Cernache entre 2017 e 2018.   | 54 |
| <b>Figura 33</b> – Pontos de colheita na Freguesia de Cernache no ano de 2017 / Detalhes da numeração de 1 a 7 na figura 31 [Google Earth ® 2021].   | 55 |
| <b>Figura 34</b> – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2017 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 9 e página 61 (+: presença positiva de flebótomos).   | 57 |
| <b>Figura 35</b> – Pontos de colheita na Freguesia de Cernache no ano de 2018 / Detalhes da numeração de 1 a 3 nas figuras 34 e 35 [Google Earth ® 2021].  | 58 |
| <b>Figura 36</b> – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2018 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 10 e página 62 (+: presença positiva de flebótomos).  | 59 |
| <b>Figura 37</b> – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2018, Ponto de colheita 3 dividido em 3.1 e 3.2 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 10 e página 62 (+: presença positiva de flebótomos). | 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 38</b> – Variação da humidade relativa e temperatura ao longo dos dias de colheita, na freguesia de Cernache, entre junho e julho de 2018.....   | 66 |
| <b>Figura 39</b> – Variação da humidade relativa e temperatura no período total das colheitas de acordo com cada armadilha na freguesia de Cernache, no ano de 2018. ....  | 67 |
| <b>Figura 40</b> – Distribuição das populações ao longo do período das amostragens, no ano de 2018, na freguesia de Cernache.....  | 68 |
| <b>Figura 41</b> – Distribuição das populações (macho e fêmea). fa = frequência absoluta; p= teste de Mann-Whitney. ....   | 69 |
| <b>Figura 42</b> – Distribuição total das populações de flebótomos.....  | 70 |
| <b>Figura 43</b> – Eletroforese em gel de agarose para os produtos de amplificação por PCR, com as sequências iniciadoras MC1 e MC2 / DNA extraídos de fêmeas: Linha 1 – <i>P. ariasi</i> ; Linha 2 e 3 – <i>P. perniciosus</i> ; Linha 4 – <i>P. ariasi</i> ; Linha 5 – <i>P. sergenti</i> ; Linha 6 e 7 – <i>P. perniciosus</i> ; Linha 8 – M01, controlo positivo (amostra de DNA de <i>L. infantum</i> ); Linha 9 – M02, controlo positivo (amostra de DNA de <i>L. infantum</i> ); Linha 10 – controlo negativo (H <sub>2</sub> O); M - marcador HyperLadder™ IV..... | 78 |
| <b>Figura 44</b> - Eletroforese em gel de agarose para os produtos de amplificação por PCR, com as sequências iniciadoras LITSR/L5.8S / DNA extraídos de fêmeas: Linha 1 – <i>P. ariasi</i> ; Linha 2 e 3 – <i>P. perniciosus</i> ; Linha 4 – <i>P. ariasi</i> ; Linha 5 – <i>P. sergenti</i> ; Linha 6 e 7 – <i>P. perniciosus</i> ; Linha 8 – M04, controlo positivo (amostra de DNA de <i>L. infantum</i> ); Linha 9 – controlo negativo (H <sub>2</sub> O); M - marcador HyperLadder™ IV.....  | 78 |



## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Espécies registadas de <i>Leishmania</i> patogénicas para humanos [1].  | 2  |
| <b>Tabela 2</b> – Visão geral de géneros de Phlebotominae, autor e ano de descoberta e sua distribuição geográfica [23].  | 15 |
| <b>Tabela 3</b> – Visão geral das espécies de flebótomos em Portugal  | 29 |
| <b>Tabela 4</b> – Diferentes pares de <i>primers</i> utilizados para deteção do DNA das espécies de <i>Leishmania</i> . Adaptado de [86].   | 34 |
| <b>Tabela 5</b> – Concelhos de Distrito de Coimbra, superfície e densidade populacional [73].   | 38 |
| <b>Tabela 6</b> – Freguesias do Concelho de Coimbra, superfície e densidade populacional [73].  | 38 |
| <b>Tabela 7</b> – Etapas de captura, localização e período de amostragem  | 41 |
| <b>Tabela 8</b> – Espécies e número de flebótomos machos, fêmeas, fêmeas alimentadas e fêmeas com ovos e/ou grávidas amostrados na Freguesia de Cernache em 2017 e 2018.  | 53 |
| <b>Tabela 9</b> – Locais amostrados na Freguesia de Cernache, identificação da armadilha no local, latitude, longitude e flebótomos encontrados, no ano de 2017.  | 61 |
| <b>Tabela 10</b> – Locais amostrados na Freguesia de Cernache, identificação da armadilha no local, latitude, longitude e flebótomos encontrados, no ano de 2018.   | 62 |
| <b>Tabela 11</b> – Humidade relativa e temperatura registadas em 2018.  | 66 |
| <b>Tabela 12</b> – Correlação de Spearman entre a humidade e a temperatura com a quantidade de indivíduos de cada espécie.  | 68 |
| <b>Tabela 13</b> – Distribuição das populações de flebótomos no ano de 2018, na Freguesia de Cernache.  | 69 |
| <b>Tabela 14</b> – Caracterização do biótopo, solo, fitogeografia, local de captura, animais existentes e clima, no ano de 2018 durante junho e julho, n=107.   | 71 |
| <b>Tabela 15</b> – Correlação de Spearman entre a distribuição das espécies com os descritores biótopo, solo, fitogeográfica, local de captura, animais existentes e dados climáticos, na Freguesia de Cernache, durante os meses de junho e julho de 2018, n=107 | 73 |
| <b>Tabela 16</b> – Análise de regressão linear múltipla (método <i>Backward</i> ) entre a distribuição da população de <i>Phlebotomus ariasi</i> com os descritores.  | 74 |
| <b>Tabela 17</b> – Análise de regressão linear múltipla (método <i>Backward</i> ) entre a distribuição da população de <i>Phlebotomus perniciosus</i> com os descritores.   | 75 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 18</b> – Análise de regressão linear múltipla (método <i>Backward</i> ) entre a distribuição da população de <i>Phlebotomus sergenti</i> com os descritores. .... | 76 |
| <b>Tabela 19</b> – Análise de regressão linear múltipla (método <i>Backward</i> ) entre a distribuição da população de <i>Sergentomyia minuta</i> com os descritores. ....  | 77 |

## Lista de abreviaturas e símbolos

% – Percentagem

µm – Micrómetro

CDC – *Center for Diseases and Prevention*

CFE – Centro de Ecologia Funcional

cm – Centímetro

DCV – Departamento de Ciências da Vida

DNA – *Ácido desoxirribonucleico/Deoxyribonucleic Acid*

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

HIV – *Síndrome da Imunidade Adquirida Humana/Human Immunodeficiency Virus*

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS – *Internal transcribed spacers*

kb – kilobase

kDNA – DNA Cinetoplastideal

L/E – Leste

LC – Leishmaniose Cutânea

LCM – Leishmaniose Mucocutânea

LDPK – Leishmaniose Pós Kala-azar

LV – Leishmaniose Visceral

m – Metros

M – Mol

mA – Miliampere

mm – milímetro

mM – Milimole

min. - Minuto

N – Norte

NEMATO-lab – Laboratório de Nematologia

O/W – Oeste

°C – Grau Celsius



OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase/*Polymerase chain reaction*

RFLP – Hidrólise do DNA amplificado por endonuclease/*Restriction fragment length polymorphism*

rDNA – DNA recombinante

RNA – Ácido ribonucleico/*Ribonucleic acid*

RPM – Rotação por Minuto

S – Sul

SL – *Spliced leader*

sp. - espécie

spp. – espécies

UC – Universidade de Coimbra

UEI – Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica

UNL – Universidade Nova de Lisboa

# 1 Introdução

As Leishmanioses são doenças transmitidas por flebótomos e que têm como agente causador, os protozoários do género *Leishmania*, no qual ocorrem diferentes entidades clínicas, dentre elas a Leishmaniose Visceral (LV), conhecida como “kala-azar”, a Mucocutânea (LCM) e Leishmaniose Cutânea (LC) [1].

Em termos gerais, as Leishmanioses representam uma adversidade para a saúde pública, devido a ações humanas (desmatamento, urbanização, saneamento, etc.), fatores ambientais (mudanças climáticas) e fatores individuais (HIV, nutrição e aspetos genéticos) [2].

## 1.1 Histórico

De acordo com os registos históricos, os conhecimentos das Leishmanioses remontam ao tempo dos faraós, onde estudos através da análise de DNA, em materiais antigos e mumificados apresentaram endemicidade da doença durante o período do Cristianismo [3].

O primeiro estudo relacionado com a Leishmaniose foi através de Cunningham, em 1885 na Índia, apresentando casos de LV que eram originalmente designadas como “botão do oriente”. No Brasil, foi identificado clinicamente como “botão de Biskra” [4].

Entretanto, o agente causador do “botão do oriente” oriundo do Velho Mundo foi descoberto por Wright, no ano de 1903 e identificado como *L. tropica* em 1906. Porém Vianna, ao estudar alguns indivíduos de *L. tropica*, verificou que existiam diferenças em relação ao já descrito, denominando então o parasita como *L. brasilienses*, posteriormente corrigido para *L. braziliensis* por Matta, no ano de 1916.

As lesões cutâneas encontradas, foram associadas a um parasita do género *Leishmania*, em 1909, na ocasião em que Lindenberg, Carini e Paranhos, observaram lesões cutâneas de indivíduos acometidos de “úlceras de Baurú”, no estado de São Paulo, Brasil. Somente em 1912, Splendore atribuiu o diagnóstico da forma mucosa da doença [5].

## 1.2 Leishmaniose

As Leishmanioses são doenças causadas por um protozoário difásico (formas amastigotas e promastigotas), pertencente ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae e género *Leishmania* [6].

### 1.2.1 Etiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* (Tabela 1) patogénicas para o ser humano, apresentando manifestações clínicas cutâneas, mucocutâneas e/ou viscerais [1].

**Tabela 1** – Espécies registadas de *Leishmania* patogénicas para humanos [1].

| Subgénero              | Tropismo       | Espécies                        |                                     |
|------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|                        |                | Velho Mundo                     | Novo Mundo                          |
| <i>L. (Leishmania)</i> | Viscerotrópica | <i>L. donovani</i>              | <i>L. infantum</i> <sup>1</sup>     |
|                        |                | <i>L. infantum</i>              |                                     |
| <i>L. (Leishmania)</i> | Dermotrópica   | <i>L. major</i>                 | <i>L. brasiliensis</i>              |
|                        |                | <i>L. tropica</i>               | <i>L. panamensis</i>                |
|                        |                | <i>L. killicki</i> <sup>2</sup> | <i>L. pifanoi</i> <sup>2</sup>      |
|                        |                | <i>L. aethiopica</i>            | <i>L. venezuelensis</i>             |
|                        |                | <i>L. infantum</i>              | <i>L. garhami</i> <sup>2</sup>      |
|                        |                |                                 | <i>L. amazonensis</i>               |
| <i>L. (Viannia)</i>    | Dermotrópica   |                                 | <i>L. braziliensis</i>              |
|                        |                |                                 | <i>L. guyanensis</i>                |
|                        |                |                                 | <i>L. panamensis</i>                |
|                        |                |                                 | <i>L. shawi</i>                     |
|                        |                |                                 | <i>L. naïffi</i>                    |
|                        |                |                                 | <i>L. lainsoni</i>                  |
|                        |                |                                 | <i>L. lindenbergi</i>               |
|                        |                |                                 | <i>L. peruviana</i>                 |
| <i>L. (Vianna)</i>     | Mucotrópica    |                                 | <i>L. colombiensis</i> <sup>3</sup> |
|                        |                |                                 | <i>L. brasiliensis</i>              |
|                        |                |                                 | <i>L. panamensis</i>                |

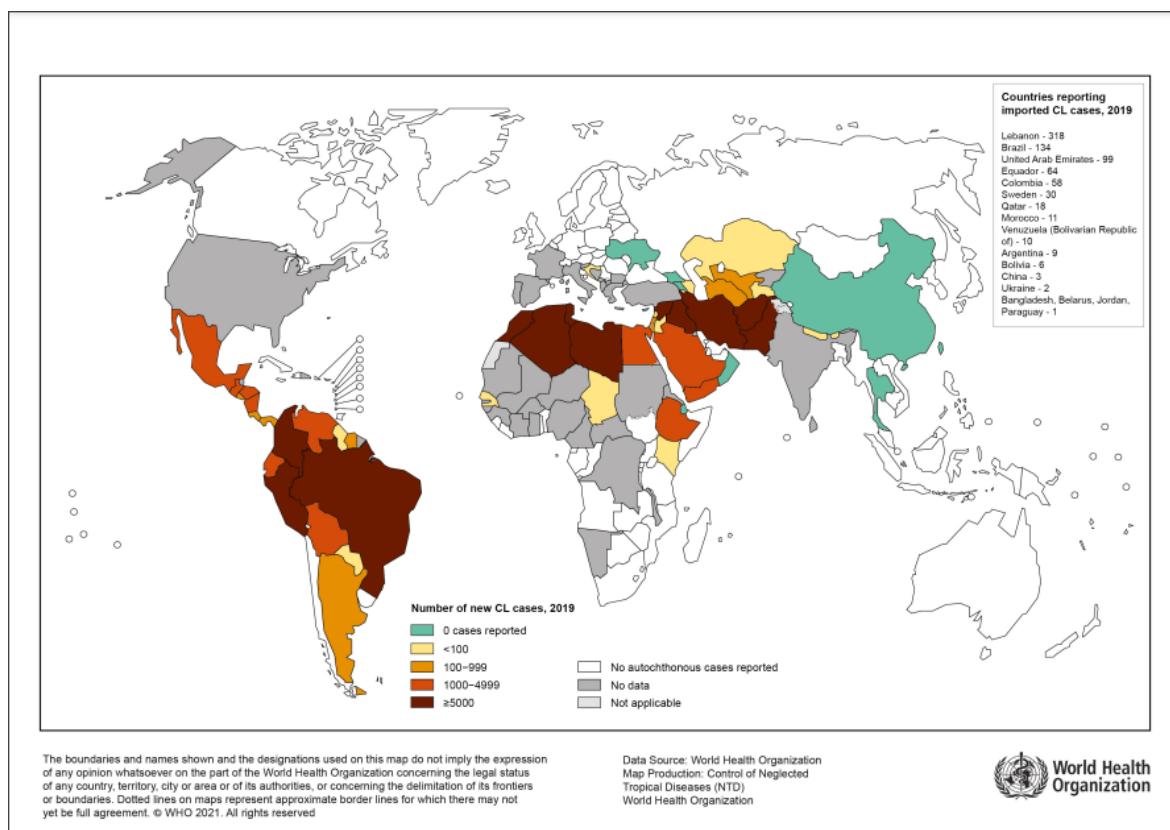
<sup>1</sup> = *L. chagasi*

<sup>2</sup> = encontra-se em debate o estatuto de espécie

<sup>3</sup> = encontra-se em debate a posição taxonómica

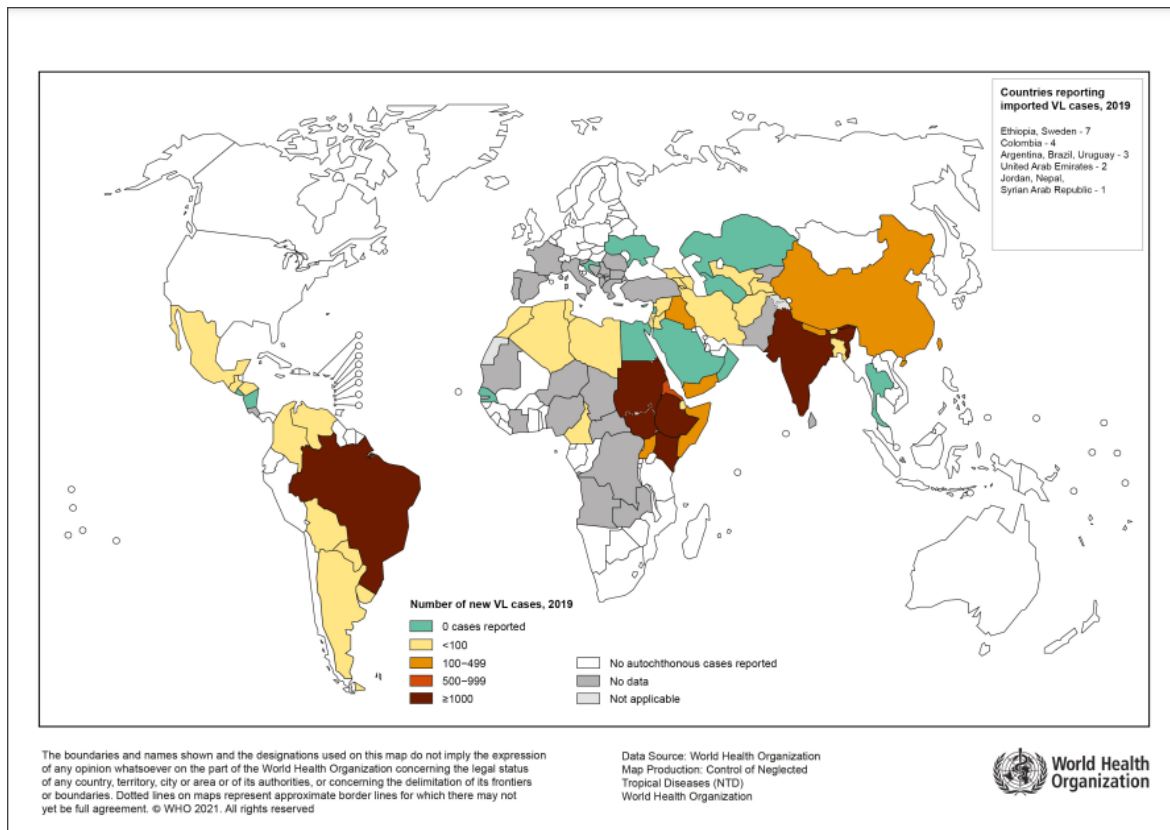
## 1.2.2 Epidemiologia

A OMS considera que as Leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas, estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas no mundo e cerca de 350 milhões estão em zonas de risco para contração da doença. Em 2019, mais de 5 mil casos de LC (Figura 1) foram reportados e mil casos de LV (Figura 2), respectivamente.



**Figura 1** – Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea em 2019 [1].

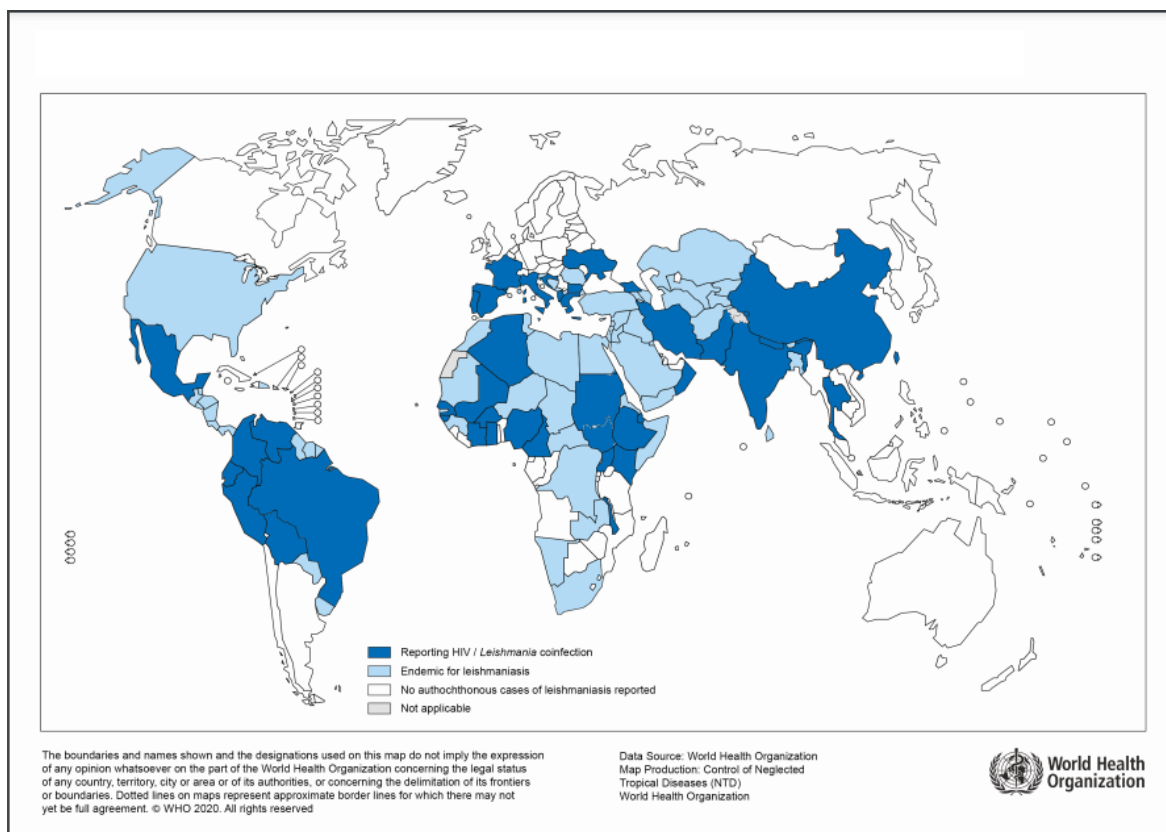
Para a LC, 95% dos casos ocorrem no continente americano, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. No ano de 2018, 85% dos novos registros de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Algéria, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irão, Iraque, Paquistão, a República Árabe da Síria e Tunísia. São estimados que entre 600 mil a 1 milhão de novos casos possam ocorrer ao redor do mundo anualmente [1].



**Figura 2** – Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral em 2019 [1].

A LV (ou “kala-azar”), é considerada fatal se não for tratada corretamente em mais de 95% dos casos. Os países que têm maior incidência são o Brasil, Índia e países do leste de África. São estimados 50 mil a 90 mil novos casos/ano de LV mundialmente. Segundo a OMS, continua a ser uma das principais doenças parasitárias com maior potencial de surto e mortalidade. No ano de 2018, 95% dos registros ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão [1].

Para a LCM, mais de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. Pessoas coinfectadas com *Leishmania*/HIV (Figura 3) possuem uma grande possibilidade de desenvolver a doença clínica completa e altas taxas recidivas com mortalidade. Somente o tratamento antirretroviral reduz o desenvolvimento da doença, retardando as recidivas e melhorando as taxas de sobrevivência. As altas taxas de coinfeção por *Leishmania*/HIV são relatados nos seguintes países: Brasil, Etiópia, Estado de Bihar, China, Índia e México [1].



**Figura 3** – Distribuição mundial de coinfeção de *Leishmania*/HIV em 2019 [1].

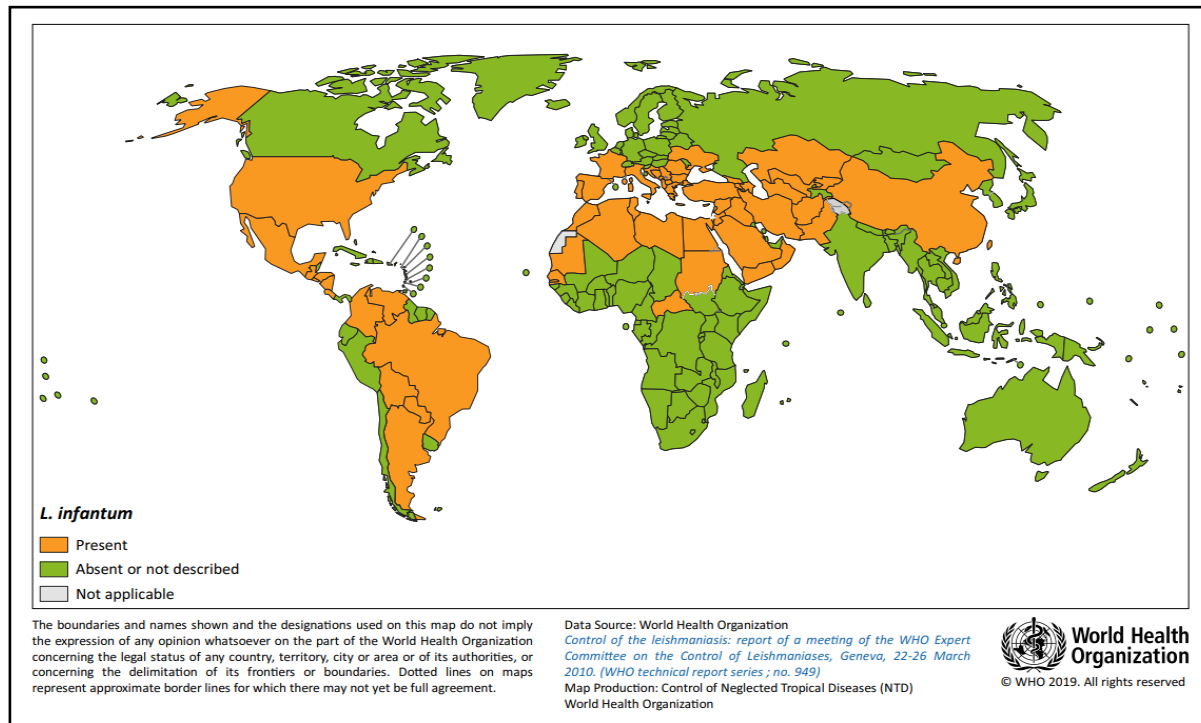
### 1.2.3 Transmissão

A transmissão de *Leishmania* ocorre por via vetorial, através da mordida de flebótomos fêmeas infetadas dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, necessitando da alimentação sanguínea para postura dos ovos. As epidemiologias das Leishmanioses dependem muito da característica de cada espécie e/ou do flebótomo, da qualidade ecológica local da transmissão, e também da exposição populacional do parasita em relação ao comportamento humano e animal [7].

A LC é causada por espécies dos subgéneros *Leishmania* e *Viannia* (Tabela 1), enquanto, a LCM é principalmente causada pela espécie *L. braziliensis* e em menores casos por *L. panamensis*. A LV tem registos de espécies como *L. donovani* e *L. infantum* [8].

A espécie *L. infantum* (Figura 4), tem sido a única espécie presente na Europa (com exceção da Grécia, no qual existe *L. tropica*), sendo assim o agente responsável pelos casos reportados de LV e LC nessa região, e para o restante da Bacia do Mediterrâneo, somente a LV [1].

Alguns autores consideram que *L. infantum* possuem forma genética indistinta de *L. chagasi*, no qual o parasita foi descrito como causador da doença no continente americano, durante o período dos descobrimentos [8].



**Figura 4** – Distribuição mundial de *Leishmania infantum* em 2019 [1].

#### 1.2.4 Reservatórios

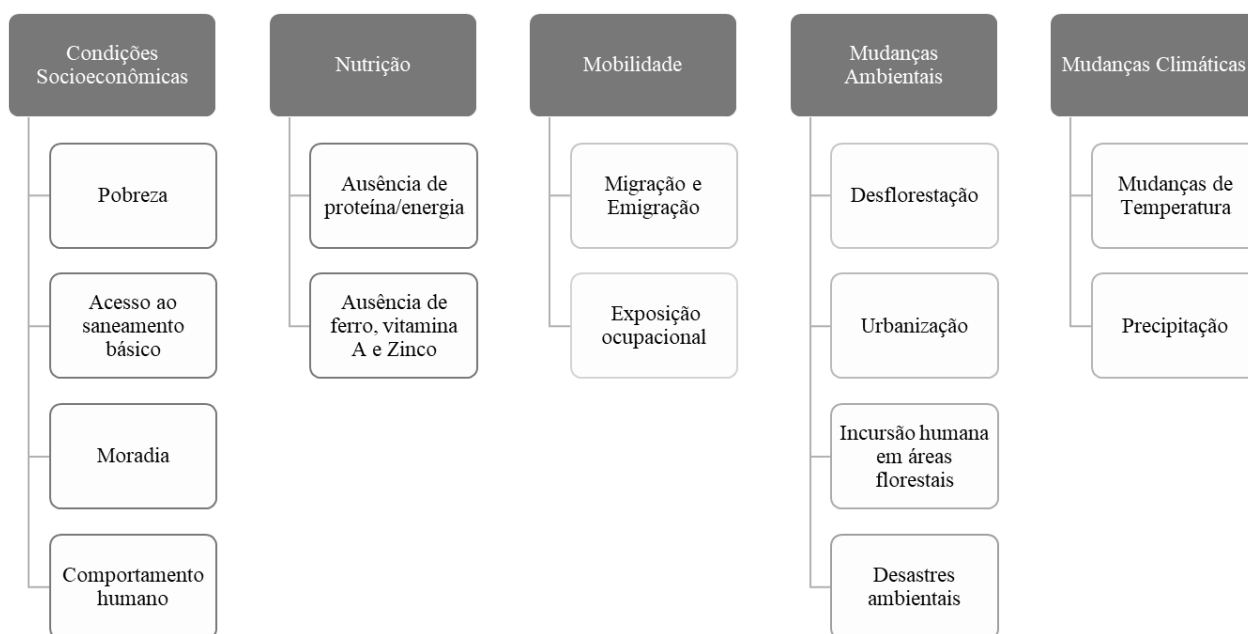
As zoonoses têm sido registradas em diferentes espécies de mamíferos não humanos, tais como canídeos, felinos, roedores e marsupiais. O cão (*Canis lupus familiaris*) é o principal reservatório hospedeiro da *Leishmania* e afeta de maneira indireta crianças e adultos com imunidade comprometida [7, 8].

Dentre os possíveis hospedeiros reservatórios silváticos estão a raposa (*Vulpes*), a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), o gambá (*Didelphis marsupialis*) e também o rato selvagem (*Proechimys* sp.) na Amazônia brasileira e Cerrado [7, 8].

A escolha para o estudo de um reservatório hospedeiro específico, é relativamente complexa, pois existem múltiplas variáveis. Entre elas, destacam-se a abundância e distribuição do reservatório hospedeiro e a taxa de infecção para o flebótomo vetor. Essa escolha, depende ainda de uma conjuntura epizootica, ou seja, a doença não escolherá somente um animal. Por consequência, o estudo e investigação para vários reservatórios hospedeiros é menos frequente [7, 8].

### 1.2.5 Fatores de risco

Para análise de uma determinada zoonose, é necessário ter atenção a algumas situações e/ou condições (Figura 5), que podem influenciar a transmissão relacionadas com a doença. Existem fatores como por exemplo, desastres ambientais, que implicam a mobilidade das pessoas para outros lugares, que muitas vezes são considerados zonas de risco [1].



**Figura 5** – Fatores de risco maioritários para a Leishmaniose no mundo [1].

### 1.2.6 Aspectos clínicos em humanos

As Leishmanioses no homem apresentam quatro formas, que podem variar com a espécie de *Leishmania* e com a resposta imunológica do indivíduo [1]:

- a. Leishmaniose Cutânea (LC) - produção de úlceras expostas no corpo (rosto, braços e pernas), lesões que dependendo da gravidade e quantidade podem causar incapacidades muito graves. Com a cicatrização das feridas, as úlceras deixam marcas permanentes, o que pode levar a estigmatização [1].
- b. Leishmaniose Visceral (LV) - caracterização de episódios irregulares de febre, perda notável de peso, inchaço do baço e do fígado, além de anemia grave. Em caso de não



tratamento dentro de um período de dois anos, podem levar à morte, tendo uma taxa de mortalidade de 100% [1].

- c. Leishmaniose Mucocutânea (LCM) - produção de lesões tópicas que podem destruir parcialmente ou totalmente as membranas mucosas da cavidade do nariz, boca e garganta, bem como, de tecidos circundantes. Podem, também, levar em algumas conjunturas, a total exclusão social; são conhecidas no continente americano como “spundia” (denominação dada por Escomel) [7].
- d. Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar (LDPK) - caracterização por uma erupção cutânea incolor plana (hipo-pigmentada), combinada com alguma caracterização cutânea (maculopapular) ou elevada (nodular), geralmente em pacientes que tiveram tratamento e tiveram recuperação da LV. A LDPK aparece após 6 meses a 1 ano ou mais da cura da LV, mas em alguns casos podem ocorrer simultaneamente com a LV. Nestes casos sua epidemiologia é específica na África Oriental e no Sudeste Asiático [1].

### **1.2.7 Aspectos clínicos em canídeos e felinos**

O cão doméstico tem um papel importante na epidemiologia da LV em áreas consideradas endêmicas, por ser o principal reservatório hospedeiro doméstico de *L. infantum*. De um modo semelhante à infecção humana, sintomas viscerais e cutâneos e elevado número de insetos na pele favorecem a transmissão do inseto vetor.

Os quadros clínicos (Figura 6) dependem muito da resposta imunológica do cão e do tipo de *Leishmania* inoculado. Os primeiros sintomas que surge são febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia. Em seguida, apresentam manifestações na pele, como úlceras na região do focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal. Algumas preparações citológicas de pele de orelha, demonstram presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Para os canídeos selvagens, como as raposas, as manifestações podem ser ausentes. Entretanto nos felinos, como gatos domésticos, são sobretudo cutâneas, sendo úlceras e pápulas, na zona do nariz, orelhas e região ocular. Além de dermatite generalizada e alopecia multifocal, o aspecto clínico visceral é raro, podendo ocorrer linfadenomegalia [8,9].



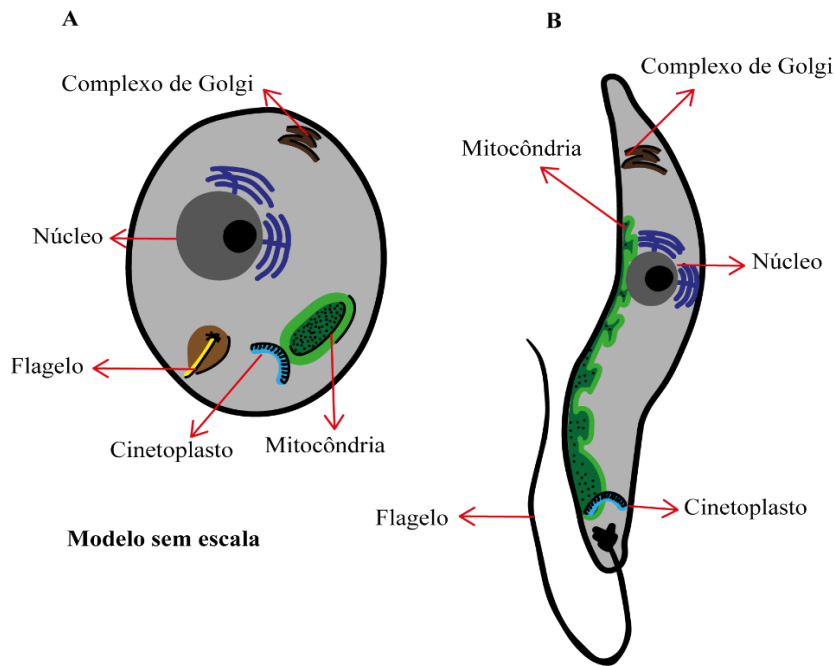
**Figura 6** – Quadros clínicos: 1) Alopecia periocular, 2) Hiperqueratose nasal, 3) Alopecia na ponta da cauda, 4) Dermatite descamativa na ponta da orelha, 5) Dermatite descamativa na região cervico-torácica, 6) Lesão em região perilabial [10].

### 1.2.8 Morfologia e ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Os protozoários são digenéticos, que de acordo com a etimologia da palavra, significa que completam o seu ciclo em pelo menos dois hospedeiros. Além disso, possuem morfologia difásica (Figura 7), sendo a forma promastigota flagelada e extracelular no hospedeiro invertebrado e/ou vetor, e a forma amastigota sem flagelo e intracelular no reservatório hospedeiro [8].

A forma amastigota reside no macrófago e em outros tipos de células fagocitárias presentes no sistema de vertebrados, incluindo humanos. Esta é considerada imóvel, esférica a oval em sua forma, mede em média de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largura e, possui, também, um pequeno flagelo intracelular [11].

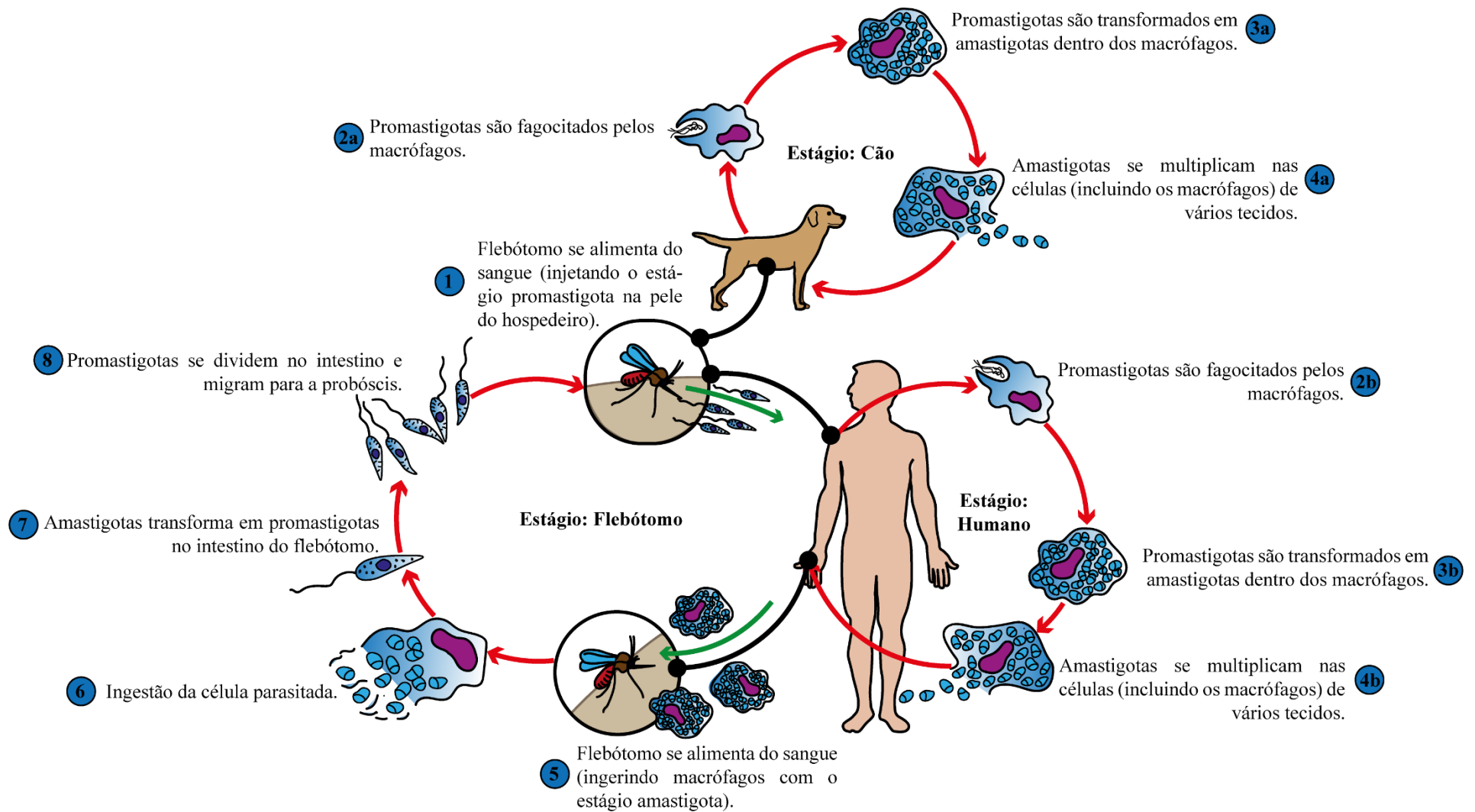
A forma promastigota é encontrada no trato alimentar dos flebótomos, e é relativamente maior que a forma amastigota, com corpo alongado. Mede entre 15 e 30  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5  $\mu\text{m}$  de largura. Apresenta um longo flagelo que possui praticamente o mesmo tamanho do seu comprimento [11].



**Figura 7** – *Leishmania* spp.: A) morfologia amastigota; B) morfologia promastigota [11].

O ciclo de vida (Figura 8) tem interação entre o vetor e o reservatório hospedeiro e é excepcionalmente relativo a *Leishmania* spp., tendo a sua transmissão em meio zoonótico e/ou antroponótico. O ciclo inicia-se com um flebótomo que se infeta ao ter a sua refeição sanguínea em um reservatório hospedeiro infetado, ingerindo as formas amastigotas presentes nas células mononucleares fagocitárias na pele do indivíduo. No trato alimentar do flebótomo, os parasitas desenvolvem-se em formas promastigotas que ficam na parede intestinal e se multiplicam por fissão binária longitudinal. A transformação metacíclica fica completa após, aproximadamente, uma semana, migrando em seguida para o estômago e, por fim, até à probóscide [8, 10, 11, 12].

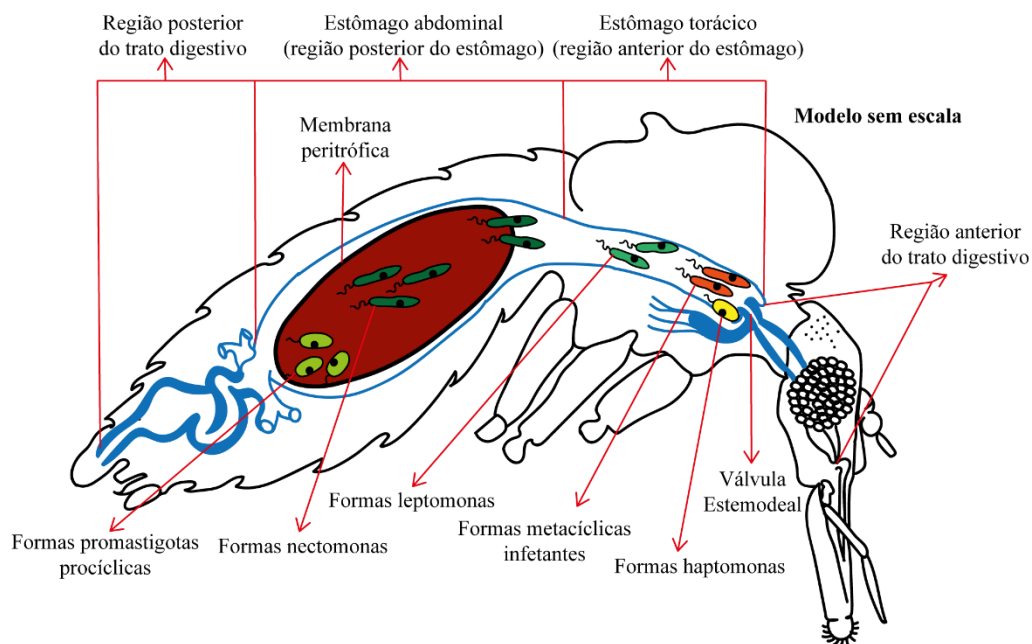
Após uma nova refeição, o flebótomo regurgita a forma promastigota metacíclica na zona da mordida, introduzindo o parasita no novo reservatório hospedeiro. Em seguida, a forma promastigota é fagocitada por macrófagos, nos quais, no interior de fagossomas, os parasitas desenvolvem-se em forma amastigota, dividindo-se por cissiparidade até a lise celular. O protozoário sendo fagocitado por novos macrófagos, continua o ciclo de infecção. A doença clínica torna-se aparente entre semanas a meses após a infecção, dependendo das espécies de parasita e da resposta imunológica do indivíduo infetado. O ciclo reinicia-se com uma nova refeição do flebótomo [8, 10, 11, 12].



**Figura 8** – Ciclo de vida de *Leishmania* spp.: representação dividida em estágio com reservatório hospedeiro a) canino e b) humano [12].

### 1.2.9 Desenvolvimento intravetorial de *Leishmania* spp.

O ciclo intravetorial (Figura 9) tem o seu início com a refeição sanguínea, através da ingestão da forma amastigota do protozoário, presente no reservatório hospedeiro infetado. O sangue ingerido é transportado para o estômago abdominal, onde rapidamente é revestido pela membrana peritrófica. Esta, desempenha uma função protetora que impede que o epitélio intestinal sofra danos provenientes da ingestão do sangue e do processo digestivo, atuando assim como uma proteção contra agentes infecciosos [14].



**Figura 9** – Diagrama do trato digestivo de um flebótomo fêmea e desenvolvimento intravetorial de *Leishmania* spp. [8, 13, 14].

O desenvolvimento na forma promastigota acontece entre 18 e 24 horas após a alimentação sanguínea, transformando-se na forma promastigota procíclica por cissiparidade. Esta possui forma oval e um pequeno flagelo. Entre 48 e 96 horas pós infecção, a sua multiplicação é reduzida e irrompe um crescimento flagelar. A nova forma promastigota assume um corpo comprido e delgado, denominada promastigota nectomona, que migram após o rompimento da membrana peritrófica e anexam-se com auxílio dos flagelos, nas microvilosidades da parede intestinal [8, 13, 14, 15, 16].

Após 96 horas, com diurese feita pelo flebótomo, as nectomonas migram para a válvula estemodeal, com auxílio de hemidesmossomas produzidos no flagelo. Estas,

anexam-se na membrana quitinosa e rapidamente transformam-se em formas promastigotas leptomonas, cuja morfologia é mais curta e constituem a segunda fase de multiplicação intravetorial [8, 13, 14, 15, 16].

As formas promastigotas leptomonas sofrem alteração morfológica, transformando-se em promastigotas metacíclicos, entre 5 e 7 dias. As leptomonas são as formas infetantes para o hospedeiro reservatório vertebrado, possuindo longos flagelos, corpo pequeno e afilado, sem fase de multiplicação e com alta capacidade de evasão da resposta imunológica do hospedeiro reservatório vertebrado. As formas haptomonas surgem paralelamente nessa fase e ligam-se à válvula estemodal, denominadas como paramastigotas, que em algumas espécies de *Leishmania*, migram para o estômago e faringe, para que se possam multiplicar e diferenciam-se em seguida em promastigotas metacíclicos [8, 13, 14, 15, 16].

## **1.3 Flebótomos**

### **1.3.1 Histórico**

De acordo com os estudos dos flebótomos, a sua primeira descrição ocorreu no ano de 1786 por Scopoli, na Itália, com a citação de *Bibio papatasi*. Entretanto, os primeiros flebótomos na América, foram descritos no ano de 1907 por Coquillett e no Brasil, no ano de 1912, por Lutz e Neiva. Em África, a descrição ocorreu no ano de 1904 pelos irmãos Sergent e na Índia, no ano de 1913 por Mackie [24, 25].

### **1.3.2 Taxonomia**

Os flebótomos pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Psychodomorpha, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae [21]. Ao nível do género, ainda existe alguma controvérsia. Em 1977, Lewis e alguns pesquisadores propuseram uma organização em cinco géneros, sendo eles: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, e com a adição, em 1987, do género *Chinius*, por Leng. Esta classificação perdurou até 1998 em que, através dos trabalhos de Léger & Depaquit, os géneros foram designados por espécies do Velho Mundo. Assim, e através de Galati, nos anos de 1995 e 2003, surgiu uma nova classificação para as espécies do Novo Mundo, sendo a classificação da subfamília Phlebotominae revista e definida em 34 géneros, descritos na Tabela 2 [8].

### **1.3.3 Distribuição geográfica**

A distribuição dos flebótomos, tem predominância em regiões equatoriais, temperadas, tropicais e/ou subtropicais (Europa, Ásia, América Central e América do Sul e Austrália). Os flebótomos podem ser encontrados abaixo do nível do mar (proximidades do Mar Morto) até uma altitude de 3 km (Afeganistão). A sua ecologia depende de fatores climáticos, flora local, além de elementos bióticos e abióticos condicionantes para o seu ciclo de vida [21].

**Tabela 2** – Visão geral de gêneros de Phlebotominae, autor e ano de descoberta e sua distribuição geográfica [23].

| <b>Gêneros de Phlebotominae</b> | <b>Autor e Ano de descoberta</b> | <b>Distribuição geográfica</b>                                   |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| <i>Australophlebotomus</i>      | Theodor, 1948                    | Oceânia  |
| <i>Bichromomyia</i>             | Artemiev, 1991                   | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Brumptomyia</i>              | França & Parrot, 1921            | América Central e do Sul   |
| <i>Chinius</i>                  | Leng, 1987                       | China, Eurásia e Norte de África                                 |
| <i>Dampfomyia</i>               | Addis, 1945                      | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Deanemyia</i>                | Galati, 1995                     | América do Sul   |
| <i>Demeillonius</i>             | Davidson, 1980                   | Indo-Malásia, África (Sul do Sahara)                             |
| <i>Evandromyia</i>              | Mangabeira, 1941                 | América do Sul   |
| <i>Expapillata</i>              | Galati, 1995                     | América do Sul   |
| <i>Grassomyia</i>               | Theodor & Mesghali, 1964         | África, sul do Sahara  |
| <i>Hertigia</i>                 | Fairchild, 1949                  | América Central  |
| <i>Idiophlebotomus</i>          | Quate & Fairchild, 1961          | Oceânia, Indo-Malásia, Eurásia e Norte de África                 |
| <i>Lutzomyia</i>                | França, 1924                     | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Martinsmyia</i>              | Galati, 1995                     | América do Sul   |
| <i>Micropygomyia</i>            | Barretto, 1962                   | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Migonemyia</i>               | Galati, 1995                     | América do Sul   |
| <i>Nyssomyia</i>                | Barretto, 1962                   | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Oligodontomyia</i>           | Galati, 1995                     | América do Sul   |
| <i>Parvidens</i>                | Theodor & Mesghali, 1964         | África (Sul do Sahara)   |
| + <i>Phlebotomiella</i>         | Meunier, 1905                    | + extinta  |
| + <i>Phlebotomites</i>          | Hennig, 1972                     | + extinta  |
| <i>Phlebotomus</i>              | Rondani & Berté, 1840            | Indo-Malásia, África (Norte e Sul do Sahara) e Eurásia           |
| <i>Pintomyia</i>                | Costa Lima, 1932                 | América Central e do Sul   |
| <i>Pressatia</i>                | Mangabeira, 1942                 | América Central e do Sul   |
| <i>Psathyromyia</i>             | Barretto, 1962                   | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Psychodopygus</i>            | Mangabeira, 1941                 | América do Norte, Central e do Sul                               |
| <i>Sciopemyia</i>               | Barretto, 1962                   | América Central e do Sul   |
| <i>Sergentomyia</i>             | França & Parrot, 1920            | Oceânia, Indo- Malásia, África (Norte e Sul do Sahara) e Eurásia |
| <i>Spelaeomyia</i>              | Theodor, 1948                    | África, Sul do Sahara  |
| <i>Spelaeophlebotomus</i>       | Theodor, 1978                    | África, Sul do Sahara  |
| <i>Trichophoromyia</i>          | Barretto, 1962                   | América Central e do Sul   |
| <i>Trichopygomyia</i>           | Barretto, 1962                   | América Central e do Sul   |
| <i>Viannamyia</i>               | Mangabeira, 1941                 | América Central e do Sul   |
| <i>Warileya</i>                 | Hertig, 1948                     | América Central e do Sul   |



### 1.3.4 Morfologia do flebótomo

Os flebótomos são dípteros de cores amareladas com pequenas variações de tonalidade castanho-claro e castanho-escuro. Ao longo do corpo é revestido por cerdas, formações quitinosas e protetoras. Possuem um tamanho extremamente pequeno, entre 2 a 5mm de comprimento, com variações para o macho e fêmea, respectivamente. Possuem antenas longas, dimorfismo sexual com importância para fins de taxonomia.

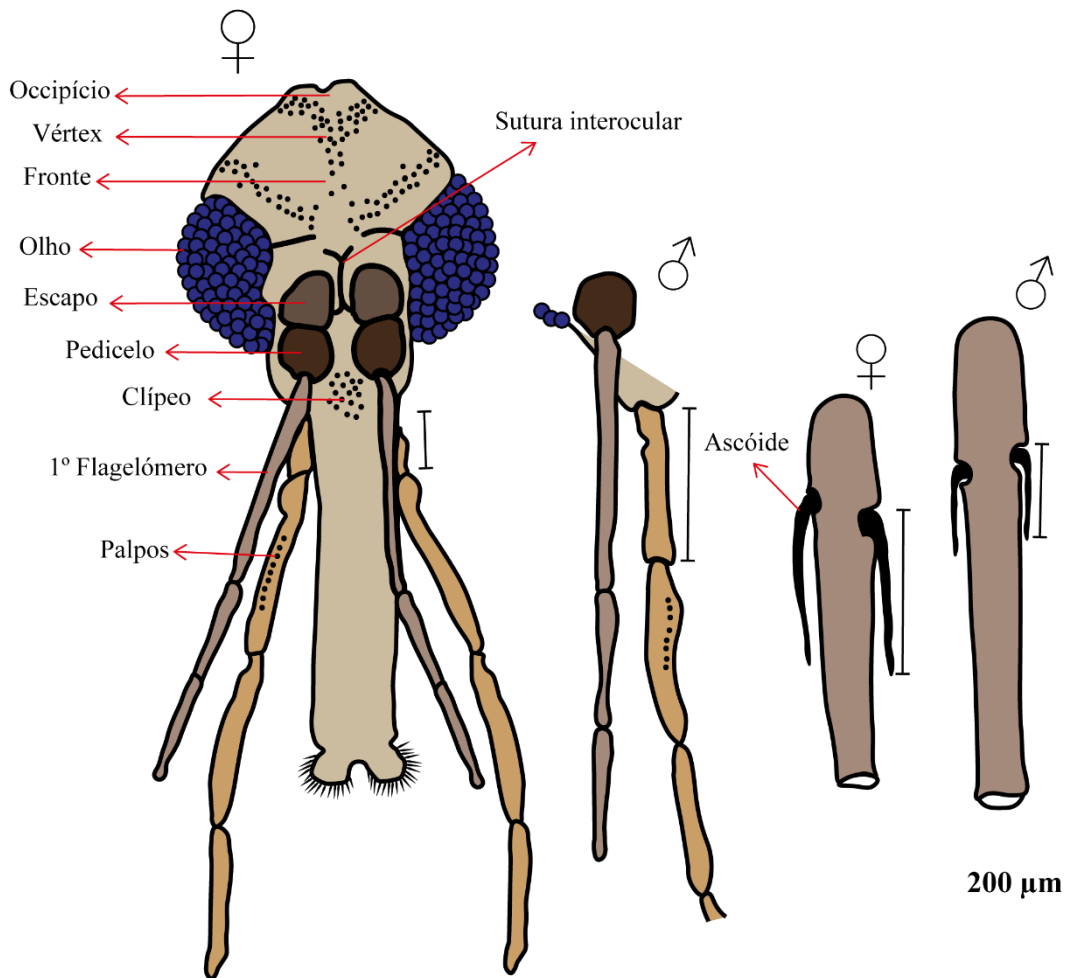
A morfologia e o ciclo de vida do flebótomo, basearam-se nas referências 20, 21, 22, 23 e 30.

#### Cabeça:

A cabeça (Figura 10) apresenta um par de olhos compostos e separados, inseridos na fronte-lateral, aloja-se ainda um par de antenas através da sutura interocular e acima do clipeo. Na zona apical, situa-se o occipício, onde geralmente não se observam cerdas, ao contrário do vértex que é totalmente revestido por cerdas.

O aparelho bucal é picador-sugador, anexado bilateralmente por um par de mandíbulas e um par de maxilas. Além disso, tem a presença de palpos articulados com cinco segmentos. No interior do aparelho bucal, na cavidade cefálica do flebótomo, estão inseridos o cibário e a faringe, que agem como recetor da alimentação sanguínea, sendo revestido por espículas e/ou cerdas.

O macho e a fêmea possuem semelhanças na morfologia das suas antenas, possuindo 16 segmentos: o escapo (com formato cilíndrico); o pedicelo (em formato esférico), que recebe e reveste o flagelo antenal; e 14 flagelómeros compridos e estreitos, que são segmentos do flagelo antenal. Os flagelómeros possuem um par de áscoides, que possuem diferenciação para os machos e fêmeas, sendo utilizados como fator de identificação das espécies.

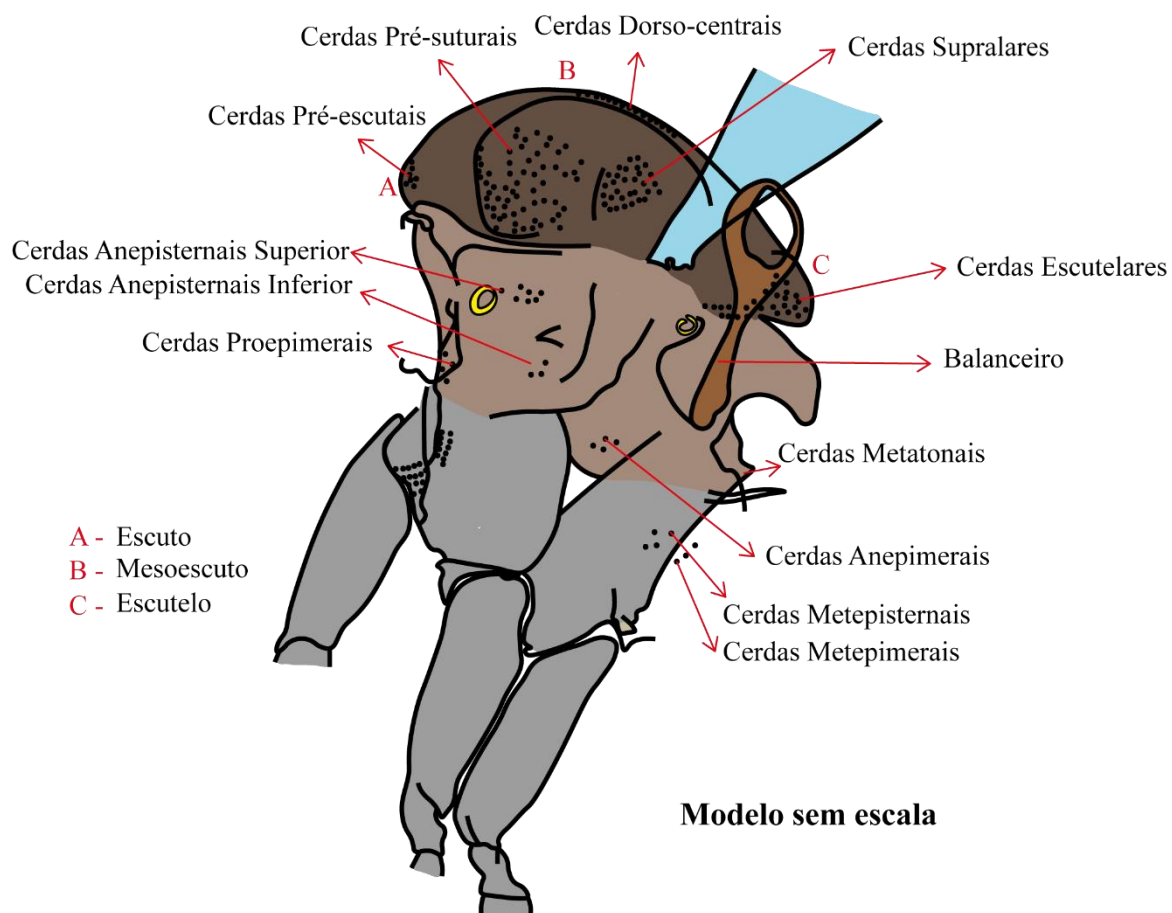


**Figura 10** – Cabeça de *Phlebotomus papatasi*, pormenores de macho e fêmea [26].

### Tórax:

A região torácica (Figura 11) tem um aspeto corcovado, com três espaços característicos na zona dorsal: o escuto, onde são inseridas cerdas protetoras; o mesoescuto com cerdas longas e finas; e, no fim dessa zona, o escutelo, com cerdas de revestimento e proteção. Na zona do mesotórax, existe um par de asas, seguido de um par de balanceiros que se projetam até ao escutelo.

Na região ventral, existe um par de patas, cobertas de cerdas, por cada segmento torácico, possuindo entre 4 e 5 mm de comprimento. Estas são compostas por coxa, trocânter, fémur, tíbia e tarso. Este último segmento possui, ainda, 5 segmentos extras.

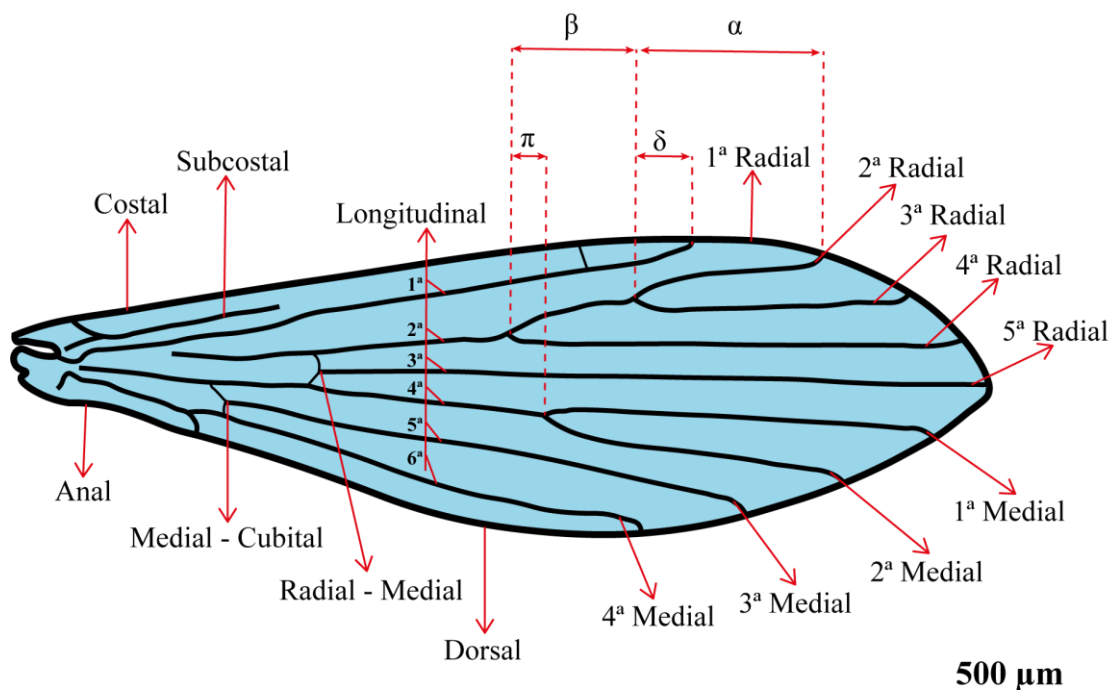


**Figura 11** – Detalhe do tórax e cerdas com importância taxonômica para identificação de *Phlebotomus* spp. [27].

Asas:

A asa (Figura 12) tem forma lanceolada, revestida por cerdas e marcantes nervuras, sendo elas: a costal, situada próxima ao mesoescuto; a anal, na extremidade inferior com alinhamento em direção ao abdômen; a subcostal, como projeção para seis longas nervuras longitudinais e duas nervuras transversais. A 2ª longitudinal possui uma primeira bifurcação, dando origem as nervuras 2ª e 4ª radial e uma segunda bifurcação, dando origem a 3ª radial. A 4ª longitudinal tem uma ramificação única, dando origem as nervuras 1ª e 2ª medial.

As outras nervuras longitudinais não possuem ramificações, entretanto, apresentam nervuras transversais: a anterior medial-cubital e a posterior radial-medial, que têm como função, o suporte na identificação taxonômica. Adicionalmente, o comprimento e distância de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\pi$  são apenas para parâmetros taxonômicos.

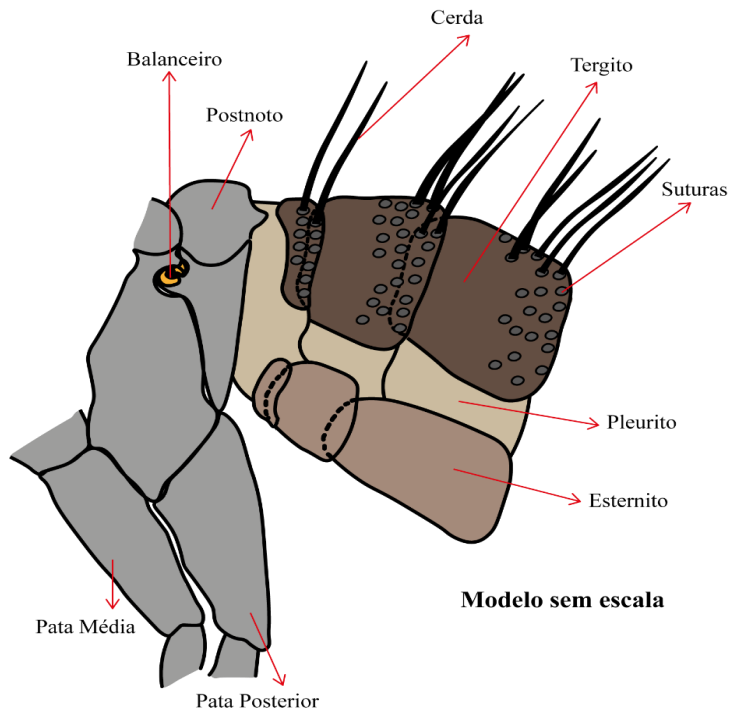


**Figura 12** – Asa de *Phlebotomus papatasi* e suas respectivas nervuras [28].

#### Abdómen:

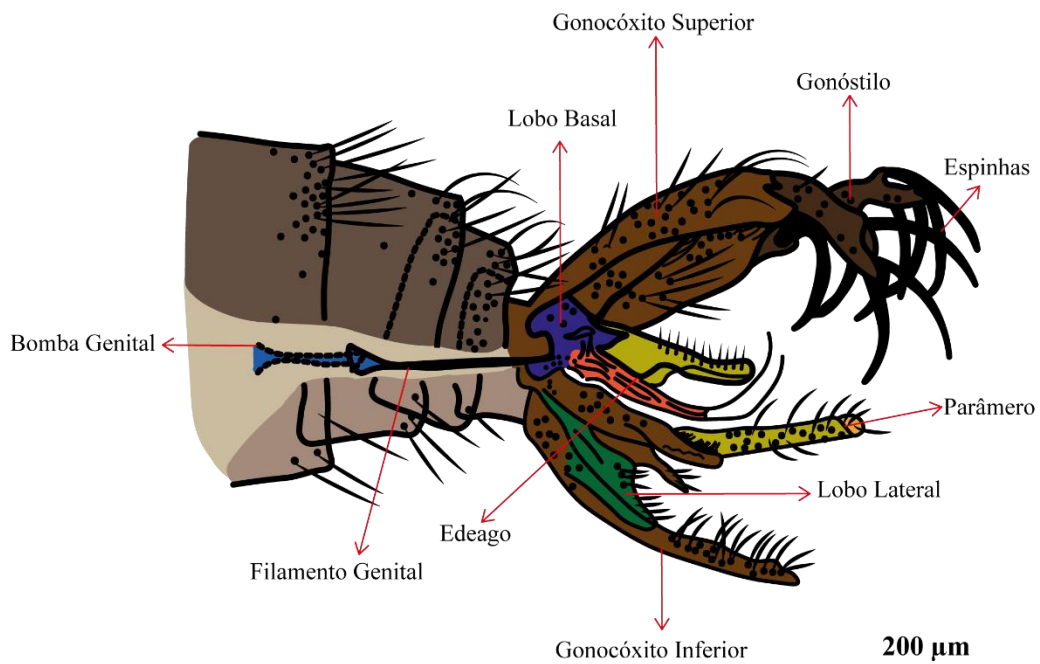
O abdómen (Figura 13) do flebótomo apresenta uma forma cilíndrica e possui três formas anatómicas importantes para a taxonomia: o tergito, com longas cerdas e espessas na parte dorsal do abdómen; o esternito, na parte ventral; e o pleurito, ao meio, que liga essas estruturas anatómicas. Em algumas espécies há a presença do postnoto, uma estrutura que está inserida posteriormente ao escutelo e desempenha função de proteção e revestimento para o abdómen.

Os dez segmentos do abdómen possuem uma forma padronizada, com exceção dos últimos quatro segmentos, modificados para o macho com apêndices genitais e dos últimos três segmentos para fêmea. É importante reconhecer essas estruturas, pois são um bom suporte e auxílio na identificação do sexo das espécies.



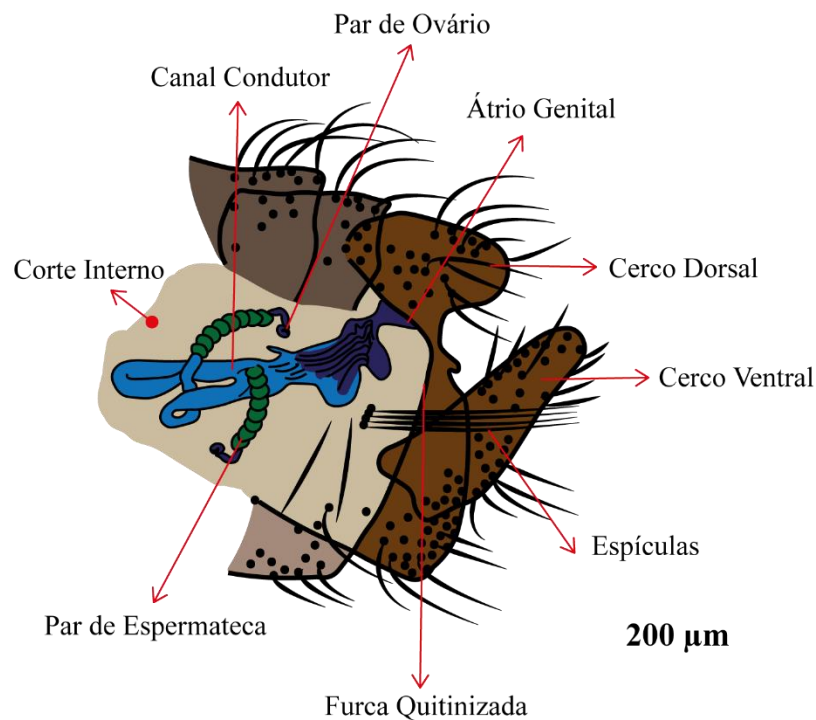
**Figura 13** – Detalhe do abdômen de *Phlebotomus* spp.

Através do dimorfismo sexual, o flebotomo macho (Figura 14) possui apêndices genitais externos, com um par falciforme, ou seja, com aspeto de garra, pelas marcantes espinhas quitinizadas.



**Figura 14** – Detalhe do aparelho reprodutor de *Phlebotomus perniciosus* macho [29].

As estruturas superiores do abdômen do flebótomo macho são compostas pelo gonocóxite superior, inserido no lobo basal, o gonóstilo com espinhas longas e grossas, nas estruturas inferiores, o gonocóxite inferior, inserido no lobo lateral, e no meio o parâmetro, que auxilia o encaixe para cópula. Possui também edeago, como uma estrutura semelhante ao pênis, que está ligado por estruturas internas, como um par de testículos, um par de canais deferentes, um filamento genital ou vesícula seminal e um canal ejaculador, ligados a uma bomba genital.



**Figura 15** – Detalhe do aparelho reprodutor de *Phlebotomus perniciosus* fêmea [29].

O flebótomo fêmea (Figura 15), ao contrário do macho, apresenta os últimos segmentos em forma cônica, e com dois segmentos arredondados, denominados cercos com espículas menores quitinizadas. As suas estruturas sexuais são inteiramente internas, constituídas por um par de espermatecas, nas quais ficará alojado o espermatozoário do macho após a cópula. A espermateca tem uma composição alongada ou colo, que está inserido num canal condutor ao átrio genital. Na zona apical da espermateca estão inseridos um par de ovários.

### 1.3.5 Ciclo de vida

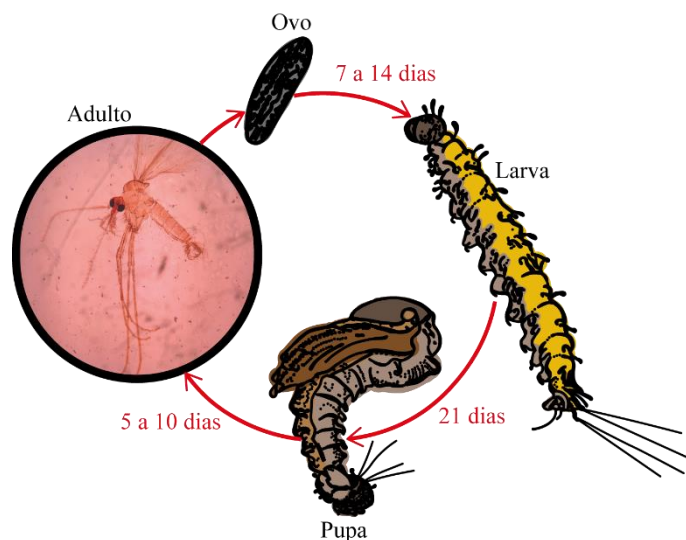
O ciclo de desenvolvimento do flebótomo é holometabólico, com metamorfose completa, apresentando quatro etapas: ovo, larva (que possui quatro estádios extras), pupa e imago e/ou adulto (Figuras 16 e 17).

O ovo apresenta uma forma elíptica com comprimento entre 0,3 e 0,5 mm. O seu revestimento possui uma membrana coriácea, rija, com ornamentações variadas e colorações diferentes de acordo com a fase da postura, sendo inicialmente branco e tornando-se gradualmente castanho-escuro e depois negro.

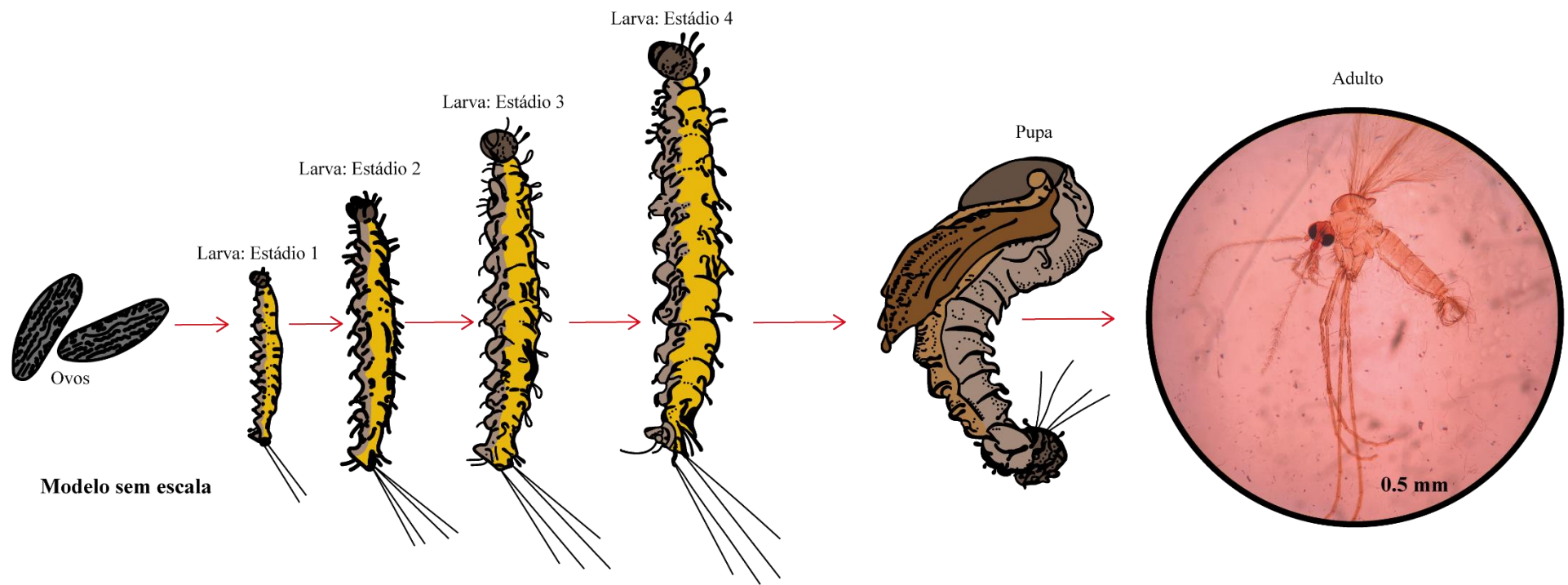
A larva tem uma morfologia vermiforme, com a cabeça, tórax e abdómen divididos, e revestido por uma proteção queratinizada. O abdómen é composto por nove segmentos, sem desenvolvimento genital, com presença de pseudópodes ou falsas patas, e no último segmento tem a inserção de cerdas caudais, sendo um par no primeiro estágio, e dois pares no segundo ao quarto estágio. As larvas alimentam-se de matéria orgânica e/ou em decomposição e possuem fraca mobilidade.

A pupa apresenta a fusão da cabeça e do tórax, e a divisão entre cefalotórax e abdómen, sendo essa fusão globosa. Os últimos segmentos do abdómen são cobertos pela exúvia, uma cutícula deixada pelos estádios larvares e apresenta imobilidade.

O desenvolvimento ocorre em dois meios distintos, no qual o adulto tem vida aérea e a forma imatura tem vida terrestre, podendo variar de espécie para espécie de acordo com a disponibilidade alimentar, condições climáticas e incidência de luz e/ou fotoperíodo.



**Figura 16** – Duração das fases do ciclo de vida dos flebótomos [30].



**Figura 17** – Ciclo de vida de flebotomo [30]. Foto (Adulto: Macho) em microscópio com aumento de 40x, por Felipe Melo Machado, 2019.



### 1.3.6 Biologia geral dos flebótomos

Os flebótomos machos e fêmeas têm como base alimentar o açúcar vegetal [31] e secreções de insetos (afídeos/pulgões) [32]. No entanto, as fêmeas têm comportamento alimentar hematófago, ou seja, há necessidade de alimentação sanguínea para que possam ter a maturação dos seus ovários e reproduzirem-se.

A atividade de um flebótomo adulto é predominantemente crepuscular e noturna, devido à sensibilidade a temperaturas altas e preferência por uma humidade relativa mais alta. A perturbação do seu habitat, pode condicionar a atividade em períodos diurnos. A força do vento também influencia a qualidade do voo ocorrendo interrupção da atividade caso a velocidade seja superior a 5 m/s [33].

O repouso é feito em locais frescos e húmidos, como casas, caves, murados, árvores, solo com vegetação densa, estábulos, canis, grutas, buracos em paredes e chão, ninhos e termiteiras [21]. Devido ao seu tamanho pequeno, eles são relativamente fracos em voos longos e têm um trajeto de no máximo um a dois quilómetros de seu criadouro, podendo variar de espécie para espécie [21, 35].

A aproximação da fonte de alimentação sanguínea é com voo lento e silencioso, e ao pouso, usam o seu aparelho bucal para dilacerar em movimentos rápidos de corte, gerando um pequeno hematoma, onde sugam o sangue. Essa zona é denominada de *pool feeding*, sendo insetos telmofágicos. Essa ação possibilita a inoculação de saliva com particularidade anticoagulante e vasodilatadora, mas não inibe a dor sentida pelo hospedeiro. A alimentação tem a duração de 30 segundos a 5 minutos [23].

A reprodução tem variações, podendo acontecer antes ou depois da alimentação sanguínea [32]. Os flebótomos machos formam um “enxame” próximo ao hospedeiro ou sobre o mesmo, como comportamento para atração das fêmeas para reprodução [33, 34]. A atração é causada pelo odor do hospedeiro, aliado às feromonas e vibrações do som que são produzidos pelos machos [36]. Na cópula, o macho segura a fêmea com seus apêndices genitais, inserindo o esperma no átrio genital da fêmea, o qual será armazenado nas espermatecas.

As fêmeas voam em direção a abrigos frescos e húmidos, com temperaturas entre 15 a 26°C, e tem uma oviposição de 30 a 70 ovos por postura [21].

## 1.4 Os flebótomos e a Leishmaniose em Portugal

### 1.4.1 Leishmaniose

A Leishmaniose humana é conhecida desde 1910 em Portugal, descrita por Dionísio Alvares, numa criança de nove anos, em Lisboa. A zoonose suscitada por *L. infantum*, nos quais os vetores comprovados são *P. perniciosus* e *P. ariasi*, tornou-se uma preocupação obrigatória pela sua elevada incidência ao longo dos anos. A doença tem sido associada a crianças, tendo-se verificado um aumento elevado em adultos, principalmente associados a casos de HIV [35].

No ano de 1911, foi realizado um estudo com 300 cães, em que oito apresentavam sintomas da doença, sendo que, a prevalência da infeção canina não é uniforme. Nas décadas de 80 e 90, foram identificados três focos zoonóticos, ou seja, maior concentração da doença, nas zonas de Trás-os-Montes e Alto Douro, Lisboa e Algarve [35].

Entre 1986 e 2006, o Observatório Nacional das Leishmanioses, registou em níveis regionais a seropositividade da doença entre 4 e 21%. Em 2010 foi emitido um relatório com a atualização da informação sobre a doença (Figura 18).



**Figura 18** – Seroprevalência de Leishmaniose Canina em Portugal, 2010 [37].

### **1.4.2 Controlo da Leishmaniose**

De acordo com a OMS, a prevenção e o controlo da doença, necessita de estratégias para a sua intervenção, visto que a transmissão envolve o hospedeiro reservatório humano e animal, o protozoário e o flebótomo. Deste modo, é preciso um diagnóstico precoce e tratamento imediato, para redução da prevalência da doença, evitando incapacidades, óbito, e também a discriminação feita pelas sequelas. Adicionalmente, devem ser adotadas medidas de monitoramento antes e depois de uma possível infeção, para avaliar os resultados [1].

Alguns estudos apresentam programas de erradicação através da eutanásia em cães seropositivos, porém o procedimento possui uma ineficácia e menor relevância técnica e científica do que outras medidas de controlo da doença. Este facto é justificado pela relação entre a leishmaniose humana e a seroprevalência canina, no qual não reduziria a incidência da doença para o homem, utilizando a eutanásia como solução [6].

No entanto, as medidas caminham entre o diagnóstico e o pronto tratamento em casos de leishmaniose humana, situações de prevenção e proteção individual, como por exemplo, uso de repelentes específicos, inseticidas, redes mosquiteiras e cortinas, como forma de combate ao vetor [38].

### **1.4.3 Estudo dos flebótomos em Portugal**

O estudo dos flebótomos em Portugal teve como início a descoberta das principais espécies presentes no país. As investigações da relação entre flebótomo e parasita, sofreram um impulso com o decorrer dos anos. O percurso da investigação e os seus principais investigadores/autores estão esquematizados na Figura 19.



**Figura 19** – Linha temporal dos trabalhos e investigações de cientistas portugueses sobre os flebótomos [8, 35, 49, 50, 51, 52].

#### 1.4.4 Controlo dos flebótomos

Os trabalhos para o controlo dos flebótomos transmissores estão direcionados à forma adulta, pois o trabalho em localizar os biótopos larvares é mais laborioso [39]. As medidas devem ser trabalhadas em conjunto, como a conscientização e conhecimento do vetor e da doença. As medidas mais utilizadas no controlo dos dípteros são a logística ambiental e química.

Em termos ambientais, a medida consiste em tornar inabitável e se possível, evitar a sobrevivência do vetor. Existem registros de casos extremos, como na antiga União Soviética, onde o controle de *P. papatasi*, foi possível pela destruição do habitat local, além de erradicação das tocas do hospedeiro reservatório roedor. Na Bolívia, adotaram um sistema drástico de desmatamento para redução de *Lutzomyia* sp. Entretanto, medidas com menor impacto ecológico, ocorreram na Índia, em que se cobriram fendas e buracos em paredes de casas e abrigo de animais, com cal e lama, obtendo um controle sobre *P. argentipes*. Para animais peridomésticos, a limpeza, limitação e organização de áreas peridomiciliares, levam à redução do vetor pela dificuldade em obter criadouros para seus estádios larvais [21, 40, 41, 42].

As medidas químicas são mais imediatas, e consistem em pulverizações em residências e nas suas redondezas, além de abrigos de animais, para o controle dos vetores que se alimentam em ambos. A pulverização em áreas florestais para espécies silváticas não é eficaz. O uso de inseticidas químicos tem sido uma medida utilizada em regiões endêmicas, porém não são consistentes, pois ao fim do programa de controle do vetor, os valores iniciais retornam como também a produção de novas gerações mais resistentes, gerando um impacto ecológico. A recomendação é a utilização de piretróides sintéticos, devido ao menor impacto ambiental. No entanto, alguns estudos demonstram que não é solução para todos os insetos, sendo tóxico para abelhas em caso de erros na aplicação [41, 42, 43].

Outra medida que é utilizada e apresenta ótimo resultado, consiste na pulverização da vegetação com uma solução açucarada (da qual os flebótomos se alimentam), com inseticida atuando na erradicação dos adultos. O uso de bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus sphaericus*, quando associadas com formulações químicas, possíveis de serem transportadas pelas fêmeas até os criadouros, podem reduzir as hipóteses de sobrevivência das larvas. Outros exemplos para o controle dos flebótomos incluem: a utilização de fármacos orais em animais domésticos e roedores selvagens, com toxicidade para fêmeas zoofílicas ou para as larvas que se desenvolvem nas suas fezes; utilização de barreiras verticais com inseticidas, para espécies silváticas que estão em zonas periféricas residenciais, além de feromonas sintéticas para atração do vetor a locais tratados com inseticidas [44, 45, 46, 47, 48].

### 1.4.5 Distribuição de flebótomos em Portugal

As principais espécies assinaladas no país até a presente data, estão resumidas na Tabela 3. Os estudos ao longo dos anos relatam a abundância dessas espécies em Portugal (Figura 20).

**Tabela 3** – Visão geral das espécies de flebótomos em Portugal

| Género   | Espécie                                       | Autor          |
|--|---|----------------|
|  | <i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i>       | Tonnoir, 1921  |
| <i>Phlebotomus</i><br>(Rondani & Berté, 1840)  | <i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i>     | Scopoli, 1786  |
|  | <i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i>  | Newstead, 1911 |
|  | <i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> | Parrot, 1917   |
| <i>Sergentomyia</i><br>(França & Parrot, 1920) | <i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i>     | Rondani, 1843  |



**Figura 20** – Abundância relativa das espécies em Portugal, em destaque a espécie com maior abundância [49, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66].

## 1.5 Planejamento

No estudo dos flebótomos, alguns pontos são importantes para monitorização de uma determinada região escolhida. Assim, é necessária, a realização de capturas em diferentes tipos de biótopos e/ou habitats, descrição e caracterização do ambiente, sua localização através das coordenadas geográficas e, também as condições de clima no local.

As amostras recolhidas durante o estudo, devem ser devidamente identificadas e organizadas. Por forma a proceder à caracterização e quantização das amostras, existem alguns parâmetros a ter em conta, dos quais se destacam: a distribuição, abundância relativa, a densidade populacional e suas interações inter-espécies. As variações sazonais do local, a biologia do flebótomo, se estes possuem hábitos de endofagia e/ou exofagia, no quais se destacam as preferências hemáticas, as taxas de infeção por *Leishmania* spp., apontar a época com maiores incidências e por fim, a conscientização da população.

O planeamento e as escolhas das metodologias para a captura dos vetores são feitos anteriormente, pois existem vários métodos que precisam estar de acordo com as condições do local e clima para uma otimização dos resultados, visto a seguir.

### 1.5.1 Métodos de captura dos vetores

O estudo de uma determinada área que possivelmente é endémica requer a necessidade da captura dos flebótomos adultos, sendo o trabalho ativo em locais de repouso. As capturas utilizando um isco humano ou animal, com objetivo de atração dos insetos e o método mais clássico através de armadilhas isoladas em geral [67].

O trabalho ativo dos investigadores em locais de repouso tem a utilização de aspiradores em geral, permitindo a captura de exemplares vivos em uma determinada área, que pode ser delimitada previamente. Esse método é ideal para investigação e captura de fêmeas alimentadas e/ou grávidas [67].

O uso de isco humano ou animal é voltado para análise das espécies que se alimentam desse isco, a frequência, e a avaliação da agressividade. Porém, é um método perigoso, dado o risco de contração da doença, caso seja picado por uma fêmea infetada pelo protozoário, bactéria e/ou vírus [67].

Para as armadilhas entram em destaque, as de interceção e as atrativas. As de interceção são constituídas por papéis adesivos, com superfície banhada em geral com óleo de rícino, tendo uma amostra aleatória das espécies nos locais onde são anexados e são

utilizados para determinação da densidade populacional. No entanto, é ineficaz em locais com umidade muito alta, presença de animais que possam danificar a armadilha e os insetos são danificados ao serem removidos dos papéis. As de atração são do tipo luminosas, geralmente são do tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), podendo ter ou não a adição de uma fonte de dióxido de carbono [68]. Os insetos são atraídos pela luz e a armadilha dispõe de uma ventoinha que age como efeito sugador e alojam os insetos em um compartimento com baixa possibilidade de escape.

A carga de trabalho é reduzida, visto que é montada para o curso noturno no local escolhido, além da vantagem de capturar os exemplares ainda vivos. Caso seja equipada com lâmpadas, o efeito de atração pode chegar até 6 metros, de acordo com a potência luminosa. Para alargar o raio de atração, é feita adição de gelo seco como fonte de dióxido de carbono. Essa técnica atrai mais fêmeas [67].

Devido ao fototropismo e/ou quimiotropismo de alguns insetos, esse método não captura apenas os flebótomos para a investigação, sendo necessário fazer posteriormente uma seleção e separação dos insetos amostrados [67].

### **1.5.2 Métodos de identificação e detecção de *Leishmania* spp. em flebótomos**

Os métodos para a detecção e presença da *Leishmania* spp., baseiam-se na observação ao microscópio dos parasitas e a cultura do parasita. Para a observação ao microscópio, os flebótomos são dissecados, tornando o trabalho mais longo e moroso e tem o inconveniente de muitas vezes ser difícil a distinção dos protozoários flagelados [69].

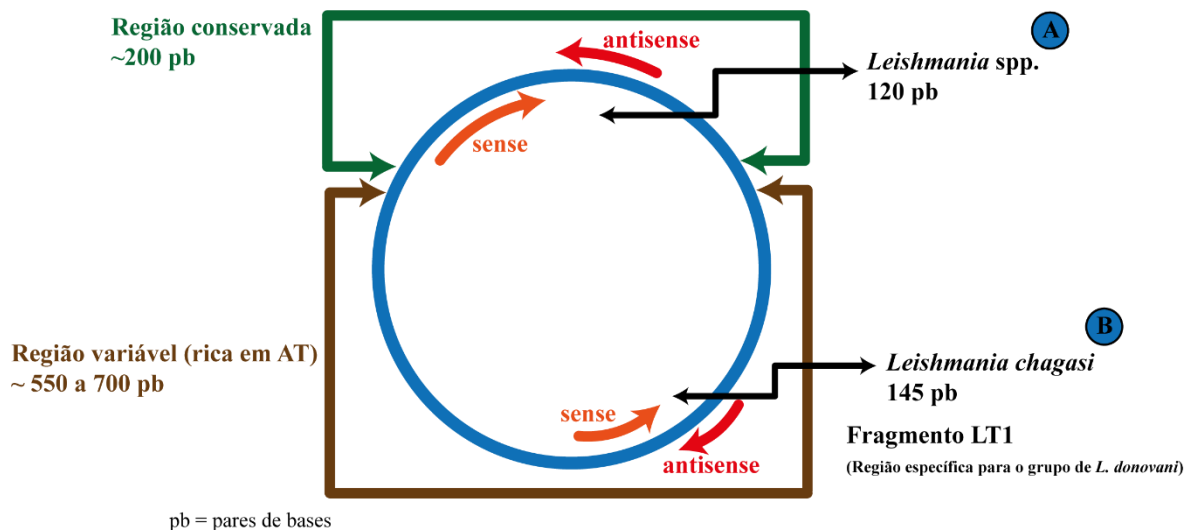
O isolamento em cultura tem uma boa taxa de sucesso nos resultados, podendo, no entanto, ser condicionado pela contaminação por bactérias e/ou fungos. Esse isolamento possibilita a identificação da estirpe por tipagem isoenzimática e/ou molecular, visto que as espécies de *Leishmania* tem uma morfologia indistinguível, como também a obtenção elevada de organismos para inoculações em experiências no desenvolvimento de antígenos. Além disso, possibilita estudos *in vitro*, para atuação e teste de proficiência de fármacos [71].

Nos últimos anos, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), é considerada uma ferramenta excelente para a detecção de várias doenças infecciosas, pois apresenta uma alta taxa de sensibilidade e trabalha com variadas amostras [70]. A PCR faz a amplificação enzimática de sequências de DNA escolhidas e visualizadas por eletroforese em gel. Seguindo da PCR, é realizada a hidrólise do DNA amplificado através do polimorfismo do tamanho dos fragmentos obtidos por hidrólise com enzimas de restrição, denominado RFLP [72].



Os protozoários da ordem Kinetoplastida (gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia* e outros), possuem DNA distintos. Além do DNA nuclear propriamente dito, possuem um organelo ricamente composto de DNA, presente na base flagelar do protozoário. O cinetoplasto situado na base do flagelo, tem na sua composição uma cadeia de moléculas circulares, o kDNA, dividindo-se em dois grupos [85]. Para o primeiro grupo, o composto de moléculas é maior, com aproximadamente entre 20 e 35kb, denominam-se maxicírculos. São homogêneos compõe os diferentes grupos da ordem Kinetoplastida e possuem aproximadamente entre 20 e 50 cópias por cinetoplasto [85]. O segundo grupo tem uma composição de moléculas menor, com aproximadamente entre 0,5 e 1,5kb e denominam-se minicírculos. São heterogêneos entre os grupos e possuem uma grande quantidade de cópias (10.000 unidades por cinetoplasto). Essa divisão é utilizada para separar classes, gêneros e/ou espécies [85].

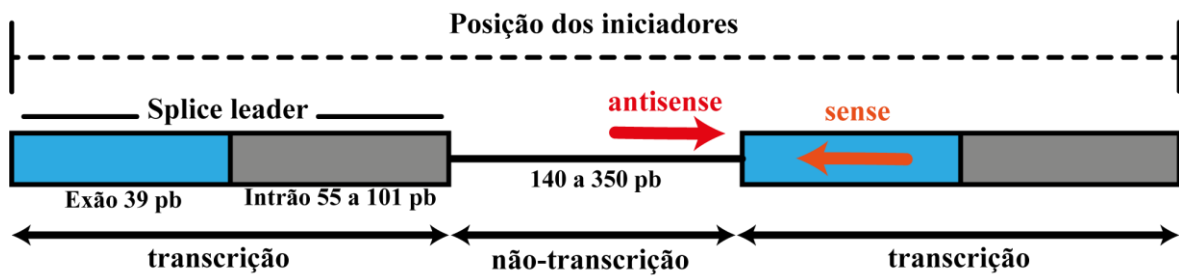
O minicírculo (Figura 21) é composto por uma molécula de DNA circular entre 0,75 a 1kb de comprimento. Possuem uma região conservada que tem aproximadamente 200pb e três blocos de sequências conservadas para todas as espécies de *Leishmania*. Com aproximadamente entre 550 e 700pb, possuem sequências variáveis e um grande número de nucleotídeos A e T, sendo assim, possível encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania* [85].



**Figura 21** – Esquema da organização do minicírculo de *Leishmania* spp.; Posição dos primers para *Leishmania* spp.(A) e *L. donovani* (B). Adaptado de [85].

A região LT1 ou fragmento com 145pb é específica para o grupo de *L. donovani*, sendo possível a identificação das espécies *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. archibaldi*. Alguns estudos apresentaram a aplicabilidade desses *primers* na PCR, os quais têm uma excelente sensibilidade e especificidade para diagnosticar a presença de *L. infantum* em amostras biológicas de cães com suspeita de leishmaniose. Em amostras discordantes, a determinação de *Leishmania* spp. é realizada por um par de *primers* que amplificam um fragmento de 120pb situado na região conservada [85].

O RNA mini-exão (Figura 22) é utilizado para identificar o genótipo das espécies de *Leishmania*. Cada genoma (SL ou *spliced leader*) apresenta aproximadamente 100 a 200 cópias e é composto por uma região de transcrição conservada (exão), possuindo uma sequência de 39pb, e uma região de transcrição conservada, porém variável (intrão), possuindo uma sequência de 55 a 101pb, de acordo com a espécie. Nos intervalos entre cada SL existem regiões de não-transcrição, tendo uma diferença na sequência de nucleotídeos e no tamanho, com 140 a 350pb, no qual estão inseridos o complexo de *L. donovani* [85].



**Figura 22** – Esquema do RNA mini-exão ou *spliced leader*/SL de *Leishmania* e posição dos *primers* para identificação. Adaptado de [85].

Na PCR, a detecção da região variável específica é efetuada com diferentes pares de *primers* (Tabela 4).

**Tabela 4** – Diferentes pares de *primers* utilizados para detecção do DNA das espécies de *Leishmania*. Adaptado de [86].

| <i>Primers</i> | Ampliação | Tamanho | Espécies  | Sequências dos <i>primers</i>                               |
|----------------|-----------|---------|---|---|
| RV1/RV2        | LT1 kDNA  | 145pb   | Complexo<br><i>L. donovani</i>                                | 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3'<br>5'-CCACCTGGCTATTTTACACCA-3' |
| LITSR/L5.8S    | ITS1 rDNA | 320pb   | <i>L. infantum</i><br><i>L. chagasi</i><br><i>L. donovani</i> | 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'<br>5'-CTGGATCATTT-TCCGATG-3'     |
| LITSV/L5.8SR   | ITS2 rDNA | 700pb   | <i>L. infantum</i><br><i>L. chagasi</i><br><i>L. donovani</i> | 5'-AAGTGCG-ATAAGTGGTA-3'<br>5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'        |
| LITSR/LITSV    | ITS rDNA  | 1020pb  | <i>L. infantum</i><br><i>L. chagasi</i><br><i>L. donovani</i> | 5' - CTGGATCATTT-TCCGATG-3'<br>5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC- 3'    |
| MC1            | kDNA      | 400pb   | <i>L. infantum</i>  | 5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'                                  |
| MC2            | kDNA      | 400pb   | <i>L. infantum</i>  | 5' CACCCATTTTCCGATTTG 3'                                    |

## 1.6 Objetivos

### Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a nível ecológico e taxonómico a fauna flebotomínica existente na freguesia de Cernache, situada no Distrito de Coimbra, contribuindo para o conhecimento sobre a Leishmaniose em Portugal.

### Objetivos específicos

- a. Caracterizar e quantificar a fauna flebotomínica na freguesia de Cernache, usando uma chave dicotómica estabelecida.
- b. Detetar se flebótomos fêmeas contém o protozoário *Leishmania* spp., utilizando técnicas moleculares, quais as espécies presentes no caso de dar positivo e qual a sua prevalência.



## 2 Materiais e métodos

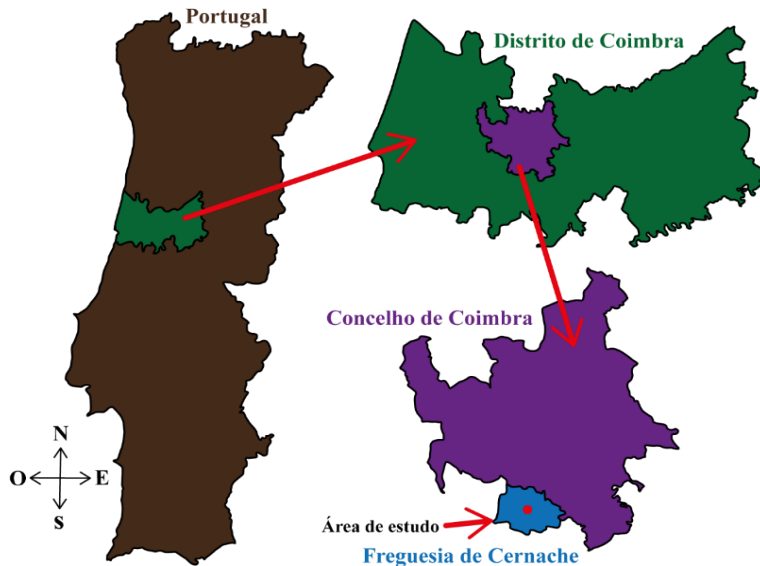
### 2.1 Obtenção de dados

O trabalho foi realizado e fornecido em primeira instância, com dados já preparados, nos anos de 2017 e 2018, sendo em etapas: montagem das armadilhas, fichas de campo, preparação laboratorial, identificação ao nível taxonómico, preparação das espermatecas, organização das amostras e dados tabelados pelo Prof. Doutor Sérgio Sousa e sua equipa. As etapas realizadas foram reproduzidas nesse capítulo, sem nenhuma alteração.

Com a parceria entre a Universidade de Coimbra e a Escola Veterinária Vasco da Gama, nos anos de 2019 a 2021, foi efetuado um estudo mais aprofundado da morfologia dos flebótomos, a análise dos biótopos amostrados e das variáveis e utilização de métodos moleculares para verificar se as fêmeas de flebótomos amostrados eram portadoras do causador da Leishmaniose (*Leishmania* spp.).

### 2.2 Área de estudo

O Distrito de Coimbra situa-se na região centro (das Beiras, Norte da Estremadura e Norte do Ribatejo) de Portugal, pertencente à província histórica da Beira Litoral. Tem uma área de 4.336 km<sup>2</sup>, é considerado o décimo segundo maior distrito português e tem como coordenada geral: 40.169° N, - 8.386° O (Figura 23) [73].



**Figura 23** – Mapa de Portugal e referência da área de estudo: Cernache

O território referido é dividido em 19 Concelhos, em que o Concelho de Coimbra apresenta uma divisão em 18 freguesias, conforme as Tabelas 4 e 5. Os estudos foram realizados na freguesia de Cernache, com uma localização central a 40.137° N, -8.468° O.

**Tabela 5** – Concelhos de Distrito de Coimbra, superfície e densidade populacional [73]

| Concelhos*           | Área<br>(Km <sup>2</sup> ) <sup>1</sup> | Densidade populacional (nº<br>habitantes/Km <sup>2</sup> ) <sup>1</sup> |
|----------------------|---|---|
| Arganil              | 333                                     | 34  |
| Cantanhede           | 391                                     | 90  |
| Coimbra              | 319                                     | 420   |
| Condeixa-a-Nova      | 139                                     | 128   |
| Figueira da Foz      | 379                                     | 156   |
| Góis                 | 263                                     | 15  |
| Lousã                | 138                                     | 124   |
| Mealhada             | 111                                     | 180   |
| Mira                 | 124                                     | 96  |
| Miranda do Corvo     | 126                                     | 101   |
| Montemor-o-Velho     | 229                                     | 111   |
| Mortágua             | 251                                     | 36  |
| Oliveira do Hospital | 235                                     | 83  |
| Pampilhosa da Serra  | 396                                     | 11  |
| Penacova             | 217                                     | 64  |
| Penela               | 135                                     | 41  |
| Source               | 265                                     | 65  |
| Tábua                | 200                                     | 57  |
| Vila Nova de Poiares | 84                                      | 83  |

\*Censos de 2019

<sup>1</sup> Decimais arredondados para melhor leitura.

**Tabela 6** – Freguesias do Concelho de Coimbra, superfície e densidade populacional [73].

| Freguesias de Coimbra*                         | Área<br>(Km <sup>2</sup> ) <sup>1</sup> | Densidade<br>populacional (nº<br>habitantes/Km <sup>2</sup> ) <sup>1</sup> |
|--|---|--|
| Almalaguês                                     | 24                                      | 133  |
| Antuzede e Vil de Matos                        | 18                                      | 179  |
| Assafarge e Antanhol                           | 20                                      | 272  |
| Brasfemes                                      | 10                                      | 215  |
| Ceira  | 13                                      | 298  |
| Cernache                                       | 20                                      | 212  |
| Eiras e São Paulo de Frades                    | 25                                      | 724  |
| Santa Clara e Castelo Viegas                   | 18                                      | 660  |
| Santo António dos Olivais                      | 20                                      | 2021   |
| São João do Campo                              | 8                                       | 262  |
| São Martinho de Árvore e Lamarosa              | 21                                      | 149  |
| São Martinho do Bispo e Ribeira de Frades      | 25                                      | 651  |
| São Silvestre                                  | 11                                      | 305  |
| Sé Nova, Santa Cruz, Almedina e São Bartolomeu | 9                                       | 1678   |
| Souselas e Botão                               | 33                                      | 142  |
| Taveiro, Ameal e Arzila                        | 25                                      | 176  |
| Torres do Mondego                              | 17                                      | 145  |
| Trouxemil e Torre de Vilela                    | 11                                      | 375  |

\*Censos de 2011

<sup>1</sup> Decimais arredondados para melhor leitura.

### **2.2.1 Geomorfologia, Geologia e Hidrografia**

Segundo o Sistema Nacional de Informação Geográfica de Portugal, a geomorfologia do Distrito de Coimbra tem uma altitude máxima de 1.418 metros na Pampilhosa da Serra e Arganil e a altitude mínima ao nível do mar na Figueira da Foz.

O Concelho de Coimbra possui uma altitude máxima de 500 metros, sendo cortado por vales, nos quais os rios Mondego, Ceira e Corvo desaguam. O solo é característico com áreas deprimidas marginais e rebordo montanhoso do Maciço Hespérico. De um modo geral, nos solos encontram-se arenitos, conglomerados, margas, calcário dolomíticos e margosos, além de intercalações de seixos e cascalheiras [74].

Em termos geológicos, o Concelho de Coimbra, apresenta dois grandes grupos: Formações do Pré-Câmbrico e do Paleozóico, constituídas por xistos e granitos hercínicos, e Formações da Orla Meso-Cenozoica Ocidental, constituídas pela Bacia Lusitânica [74].

A Freguesia de Cernache está localizada no sudoeste do Concelho de Coimbra, a aproximadamente 11 km do centro da cidade de Coimbra. Possui várias nascentes que escoam para o Rio Mondego, sendo a principal a Fonte do Rifano, onde tem origem a Ribeira de Cernache [75].

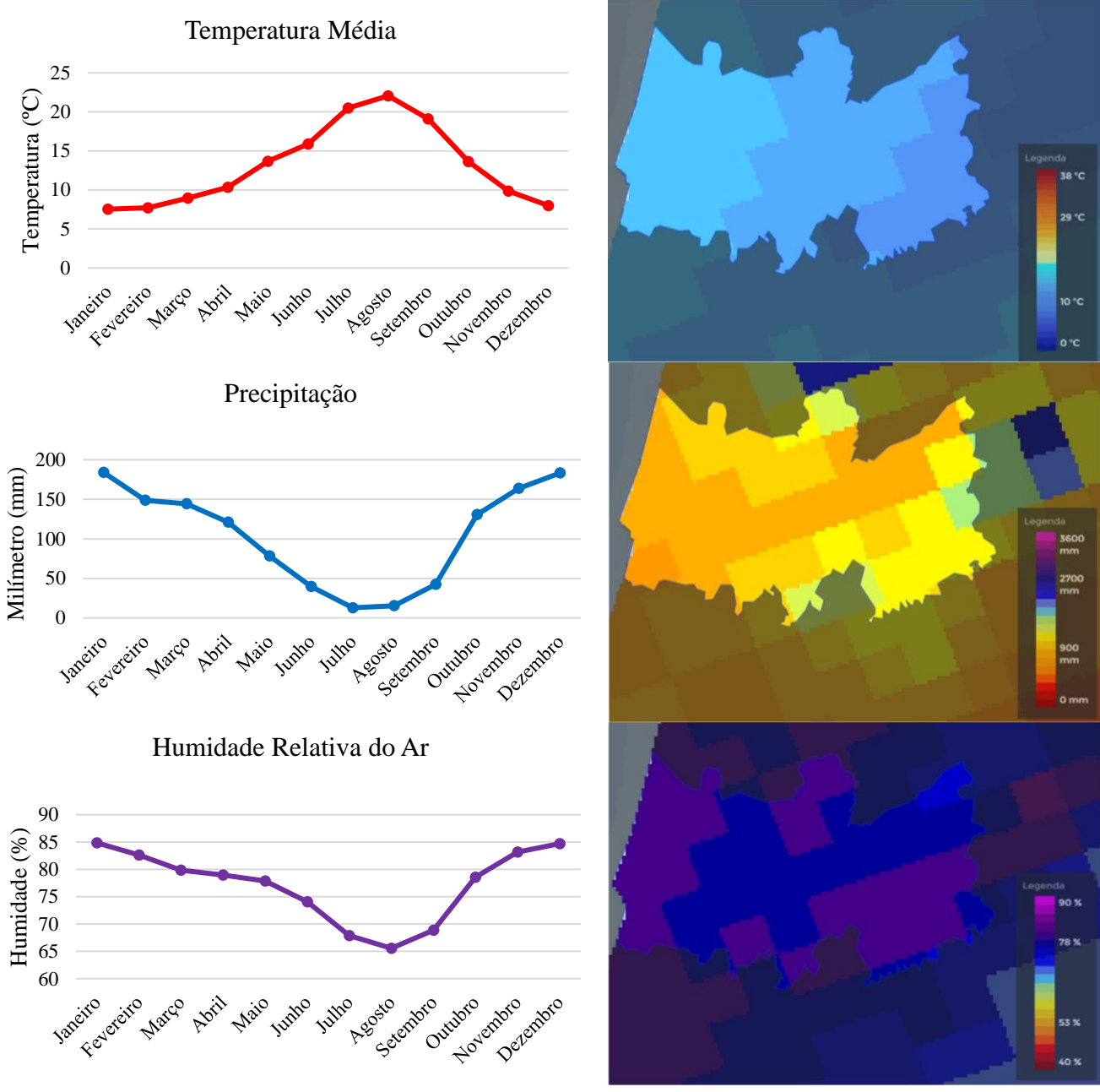
### **2.2.2 Clima**

Os dados climatológicos apresentados são embasados nos parâmetros normais entre 1971 e 2000, através do Portal do Clima – Alterações Climáticas em Portugal (Figura 24).

A temperatura média anual registada no Distrito de Coimbra é de 13,1°C, com amplitudes entre 7,5°C em janeiro e 22°C em agosto. Os meses mais quentes ocorrem entre julho e agosto e o arrefecimento em setembro. O índice médio pluviométrico anual é de 105,3 mm, com maiores precipitações em janeiro (183,8 mm) e menores precipitações em julho (12,8mm). A humidade relativa do ar, tem uma média anual de 77%, com máxima em janeiro de 84,8% e a mínima de 65,5%. A intensidade do vento tem uma velocidade média de 2,5 m/s, com maior força nos meses de maio com 2,6 m/s a julho com 2,7 m/s.

A classificação climática tem por base as classes definidas por Köppen, no qual o Distrito de Coimbra apresenta um clima temperado com verão seco e quente e o inverno chuvoso e frio.





**Figura 24** – Dados climatológicos, histórico simulado entre 1971 e 2000. Estatística Média de 30 anos. Modelo Global e Regional: Ensemble [76].

### 2.2.3 Flora e Fauna

A flora do Concelho de Coimbra tem uma divisão característica entre florestas com uma distribuição de 233,07 mil hectares, matos e pastagens com 77,85 mil hectares e áreas agrícolas com 80,78 mil hectares. Sua composição arbórea específica nessa zona é o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), sobreiro (*Quercus suber*), azinheira (*Quercus ilex*), carvalhos (*Quercus* sp.), pinheiro-manso (*Pinus pinea*), castanheiro (*Castanea sativa*), alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) e acácia (*Acacia penninervis*). Existe também a presença de fungos, líquenes, musgos e hepáticas em geral [77].

Da biodiversidade faunística no Concelho destacam-se a presença de anfíbios, como por exemplo o Relá-meridional (*Hyla meridionalis*), répteis como o Lagarto-de-água (*Lacerta schreiberi*), aves em geral como a Garça-real (*Ardea cinerea*), Pombo-das-rochas (*Columba livia*), Rola-turca (*Streptopelia decaocto*) e Coruja-das-torres (*Tyto alba*). Dos mamíferos presentes destacam-se o Ouriço-cacheiro (*Erinaceus europaeus*), a Toupeira (*Talpa accidentalis*), Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*), Raposa (*Vulpes vulpes*) e Javali (*Sus scrofa*) [78], dentre outros, o gato (*Felis catus*) e cão (*Canis lupus familiaris*) como domésticos.

## 2.3 Captura de Flebótomos: amostragem e armadilhas

### 2.3.1 Etapas de captura

O estudo foi desenvolvido em dois períodos anuais: a primeira fase ocorreu no ano de 2017 e a segunda fase no ano de 2018 (Tabela 7).

**Tabela 7** – Etapas de captura, localização e período de amostragem

| <b>Etapas de Captura</b> | <b>Localização</b>    | <b>Período</b>                       |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1ª Fase                  | Freguesia de Cernache | 16 de junho a 13 de novembro de 2017 |
| 2ª Fase                  | Freguesia de Cernache | 23 de junho a 27 de julho de 2018    |

### 2.3.2 Armadilha

A armadilha utilizada foi do tipo CDC e tem em sua composição, uma base circular protetora e uma estrutura metálica por baixo, no qual está anexado o sistema luminoso e elétrico, com bateria recarregável. As baterias foram carregadas diariamente para uma potência eficaz da luz e da ventoinha. Esta está inserida abaixo da fonte de luz, com hélices que aspiram para uma gaiola protegida por uma rede de nylon, com 12cm de comprimento de aresta e fixada por fios elásticos em ambos lados a um recipiente cilíndrico de coloração branca. O recipiente tem sua base perfurada, onde está inserido uma rede quadriculada metálica com 0,5 mm de espaçamento, que impede a passagem dos insetos durante a amostragem (Figura 25).



**Figura 25** – Exemplo montado da armadilha luminosa do tipo CDC (B), anexada com um termômetro e medidor de humidade (A) para medição na altura da amostragem (Foto de Felipe Melo Machado, 2020).

A preparação das armadilhas foi feita antecipadamente, com higienização com etanol a 90% e foram colocadas em pontos a um máximo de 1,5 m do solo. A montagem das armadilhas teve predominância crepuscular ao longo dos meses, visto que, o horário de verão e o pôr do sol influenciam nas escolhas do melhor horário, sendo estas, entre 18 e 20 horas da tarde/noite na montagem e entre 06 e 08 horas da manhã na recolha.

Com a amostragem finalizada, a armadilha foi fechada com os dois fios de nylon, evitando a fuga dos insetos capturados, e o sistema elétrico foi desligado. Em alguns casos ocorreram fugas de insetos que estavam mais próximos da ventoinha. Após esse procedimento, o recipiente foi tratado e anexado em caixas guardadas no congelador.

Todos os insetos, flebótomos e outros artrópodes foram mortos pelo frio (-10°C), durante 2 e 6 minutos no máximo. Estes foram, logo de seguida, manuseados e transferidos para tubos de plástico com etanol a 90% para conservação, devidamente etiquetados e mantidos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), para o trabalho laboratorial posterior.

## **2.4 Métodos de amostragem e ficha de campo**

Para obtenção das amostras representativas das espécies flebotomínicas na freguesia de Cernache, os pontos de recolha foram selecionados por proximidade de animais domésticos e de criação, sendo constituídos por canis, galinheiros, gaiolas, celeiros, currais e etc. Os pontos foram escolhidos de modo a manter uma distância residencial próxima, que permitia as amostragens diárias.

Os pontos de colheita escolhidos foram anotados e identificados numa ficha de campo (Anexo 1), com os seguintes elementos:

- a. Número da armadilha.
- b. Número do biótopo, localização geográfica (coordenadas, latitude, longitude e altitude).
- c. Tipo de formação superficial do biótopo (calcário, arenoso, argiloso, terroso e/ou outros).
- d. Características fitogeográficas (árvores, agricultura, plantações próximas).
- e. Local da captura com detalhes (capturas no interior ou exterior de casas, abrigos de animais, jardins e/ou outros).
- f. Possível presença de animais, a tipologia e observações de animais selvagens próximos.
- g. Em caso de animais domésticos (cães e gatos) presentes, se estavam a utilizar coleiras inseticidas.
- h. Aspetos climáticos (temperatura e humidade relativa na hora da montagem e recolha das armadilhas / incidência do vento e precipitação).
- i. Aspetos temporais (hora de montagem e recolha das armadilhas e duração da captura).

### 2.4.1 Biótopos

As zonas de capturas para a montagem das armadilhas dividem-se em três classificações de biótopos: domésticos, peridomésticos e silváticos.

Os biótopos domésticos (Figura 26) são zonas habitacionais ocupadas pelo homem, quintais, garagens e/ou anexos da casas e jardins. A presença de animais de companhia, como o cão e o gato, estão incluídos nessa classificação.

Os biótopos peridomésticos são zonas próximas de habitações e que apresentam o manejo e albergue de animais de criação, depósitos e armazéns, áreas destinadas a horticultura e/ou cerealicultura e conjuntos arbóreos periféricos.

Quanto aos biótopos silváticos (Figura 27), estes são classificados como zonas isoladas e/ou afastadas de habitações, podendo incluir o manejo de animais de criação e formação florestal com mata aberta ou fechada.



**Figura 26** – Pontos de amostragem em Cernache no ano de 2017; classificação dos biótopos. 1 – Conjunto arbóreo, 2 – Jardim, 3 – Conjunto arbóreo, 4 – Quintal, 5 – Horticultura [Google Earth © 2021].



**Figura 27** – Pontos de amostragem em Cernache no ano de 2018; classificação dos biótopos. 7 – Depósito de lenha, 8 – Galinheiro, 9 – Canil, 10 – Toca de Coelho, 11 – Armazém, 12 – Pocilga [Google Earth ® 2021].

#### 2.4.2 Preparação e identificação dos flebótomos

Os tubos de plástico com etanol a 90% foram devidamente organizados de acordo com a numeração da armadilha, para a fase de separação dos flebótomos e outros artrópodes amostrados. Esse trabalho foi efetuado com o auxílio de um microscópio estereoscópico, com uma ampliação de 12 x. Os insetos presentes em cada tubo foram transferidos para placas de Petri, para triagem e separação dos outros artrópodes. Os flebótomos macho e fêmea foram colocados em novos tubos de plástico, mantendo o álcool a 90% e identificando o número de exemplares nas etiquetas, além do número da armadilha e o dia da colheita.

## 2.5 Identificação taxonómica

Os flebotomos identificados previamente, foram utilizados para uma nova separação e identificação dos machos e fêmeas, através de uma chave dicotómica. Esta foi adaptada com foco para as espécies assinaladas em Portugal, como também em Espanha e Marrocos, dividida por duas classificações, sendo uma chave para os machos e uma para as fêmeas.

A separação e identificação dos machos foi baseada na morfologia da genitália. Os exemplares de cada tubo de plástico/número da armadilha, foram transferidos para uma placa de Petri, com etanol a 90%, com o auxílio de uma pipeta de plástico cuidadosamente para preservar a composição corporal do flebotomo. A placa de Petri foi colocada no microscópio e os machos foram identificados e logo separados em tubos etiquetados, com etanol a 90%. As fêmeas foram recolocadas nos tubos originais.

Os machos foram anotados nas fichas de campo para quantificação e identificação da espécie encontrada.

As fêmeas foram identificadas com base na morfologia da genitália. Os exemplares de cada tubo de plástico/número da armadilha original, foram transferidos para uma placa de Petri, com etanol a 90%, com uma pipeta de plástico. Com uma pinça entomológica, colocou-se a fêmea, em posição lateral e com o auxílio de agulhas de dissecação, no microscópio, realizou-se um corte transversal nos últimos segmentos abdominais para extração e análise da espermateca.

As fêmeas foram registadas nas fichas de campo, em caso de alimentação (sangue visível no abdómen) e grávidas (ovos visíveis no abdómen).

### **2.5.1 Chave dicotômica**

Para a identificação das espécies, foram efetuadas duas chaves dicotômicas, uma para os machos e outra para as fêmeas, devido às diferenças morfológicas. A chave dicotômica foi adaptada a partir dos trabalhos realizados pelos seguintes autores: Benabdenni *et al.*, 1999; Chamkhy *et al.*, Léger *et al.*, 1983; Lewis, 1982; Depaquit *et al.*, 1998b; Ghrab *et al.*, 2005; Kakarsulemankhel, 2009; Pires, 1979 e 2000.

## **2.6 Análise Estatística**

Para as análises dos dados foi utilizado o *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 26. A distribuição das populações de cada espécie foi obtida a partir do cálculo das frequências relativas, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. A correlação de *Spearman* foi utilizada a fim de explorar a relação individual de cada descritor com a distribuição das populações de cada espécie. Foram ainda construídos modelos preditivos a partir da Análise de Regressão Linear adotando o método *Backward*, onde foi adotado como critério de inclusão a probabilidade de 0,05 a 0,10. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%.

## **2.7 Análise Molecular**

### **2.7.1 Preparação dos flebótomos fêmeas**

Foram escolhidas aleatoriamente 16 flebótomos fêmeas que possuíam condição de alimentadas para detecção da presença de *Leishmania* spp. Cada amostra foi identificada de acordo com a ficha de campo/armadilha.



### 2.7.2 Extração de DNA dos flebótomos fêmeas

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo DNeasy® Blood & Tissue Handbook de acordo com as instruções do fornecedor, adaptado para *Leishmania* spp. Os flebótomos fêmea, sem a genitália, foram colocados em água esterilizada, com agitação permanente, durante 24 horas para retirar o etanol em que estavam conservados. A água foi mudada várias vezes. Foram depois transferidos para tubos de 1.5 mL, a que foram adicionados 180 µL de tampão ATL (tampão de lise) e macerados com o auxílio de um pistão. Depois de adicionar 20 µL de proteinase K, levou-se ao vórtex e incubou-se a 56°C durante 24h com rotações de 750 RPM. Depois foram adicionados 200 µL de tampão AL (tampão de ligação), e levou-se ao vórtex por 5 a 10 segundos. Adicionaram-se, de seguida, dos 200 µL de etanol 100%, misturou-se no vórtex e a mistura total foi transferida para uma coluna (*DNeasy Mini spin column*), colocada num tubo coletor de 2 mL e centrifugada por 1 min a 8000 RPM; o tubo coletor foi descartado junto com a solução restante e a coluna foi colocada num novo tubo de 2mL ao qual se adicionaram 500 µL de tampão AW1; centrifugou-se novamente durante 1 min a 8000 RPM; o tubo coletor foi descartado novamente e a coluna foi colocada num novo tubo de 2 mL onde foram adicionados 500 µL de tampão AW2 e foi novamente centrifugado durante 3 minutos a 14000 RPM; o tubo coletor foi reutilizado e centrifugou-se novamente durante 1 min. a 14000 RPM; a coluna foi colocada em tubos Eppendorf de 1,5 mL e pipetaram-se 100 µL de tampão AE diretamente sobre a membrana DNeasy. Por fim incubou-se à temperatura ambiente durante 1 min e centrifugou-se durante 1 min a 8000 RPM. A quantidade de DNA contida em cada tubo foi medida num espectrofotómetro (NanoDrop) e registada.

### 2.7.3 Detecção de DNA

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a deteção de DNA de *Leishmania* para os exemplares fêmeas de *P. perniciosus* e *P. ariasi*, os quais são vetores comprovados para a *L. infantum*, com as sequências oligonucleotídicas iniciadoras, denominadas “*primers*” MC1, MC2 e “*primers*” ITS1 (L5.8S e LITRS), seguida de RFLP com a enzima de restrição HaeIII.

Para os ensaios de PCR realizados, foi adicionado um controlo positivo de DNA de *L. infantum* extraído da medula óssea de um cão com Leishmaniose e um controlo negativo sem DNA, contendo apenas H<sub>2</sub>O ultrapura.

Os produtos de amplificação dos ensaios foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (1%) com 50 mL de Buffer TBE a que foram adicionados 2 µL de GreenSafe, o controlo positivo e negativo além do marcador HyperLadder™ IV. Aplicou-se uma corrente elétrica de 100V durante 40 minutos.

A visualização dos produtos amplificados no gel foi feita através de iluminação ultravioleta e foram fotografados pelo sistema UVITEC.

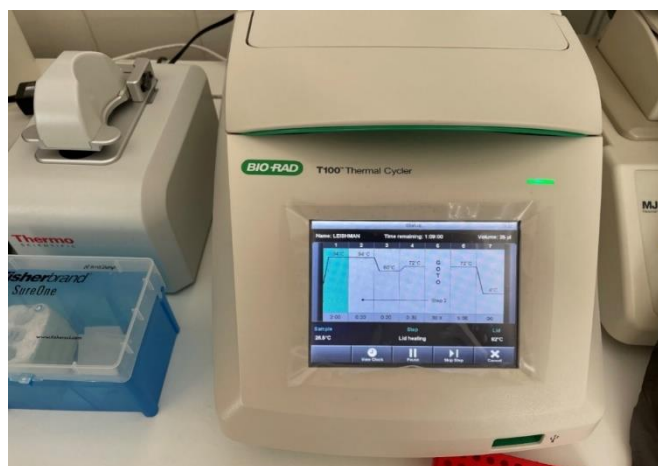
#### 2.7.4 Amplificação do kDNA com sequências iniciadoras MC

Para a amplificação do DNA cinetoplastideal (kDNA), foi preparado o mix de reação de acordo com o número de fêmeas.

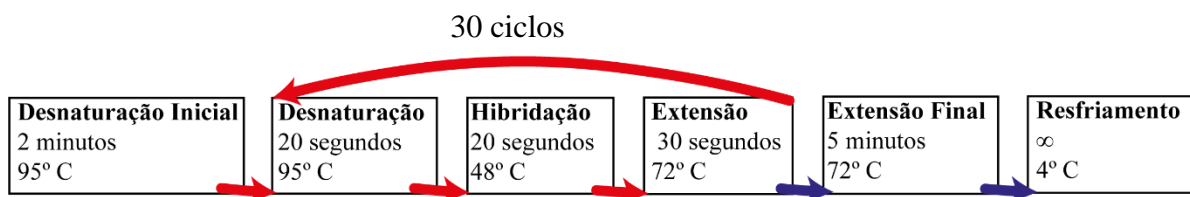
Cada tubo continha um volume total de 25 µl, sendo 10 µL da amostra de DNA de 9 fêmeas, Buffer 1X (2,5 µL), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (0,75 µL), 0,2 mM dNTPs (1 µL), 10 µM de cada “*primer*” MC1 e MC2 (1,25 µL cada), 1 U de Taq polimerase (0,2 µL) e H<sub>2</sub>O ultrapura para perfazer o total de 15 µL.

Numa segunda análise, foram utilizadas as 7 fêmeas restantes e foi utilizado o Red Dye Master Mix (12,5 µL) e os “*primers*” MC1 (1,25 µL) e MC2 (1,25 µL), 10 µL de DNA das fêmeas, perfazendo os 25 µl.

O protocolo de amplificação, foi realizado no termociclador Biorad®T100™ Thermal Cycler (figura 28) com as condições indicadas na figura 29.



**Figura 28** – Termociclador Biorad®T100™ Thermal Cycler utilizado para a amplificação do DNA.



**Figura 29** – Condições de amplificação do kDNA com os “primers” MC1 e MC2.

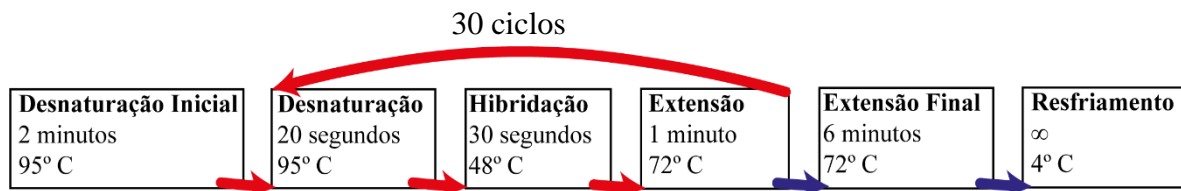
### 2.7.5 Amplificação do rDNA com sequências iniciadoras ITS1

Para a amplificação do DNA recombinante (rDNA) o mix de reação foi preparado de acordo com o número de fêmeas.

Cada tubo continha um volume total de 25 µl, sendo 10 µL da amostra de DNA das 9 fêmeas, Buffer 1X (2,5 µL), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (0,75 µL), 0,2 mM dNTPs (1 µL), 0,5 mM de cada “*primer*” L5.8S e LITRS (1,25 µL cada, respectivamente), 1 U de Taq polimerase (0,2 µL) além de H<sub>2</sub>O ultrapura para perfazer o total de 15 µL.

Na segunda análise, para as restantes 7 fêmeas foi novamente utilizada a Red Dye Master Mix (12,5 µL) e os “primers” L5.8S (1,25 µL), LITRS (1,25 µL), 10 µL de DNA, perfazendo 25 µl.

O protocolo de amplificação, foi realizado no termociclador Biorad®T100™ Thermal Cycler (Figura 28) com as seguintes condições indicado na figura 30.



**Figura 30** – Condições de amplificação do rDNA com os “primers” IST1 (LITSR e L5.8S)

### 2.7.6 Restrição de DNA-RFLP e Polimorfismo

Após a realização da amplificação com as sequências iniciadoras ITS1, o produto foi sujeito a digestão com a enzima *HaeIII*, num volume total de 20 µL: 15 µL do DNA amplificado por PCR, 2 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 1 µL de enzima *HaeIII* e 2 µL de tampão de hidrólise para a enzima (10X). A incubação foi realizada entre 3 e 4 horas, numa temperatura de 37° C, com 500 RPM. Os controlos positivo e negativo também foram adicionados. Em seguida, fez-se uma eletroforese em gel de agarose, tal como foi referido acima.

Os fragmentos esperados e sua dimensão são distintos para as três espécies de *Leishmania* que estão presentes na região mediterrânica e que permitem a sua distinção. A *L. infantum* possui três fragmentos (184 pb, 72 pb e 55 pb), a *L. tropica* possui quatro (185 pb, 57 pb, 53 pb e 24 pb) e a *L. major* tem apenas dois fragmentos (203 pb e 132 pb).

### 3 Resultados e Discussão

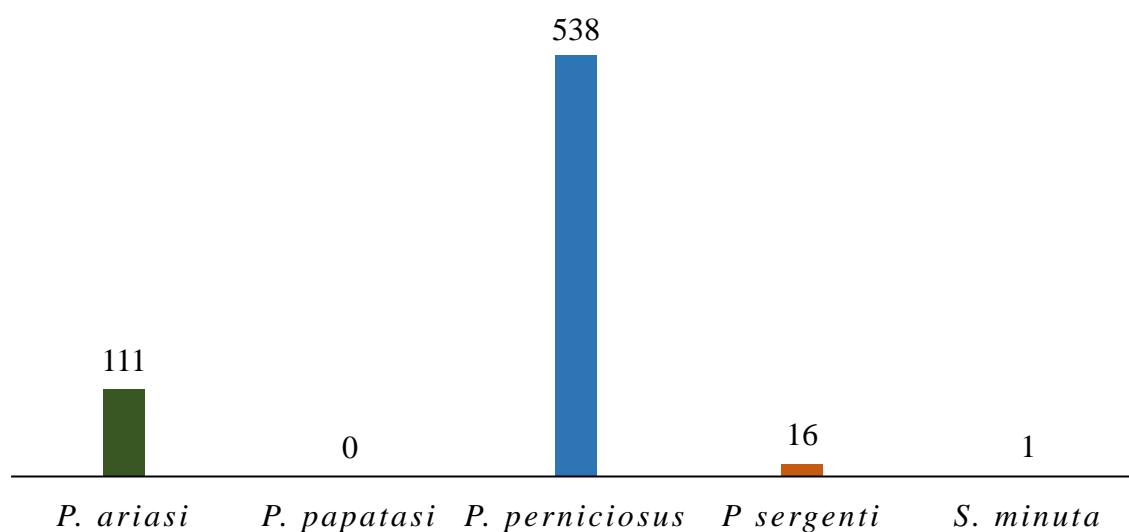
Os dados foram obtidos pelo Prof. Doutor Sérgio Sousa e sua equipa. Os dados de 2017, estão mencionados neste capítulo em seus parâmetros gerais. Entretanto, os resultados e discussão desse ano não serão utilizados para uma análise estatística geral e comparativa com 2018, devido ao número insuficiente de informação. Deste modo, a análise dos resultados de 2018 e respetiva discussão encontram-se no capítulo 3.2.

#### 3.1 Dados gerais dos flebotomos

##### 3.1.1 Diversidade de Espécies

As espécies capturadas foram identificadas através da sua taxonomia, com um total de 666 flebotomos capturados (Figura 31), sendo as principais espécies sinalizadas em Portugal as seguintes:

- a. *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* Tonnoir, 1921
- b. *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* Scopoli, 1786
- c. *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead, 1911
- d. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917
- e. *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843



**Figura 31** – Diversidade total de espécies flebotomínicas capturadas na Freguesia de Cernache, Distrito de Coimbra, Portugal nos anos de 2017 e 2018.

*Phlebotomus perniciosus* foi mais abundante, com um total de 538 flebótomos capturados, seguido de *P. ariasi* com 111 e *P. sergenti* com 16 espécimes. *Sergentomyia minuta* esteve presente em apenas uma amostra. A espécie *P. papatasi* não foi registada neste estudo.

### 3.1.2 Abundância relativa das espécies

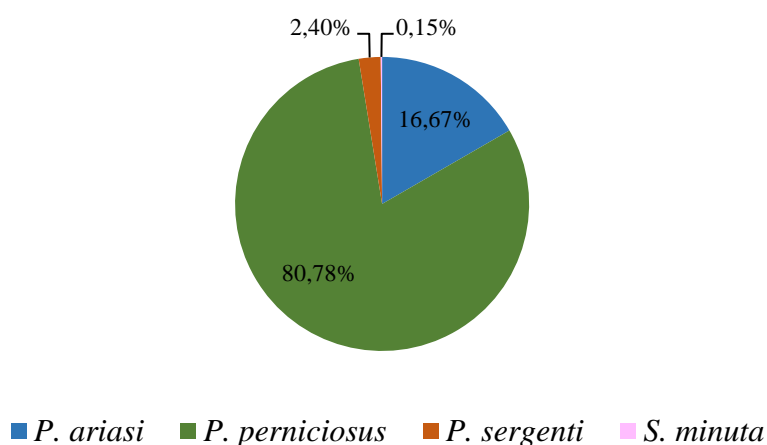
No ano de 2017, foram capturados 26 flebótomos machos de *P. ariasi* e *P. perniciosus* não tendo sido capturada nenhuma fêmea. Em 2018, *P. sergenti* marcou presença com 11 machos. Além disso, 36 fêmeas de *P. ariasi* foram capturadas, sendo 5 alimentadas, contendo sangue no abdómen e 16 tinham ovos e/ou grávidas, para *P. perniciosus*, foram capturadas 130 fêmeas, 27 das quais estavam alimentadas e 47 continham ovos e/ou grávidas (Tabela 9).

Os indivíduos de *P. sergenti* totalizaram 11 machos e 5 fêmeas, estando 3 alimentadas e uma com ovos e/ou grávida. Em 2018, foi capturado apenas um exemplar de *S. minuta* fêmea com ovos e/ou grávida (Tabela 8).

**Tabela 8** – Espécies e número de flebótomos machos, fêmeas, fêmeas alimentadas e fêmeas com ovos e/ou grávidas amostrados na Freguesia de Cernache em 2017 e 2018.

| Ano                             | 2017             |                       |                    |                  | 2018             |                       |                    |                  |
|---------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
|                                 | <i>P. ariasi</i> | <i>P. perniciosus</i> | <i>P. sergente</i> | <i>S. minuta</i> | <i>P. ariasi</i> | <i>P. perniciosus</i> | <i>P. sergenti</i> | <i>S. minuta</i> |
| <b>Macho</b>                    | 4                | 22                    | 0                  | 0                | 71               | 386                   | 11                 | 0                |
| <b>Fêmeas</b>                   | 0                | 0                     | 0                  | 0                | 36               | 130                   | 5                  | 1                |
| <b>Fêmeas Alimentadas</b>       | 0                | 0                     | 0                  | 0                | 5                | 27                    | 3                  | 0                |
| <b>Fêmeas com Ovos/Grávidas</b> | 0                | 0                     | 0                  | 0                | 16               | 47                    | 1                  | 1                |
| <b>Total</b>                    | 4                | 22                    | 0                  | 0                | 107              | 516                   | 16                 | 1                |

Em relação à abundância relativa das espécies entre 2017 e 2018 (Figura 32) destacou-se *P. perniciosus* com 80,78%, seguido de *P. ariasi* com 16,67%, *P. sergenti* com 2,40% e *S. minuta* com apenas 0,15%.



**Figura 32** - Abundância relativa (%) das espécies de flebotomos capturados na Freguesia de Cernache entre 2017 e 2018.

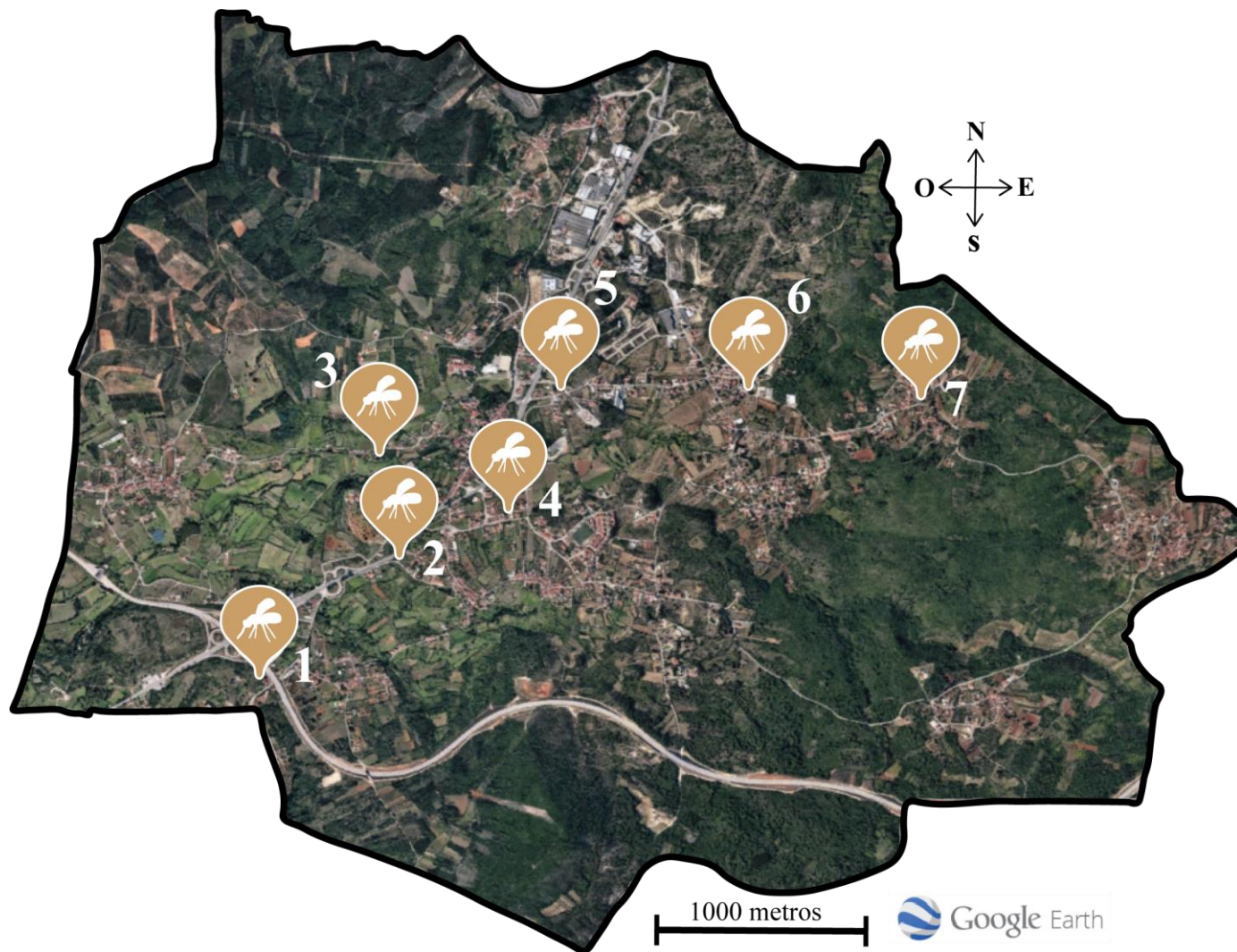
Comparando com as abundâncias relativas de estudos realizados em território português [35, 57, 60, 61 e 64], *P. perniciosus* apresentou uma abundância relativa com pouca variação e equivalente ao encontrado. *Phlebotomus sergenti* foi considerada uma espécie rara [85], o que pode ser explicado por fatores geográficos. Esta espécie prefere latitudes elevadas e regiões com maior humidade e, por outro lado, a colocação das armadilhas e escolha dos biótopos, não foram propícios para a deteção dessa espécie.

A ausência de *P. papatasi* é comum em alguns estudos [89], visto que a espécie é considerada rara e não houve capturas no país desde 1912.

### 3.1.3 Distribuição Geográfica

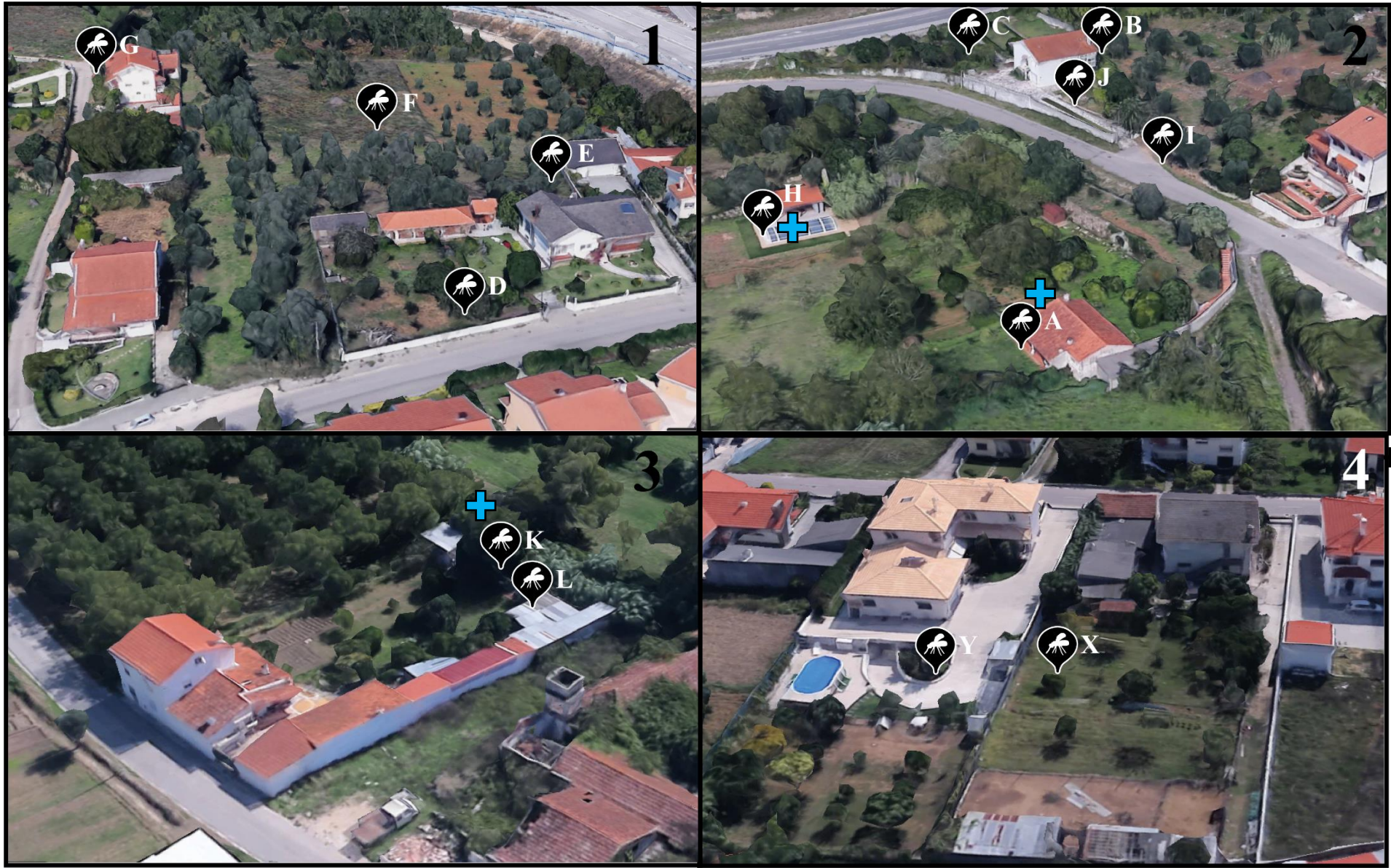
Para quantificação geográfica, na Freguesia de Cernache, foram totalizados 55 pontos de amostragem de diferentes biótopos, sendo 25 locais (concentração em pontos específicos de 1 a 7 – Figura 33) em 2017 e 30 locais (concentração em pontos específicos de 1 a 3 – Figura 35) em 2018.

Para o primeiro ano, foram colocadas 36 armadilhas (Figura 34) e para o segundo ano foram colocadas 107 (Figura 36 e 37), num total de 143 armadilhas. Verificou-se a presença positiva dos flebotomos em pelo menos 58% das armadilhas. As coordenadas geográficas estão descritas nas Tabelas 10 e 11.

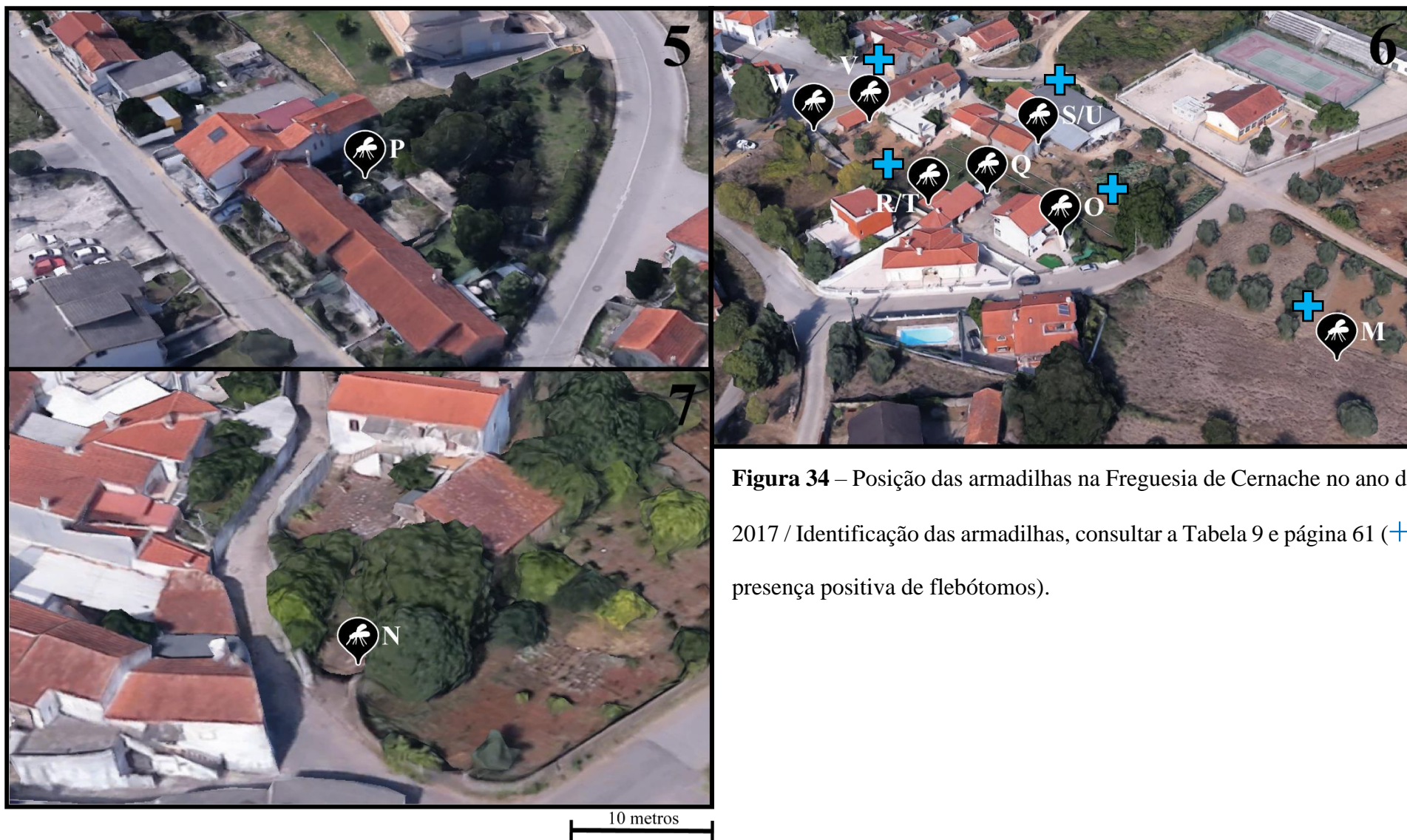


**Figura 33** – Pontos de colheita na Freguesia de Cernache no ano de 2017 / Detalhes da numeração de 1 a 7 na figura 31 [Google Earth © 2021].

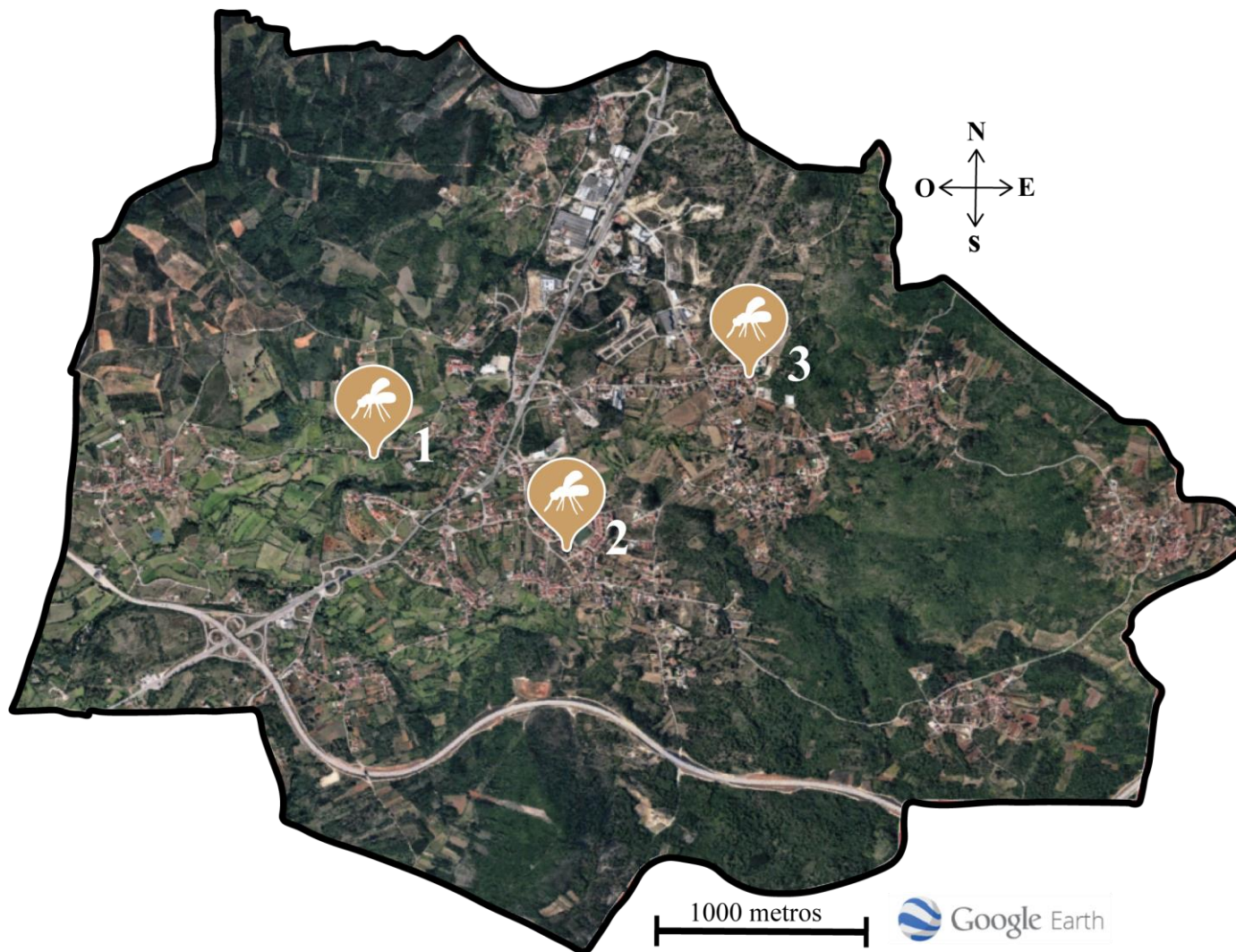




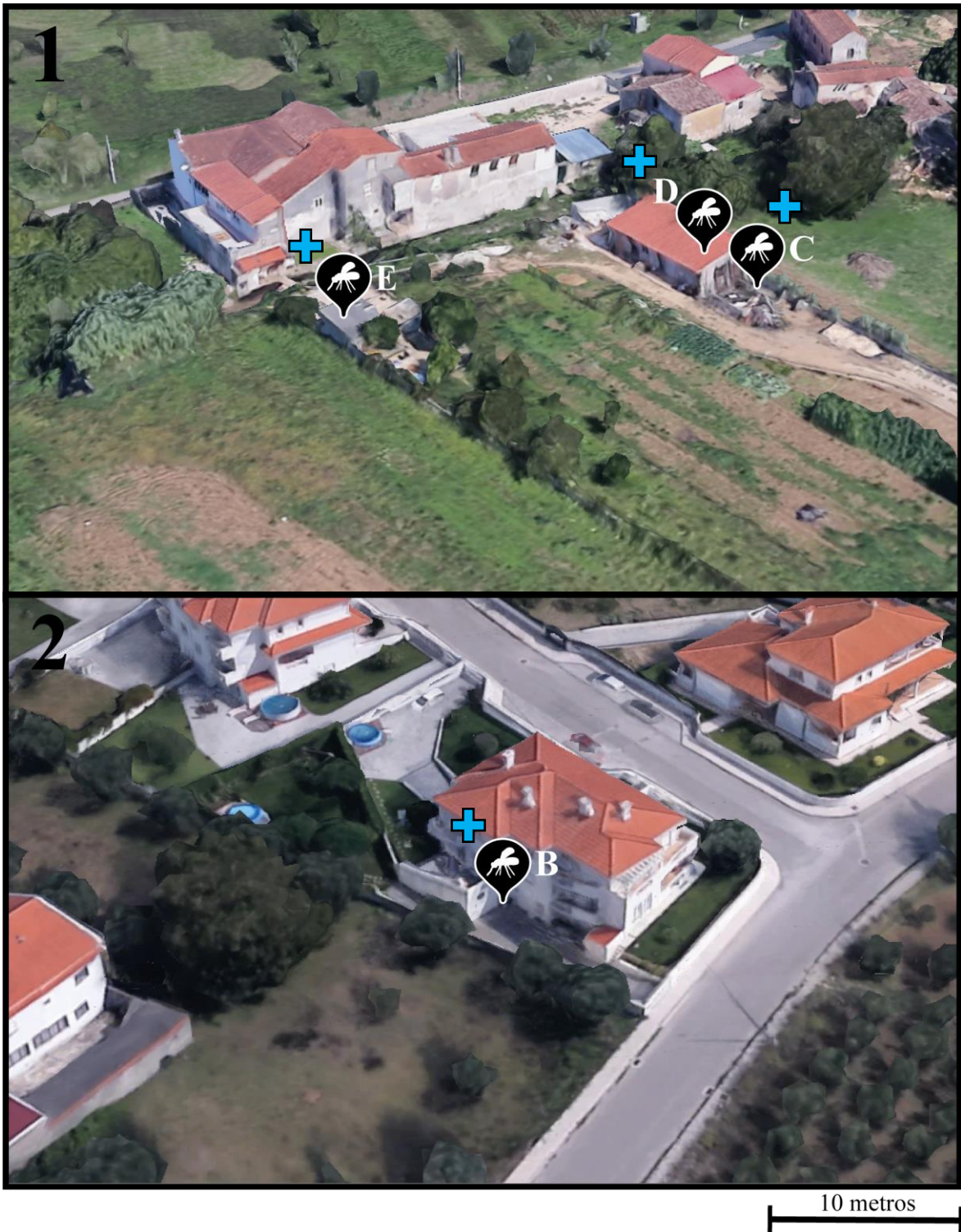
10 metros



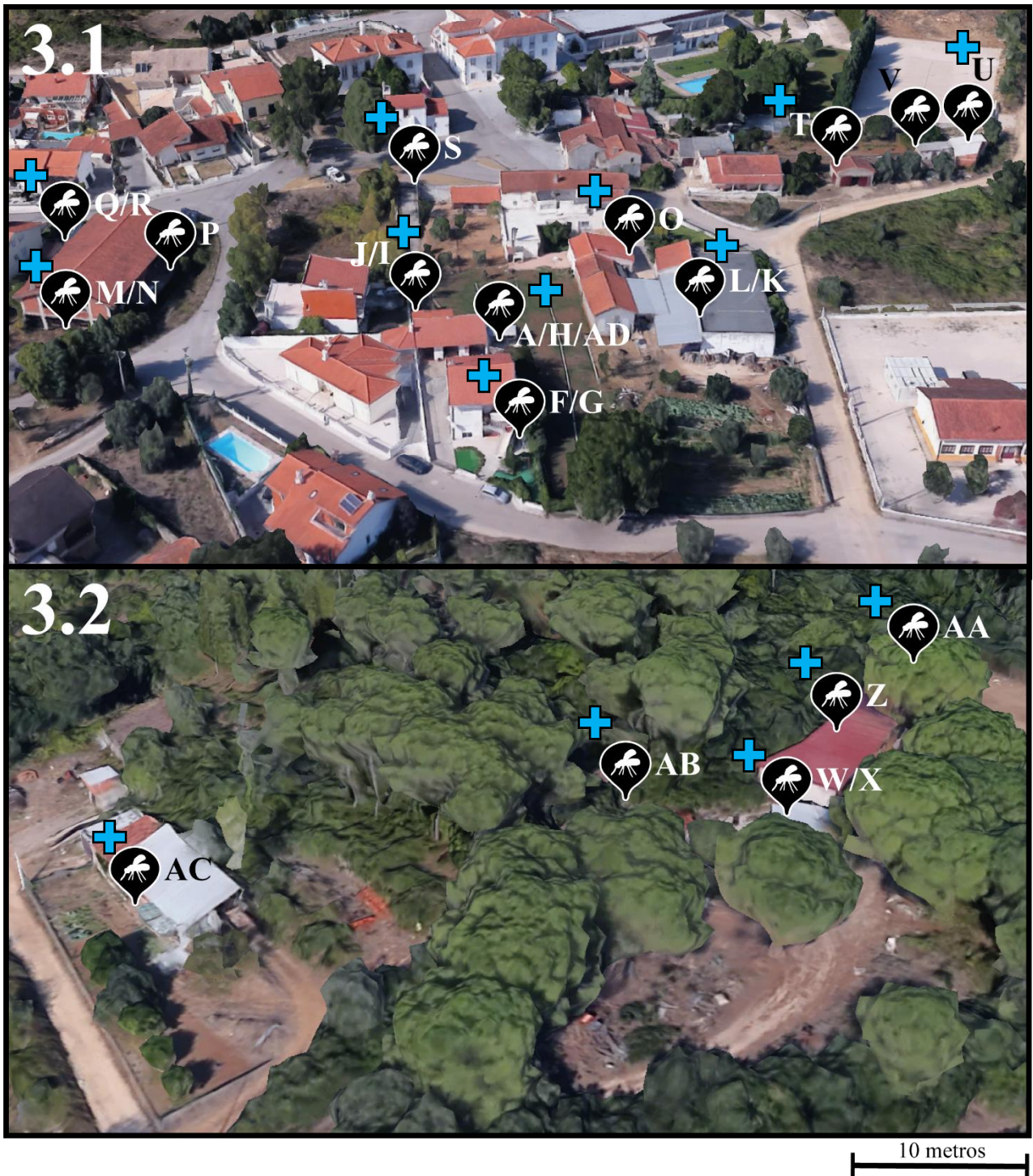
**Figura 34** – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2017 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 9 e página 61 (+: presença positiva de flebótomos).



**Figura 35** – Pontos de colheita na Freguesia de Cernache no ano de 2018 / Detalhes da numeração de 1 a 3 nas figuras 34 e 35 [Google Earth © 2021].



**Figura 36** – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2018 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 10 e página 62 (+: presença positiva de flebótomos).



**Figura 37** – Posição das armadilhas na Freguesia de Cernache no ano de 2018, Ponto de colheita 3 dividido em 3.1 e 3.2 / Identificação das armadilhas, consultar a Tabela 10 e página 62 (+: presença positiva de flebotomos).

**Tabela 9** – Locais amostrados na Freguesia de Cernache, identificação da armadilha no local, latitude, longitude e flebótomos encontrados, no ano de 2017.

| Armadilhas<br>(Figura 34) | Latitude     | Longitude   | <i>P. ariasi</i> | <i>P. perniciosus</i> | <i>P. sergenti</i> | <i>S. minuta</i> |
|---------------------------|--------------|-------------|------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| A                         | 40°7'52.4"N  | 8°28'29.5"W | Sim              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°7'52.5"N  | 8°28'29.8"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| B                         | 40°07'55.0"N | 8°28'29.5"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| C                         | 40°07'55.1"N | 8°28'30.7"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| D                         | 40°7'32.1"N  | 8°28'58.3"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| E                         | 40°7'33.4"N  | 8°28'58.2"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| F                         | 40°7'33.7"N  | 8°28'59.7"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| G                         | 40°7'33.9"N  | 8°29'2.6"W  | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°7'33.9"N  | 8°29'2.6"W  | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| H                         | 40°7'53.1"N  | 8°28'31.2"W | Sim              | Não                   | Não                | Não              |
| I                         | 40°7'53.9"N  | 8°28'28.9"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| J                         | 40°7'54.5"N  | 8°28'29.4"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| K                         | 40°8'12.9"N  | 8°28'33.3"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
| L                         | 40°8'13.0"N  | 8°28'33.5"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| M                         | 40°8'22.0"N  | 8°27'17.0"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
| N                         | 40°8'22.6"N  | 8°26'41.9"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| O                         | 40°8'24.3"N  | 8°27'17.4"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'24.3"N  | 8°27'17.4"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'24.3"N  | 8°27'17.4"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'24.3"N  | 8°27'17.5"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'24.3"N  | 8°27'17.4"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
| P                         | 40°8'24.4"N  | 8°27'57.2"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| Q                         | 40°8'25.0"N  | 8°27'17.5"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'25.0"N  | 8°27'17.5"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'25.0"N  | 8°27'17.5"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| R                         | 40°8'25.2"N  | 8°27'18.0"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
| S                         | 40°8'25.2"N  | 8°27'16.8"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| T                         | 40°8'25.2"N  | 8°27'18.0"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| U                         | 40°8'25.2"N  | 8°27'16.8"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
| V                         | 40°8'26.4"N  | 8°27'17.6"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'26.4"N  | 8°27'17.6"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'26.4"N  | 8°27'17.6"W | Não              | Sim                   | Não                | Não              |
|                           | 40°8'26.4"N  | 8°27'17.6"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| W                         | 40°8'26.5"N  | 8°27'18.1"W | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| X                         | 40°8'3.3"N   | 8°28'7.1"W  | Não              | Não                   | Não                | Não              |
| Y                         | 40°8'3.4"N   | 8°28'6.7"W  | Não              | Não                   | Não                | Não              |

**Tabela 10** – Locais amostrados na Freguesia de Cernache, identificação da armadilha no local, latitude, longitude e flebótomos encontrados, no ano de 2018.

| <b>Armadilha<br/>(Figura 36 e 37)</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> | <b><i>P. ariasi</i></b> | <b><i>P. perniciosus</i></b> | <b><i>P. sergenti</i></b> | <b><i>S. minuta</i></b> |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| A                                     | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| AA                                    | 40°08'27.9"N    | 8°27'09.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'27.9"N    | 8°27'09.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| AB                                    | 40°08'28.2"N    | 8°27'09.8"W      | Sim                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'28.9"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'28.9"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'29.1"N    | 8°27'11.1"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| AD                                    | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| B                                     | 40°07'55.7"N    | 8°27'54.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°07'55.7"N    | 8°27'54.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°07'55.7"N    | 8°27'54.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°07'55.7"N    | 8°27'54.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| C                                     | 40°08'12.5"N    | 8°28'38.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'12.5"N    | 8°28'38.6"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| D                                     | 40°08'12.6"N    | 8°28'38.6"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'12.6"N    | 8°28'38.6"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |

| <b>Armadilha</b><br><b>(Figura 36 e 37)</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> | <b><i>P. ariasi</i></b> | <b><i>P. perniciosus</i></b> | <b><i>P. sergenti</i></b> | <b><i>S. minuta</i></b> |
|---|-----------------|------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| E   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Sim                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Sim                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'13.0"N    | 8°28'39.9"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| F   | 40°08'24.2"N    | 8°27'17.4"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.2"N    | 8°27'17.4"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.2"N    | 8°27'17.4"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.2"N    | 8°27'17.4"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| G   | 40°08'24.3"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.3"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.3"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.3"N    | 8°27'17.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'24.3"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| H   | 40°08'25.0"N    | 8°27'17.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| I   | 40°08'25.2"N    | 8°27'16.8"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| J   | 40°08'25.2"N    | 8°27'18.0"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| K   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Sim                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| L   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|   | 40°08'25.3"N    | 8°27'16.2"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
| M   | 40°08'25.4"N    | 8°27'20.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |



| <b>Armadilha<br/>(Figura 36 e 37)</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> | <b><i>P. ariasi</i></b> | <b><i>P. perniciosus</i></b> | <b><i>P. sergenti</i></b> | <b><i>S. minuta</i></b> |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| N                                     | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'25.7"N    | 8°27'16.6"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| O                                     | 40°08'25.7"N    | 8°27'23.6"W      | Sim                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| P                                     | 40°08'25.8"N    | 8°27'19.9"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| Q                                     | 40°08'25.9"N    | 8°27'20.6"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| R                                     | 40°08'26.1"N    | 8°27'20.4"W      | Sim                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.5"N    | 8°27'18.2"W      | Não                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.5"N    | 8°27'18.2"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| S                                     | 40°08'26.5"N    | 8°27'18.2"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.5"N    | 8°27'18.2"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.5"N    | 8°27'18.2"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.6"N    | 8°27'14.5"W      | Sim                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| T                                     | 40°08'26.6"N    | 8°27'14.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Não                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
| U                                     | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
|                                       | 40°08'26.7"N    | 8°27'13.5"W      | Sim                     | Sim                          | Sim                       | Não                     |
| V                                     | 40°08'26.8"N    | 8°27'13.8"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| W                                     | 40°08'27.7"N    | 8°27'09.5"W      | Sim                     | Sim                          | Não                       | Não                     |
|                                       | 40°08'27.7"N    | 8°27'09.5"W      | Sim                     | Não                          | Não                       | Não                     |
| X                                     | 40°08'27.7"N    | 8°27'09.5"W      | Não                     | Não                          | Não                       | Não                     |

| Armadilha<br>(Figura 36 e 37) | Latitude     | Longitude   | <i>P. ariasi</i> | <i>P. perniciosus</i> | <i>P. sergenti</i> | <i>S. minuta</i> |
|-------------------------------|--------------|-------------|------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| Y                             | 40°08'27.8"N | 8°27'08.7"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
|                               | 40°08'27.8"N | 8°27'08.7"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
|                               | 40°08'27.8"N | 8°27'08.7"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
|                               | 40°08'27.8"N | 8°27'08.7"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
| Z                             | 40°08'27.9"N | 8°27'09.1"W | Sim              | Sim                   | Não                | Não              |
|                               | 40°08'27.8"N | 8°27'08.7"W | Sim              | Não                   | Não                | Não              |

### 3.1.4 Sexos

Para todas as espécies registadas, a razão dos sexos foi de 2,8:1 machos por fêmeas (494/172). A razão dos sexos de *P. ariasi* foi de 2,1:1 machos por fêmeas (75/36), para *P. perniciosus* foi de 3,1:1 machos por fêmeas (408/130) e *P. sergenti* teve uma razão dos sexos de 2,2:1 machos por fêmeas (11/5). *Sergentomyia minuta* teve um resultado nulo, devido à presença de uma única fêmea.

A razão de *P. perniciosus* e *P. ariasi* tem favorecimento para os machos [22], possuindo relação com a proximidade de seus criadouros, visto que, são considerados sedentários em comparação com as fêmeas. Logo, assume-se que as armadilhas foram colocadas em criadouros próximos.

O comportamento dos flebótomos, aliado às condições climáticas, como a predominância da variável “vento” influencia diretamente nesta razão, visto que temperaturas amenas e humidade relativa alta levam a uma maior atividade dos machos em relação às fêmeas [21, 33 e 35].

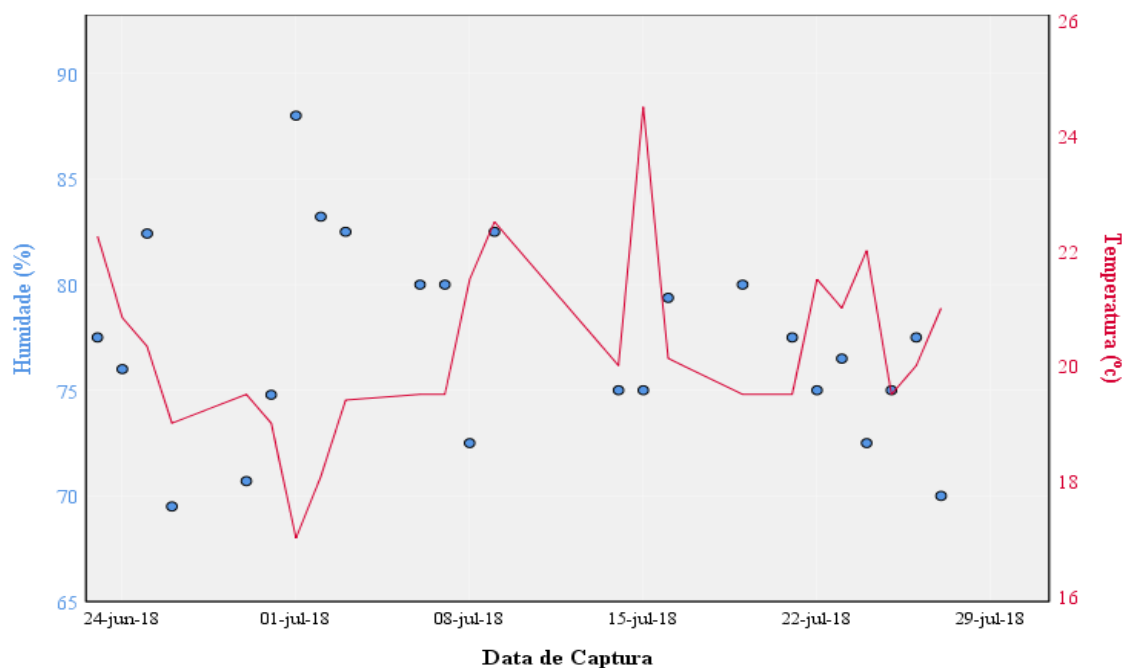
## 3.2 Aspetos ecológicos dos flebótomos

### 3.2.1 Temperaturas e humidades relativas

No ano de 2018, durante os meses de junho e julho de acordo com a tabela 11 e Figura 38, observou-se para a humidade relativa uma média de 77,6%, com uma mínima de 67,5% e uma máxima de 88%. Para a temperatura, observou-se uma média de 20,2°C, sendo a menor temperatura registada de 17°C e a maior temperatura de 25°C.

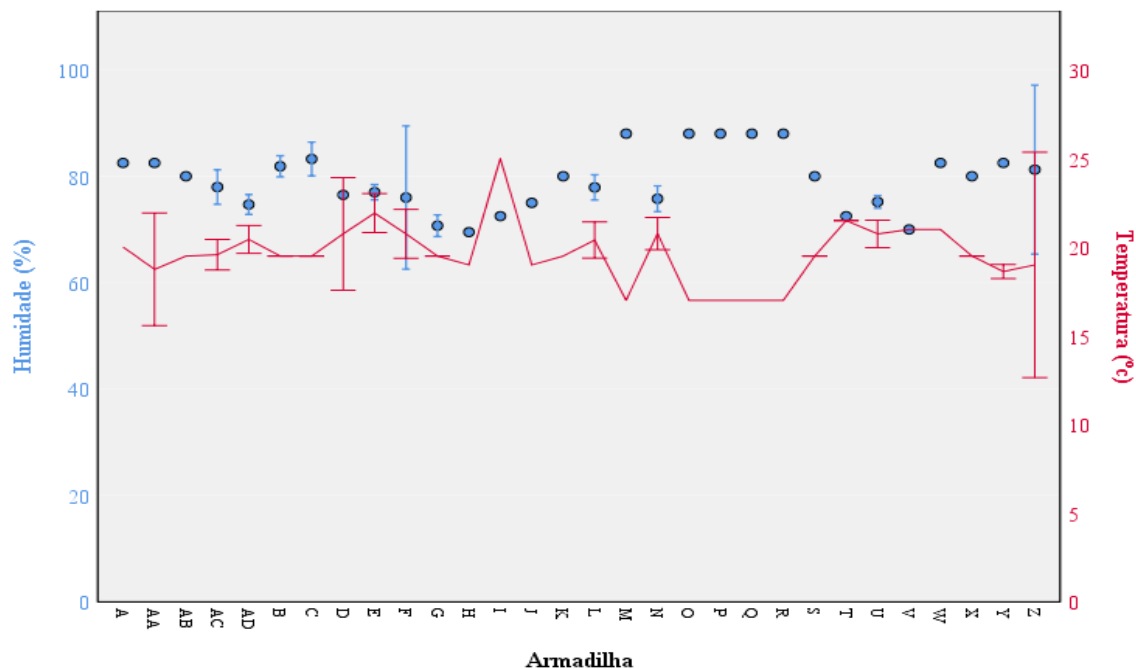
**Tabela 11** – Humidade relativa e temperatura registadas em 2018.

|                  | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo |
|------------------|-------|---------------|---------|--------|--------|
| Humidade (%)     | 77,6  | 4,8           | 76,5    | 67,5   | 88,0   |
| Temperatura (°C) | 20,2  | 1,6           | 19,5    | 17,0   | 25,0   |



**Figura 38** – Variação da humidade relativa e temperatura ao longo dos dias de colheita, na freguesia de Cernache, entre junho e julho de 2018.

Na Figura 39, as armadilhas de identificação M, O, P, Q e R tiveram a maior variação de humidade (89%), a menor variação de humidade (68%) com as armadilhas H e V. Para a temperatura, a armadilha I atingiu 26°C e as armadilhas M, O, P, Q e R com menor temperatura de 17°C.



**Figura 39** – Variação da humidade relativa e temperatura no período total das colheitas de acordo com cada armadilha na freguesia de Cernache, no ano de 2018.

Em uma análise da correlação de Spearman, (Tabela 12), observa-se que a atividade das espécies de flebótomos está relacionada com a temperatura e/ou humidade. Quanto mais alta a humidade, maior a presença de *P. ariasi*. No entanto, quanto mais alta a temperatura, maior a presença de *P. sergenti*.

*Phlebotomus ariasi* tem uma preferência por climas húmidos de acordo com alguns autores [23], mas não há uma associação significativa com as variáveis temperatura e humidade relativa. A sua densidade populacional tende a reduzir com a chegada de épocas mais quentes.

Para as demais espécies, não há uma correlação com a temperatura e/ou humidade, que neste caso, independente dos valores climáticos, *P. perniciosus* é prevalente, sendo assim, uma espécie que tem preferência por regiões sub-húmidas como também semi-áridas [23]. Para *S. minuta* não foi possível encontrar uma correlação significativa.

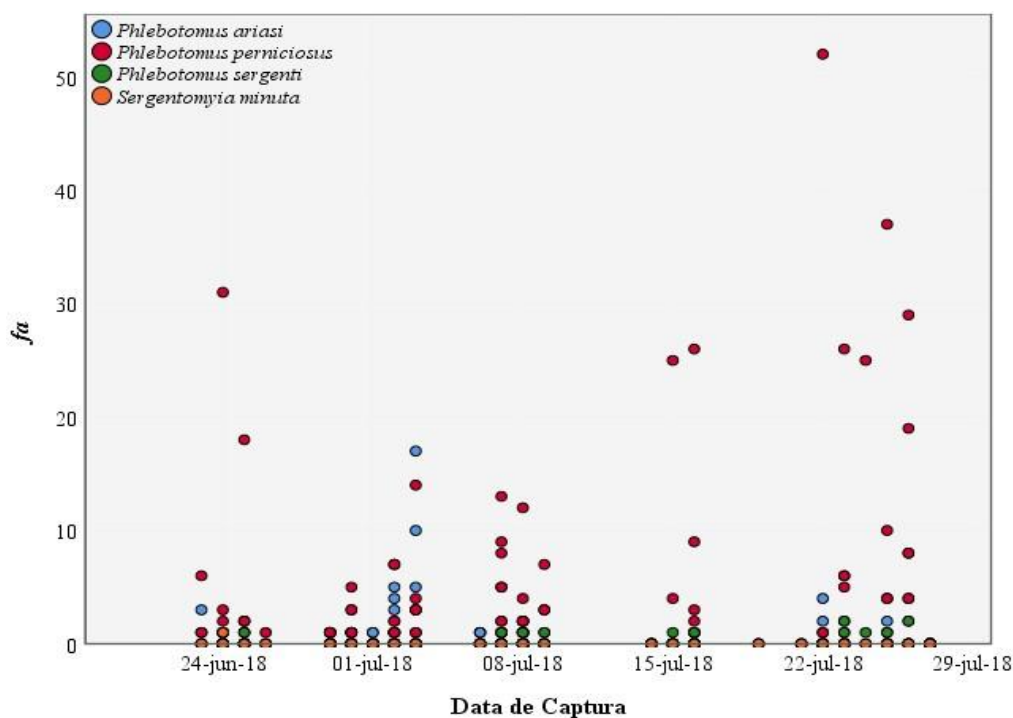
**Tabela 12** – Correlação de Spearman entre a humidade e a temperatura com a quantidade de indivíduos de cada espécie.

|                                | Humidade (%)               | Temperatura (°C)           |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Phlebotomus ariasi</i>      | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b> | rô = -0,17; p = 0,08       |
| <i>Phlebotomus perniciosus</i> | rô = 0,02; p = 0,81        | rô = 0,15; p = 0,13        |
| <i>Phlebotomus sergenti</i>    | rô = -0,05; p = 0,59       | <b>rô = 0,22; p = 0,02</b> |
| <i>Sergentomyia minuta</i>     | rô = -0,01; p = 0,88       | rô = 0,07; p = 0,48        |

rô = Correlação de Spearman

### 3.2.2 Distribuição e periodicidade

Para a distribuição das populações (Figura 40), durante as colheitas nos meses de junho e julho, as espécies *P. ariasi* e *P. perniciosus* estiveram presentes na maioria das amostras.

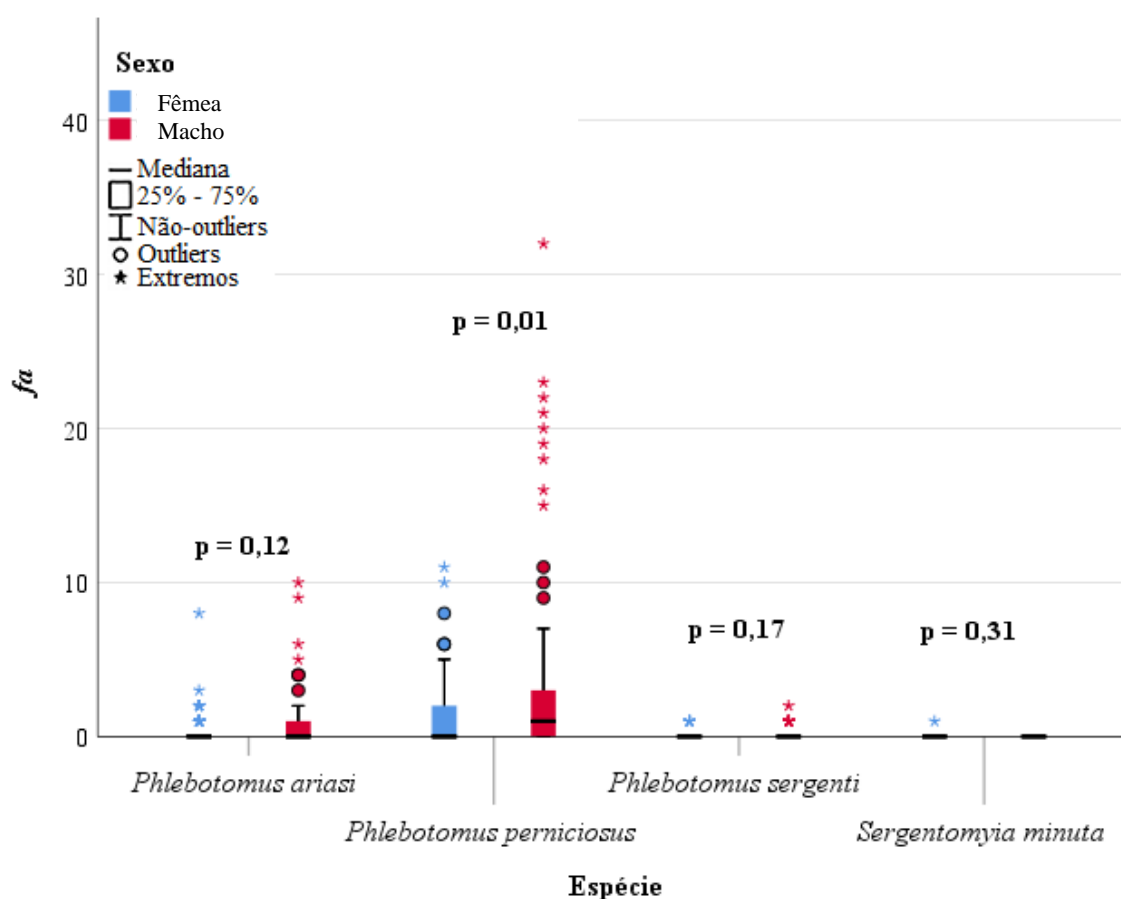


**Figura 40** – Distribuição das populações ao longo do período das amostragens, no ano de 2018, na freguesia de Cernache.

Na Tabela 13 e Figuras 41 e 42, em relação à distribuição das populações, *P. perniciosus*, possui uma abundância considerada alta para os machos, podendo ser relacionado a reprodução, em que as espécies alvos e possíveis hospedeiros, através da alimentação sanguínea, atraem uma maior densidade populacional de fêmeas dessa mesma espécie. [32, 33, 34 e88].

**Tabela 13** – Distribuição das populações de flebotomos no ano de 2018, na Freguesia de Cernache.

| Sexo  | Descritivos   | <i>Phlebotomus ariasi</i> | <i>Phlebotomus perniciosus</i> | <i>Phlebotomus sergenti</i> | <i>Sergentomyia minuta</i> |
|-------|---------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Fêmea | Média         | 0,34                      | 1,21                           | 0,05                        | 0,01                       |
|       | Desvio padrão | 0,96                      | 2,10                           | 0,21                        | 0,10                       |
|       | Mediana       | 0,00                      | 0,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Mínimo        | 0,00                      | 0,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Máximo        | 8,00                      | 11,00                          | 1,00                        | 1,00                       |
| Macho | Média         | 0,66                      | 3,61                           | 0,10                        | 0,00                       |
|       | Desvio padrão | 1,62                      | 6,95                           | 0,33                        | 0,00                       |
|       | Mediana       | 0,00                      | 1,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Mínimo        | 0,00                      | 0,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Máximo        | 10,00                     | 41,00                          | 2,00                        | 0,00                       |
| Total | Média         | 0,50                      | 2,41                           | 0,07                        | 0,00                       |
|       | Desvio padrão | 1,34                      | 5,26                           | 0,28                        | 0,07                       |
|       | Mediana       | 0,00                      | 1,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Mínimo        | 0,00                      | 0,00                           | 0,00                        | 0,00                       |
|       | Máximo        | 10,00                     | 41,00                          | 2,00                        | 1,00                       |



**Figura 41** – Distribuição das populações (macho e fêmea). fa = frequência absoluta; p= teste de Mann-Whitney.

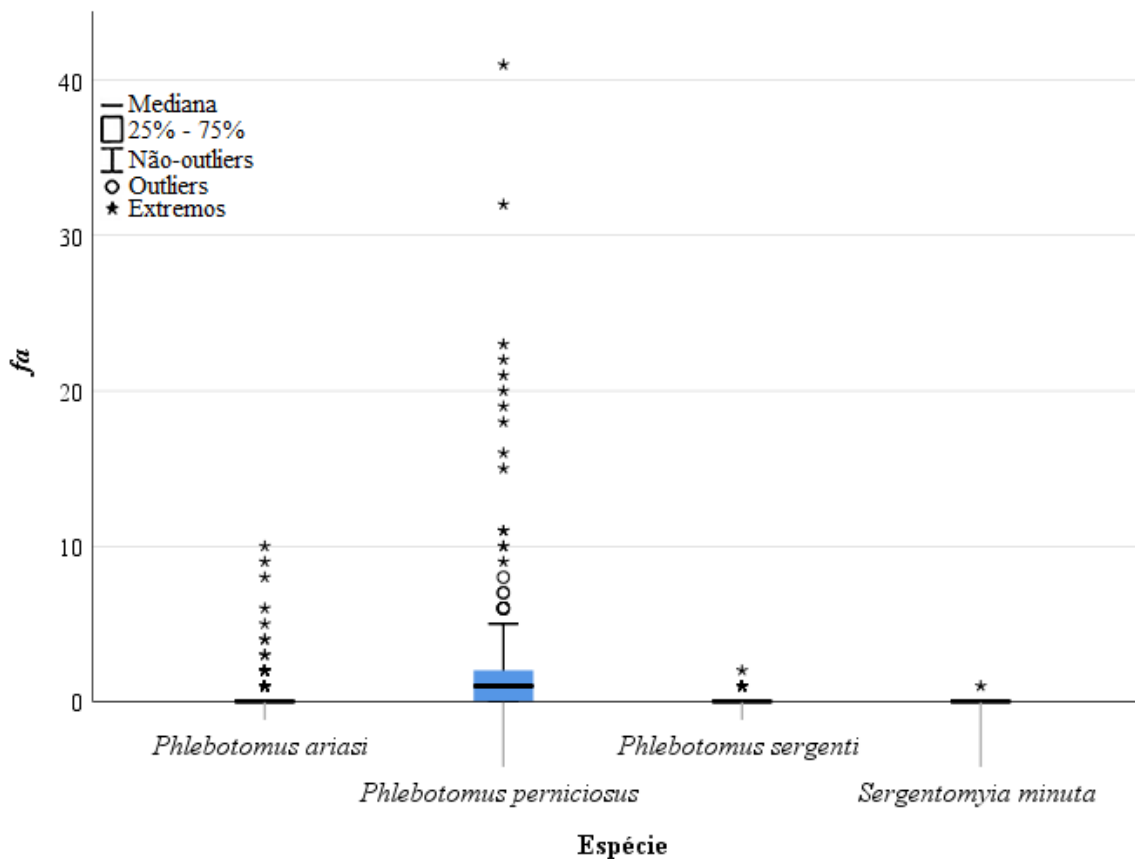


Figura 42 – Distribuição total das populações de flebotomos.

### 3.2.3 Caracterização ecológica dos biótopos e distribuição das populações

A distribuição das populações, em relação aos biótopos amostrados, teve uma predominância de 86% para o biótopo peridoméstico. O solo calcário característico no território português [75], esteve presente em 84,1% dos locais das armadilhas, seguido do solo argiloso com 70,1% (Tabela 14).

Na distribuição das populações destacou-se a proximidade de frutícolas com 62,6%, pinheiros com 16,8% e oliveiras com 10,3%. Essa preferência, segundo alguns autores, deve-se à oviposição das larvas, em que as características físico-químicas do substrato agem como atrativo para as fêmeas [21, 35].

O local de captura também influenciou a distribuição dos flebotomos, havendo preferência pela proximidade de criadouros de animais, seja em ambientes interiores com 49,5%, exteriores com 18,7% ou semelhança com abrigos artificiais com 18,7%. A possibilidade de alimentação sanguínea e oportunista é mais viável e tem menor gasto energético [87].

Dos locais de captura com preferência pelos flebótomos, destacam-se as gaiolas e criadouros de aves com 37,4%, além de locais em que existiam cães com 36,4%. A ausência de coleiras protetoras e repelentes nos cães está relacionada com a elevada presença de flebótomos (99,1%).

**Tabela 14** – Caracterização do biótopo, solo, fitogeografia, local de captura, animais existentes e clima, no ano de 2018 durante junho e julho, n=107.

| <b>Caracterização</b>     | <b>Descrição</b>       | <b><i>fa</i></b> | <b><i>fr</i></b> |
|---------------------------|------------------------|------------------|------------------|
| <b>Biótopo</b>            | Doméstico              | 15               | 14,0             |
|                           | Peridoméstico          | 92               | 86,0             |
|                           | Silvático              | 0                | 0,0              |
| <b>Solo</b>               | Calcário               | 90               | 84,1             |
|                           | Arenoso                | 5                | 4,7              |
|                           | Argiloso               | 75               | 70,1             |
|                           | Terroso                | 2                | 1,9              |
|                           | Outros                 | 18               | 16,8             |
| <b>Fitogeografia</b>      | Videira                | 0                | 0,0              |
|                           | Oliveira               | 11               | 10,3             |
|                           | Carvalho               | 4                | 3,7              |
|                           | Figueira               | 0                | 0,0              |
|                           | Pinheiro               | 18               | 16,8             |
|                           | Eucalipto              | 7                | 6,5              |
|                           | Frutículas             | 67               | 62,6             |
|                           | Horticultura           | 9                | 8,4              |
|                           | Cerealicultura         | 0                | 0,0              |
|                           | Outros                 | 38               | 35,5             |
| <b>Local de captura</b>   | Casa Interior          | 0                | 0,0              |
|                           | Casa Exterior          | 2                | 1,9              |
|                           | Abrigo Animal Interior | 53               | 49,5             |
|                           | Abrigo Animal Exterior | 20               | 18,7             |
|                           | Abrigo Artificial      | 20               | 18,7             |
|                           | Buraco nas Rochas      | 0                | 0,0              |
|                           | Parede/Muro            | 0                | 0,0              |
|                           | Gruta                  | 0                | 0,0              |
|                           | Outros                 | 26               | 24,3             |
| <b>Animais existentes</b> | Cão                    | 39               | 36,4             |
|                           | Gato                   | 1                | 0,9              |
|                           | Aves                   | 40               | 37,4             |
|                           | Coelhos                | 10               | 9,3              |
|                           | Bovinos                | 0                | 0,0              |
|                           | Ovinos                 | 8                | 7,5              |
|                           | Outros Animais         | 20               | 18,7             |
|                           | Selvagens              | 3                | 2,8              |
|                           | Coleiras ausentes      | 106              | 99,1             |
|                           | Inseticida             | 1                | 0,9              |
|                           | <b>Clima</b>           | Vento            | 16               |
| Chuva                     |                        | 24               | 22,4             |

*fa* = frequência absoluta; *fr* = frequência relativa



Na Tabela 15, a correlação geral entre o descritor e a espécie indica uma preferência positiva e/ou negativa para cada interação. O valor próximo de 1, significa uma correlação positiva, um valor negativo, tem uma correlação inversa, tornando o descritor um redutor para a flutuação populacional.

Em relação a *P. ariasi* existe uma correlação significativa para ambientes com o solo do tipo calcário e argiloso. No entanto, há uma correlação inversa para outros tipos de solo, em que a preferência é reduzida. Para a fitogeografia, a presença de pinheiros é o fator preferido. Estima-se que, para esta espécie, não há uma preferência de habitat nem de vertebrados para a alimentação sanguínea e reprodução sendo a humidade mais alta a variável preferencial.

Para a espécie *P. perniciosus*, o tipo de solo arenoso tem uma correlação negativa, resultando na preferência apenas por solo do tipo calcário e argiloso, além da presença de árvores frutícolas. Casas com abrigos de animais interior e exterior, possuem uma predominância desta espécie.

*Phlebotomus sergenti* apresentou uma correlação positiva com a presença de gatos e aves, sendo os abrigos de animais no interior de residências e as temperaturas mais altas, fatores que são preferenciais para a sua atividade flebotomínica.

**Tabela 15** – Correlação de Spearman entre a distribuição das espécies com os descritores biótopo, solo, fitogeográfica, local de captura, animais existentes e dados climáticos, na Freguesia de Cernache, durante os meses de junho e julho de 2018, n=107

| Descritor / Espécies      |                        | <i>Phlebotomus ariasi</i>   | <i>Phlebotomus perniciosus</i> | <i>Phlebotomus sergente</i> | <i>Sergentomyia minuta</i> |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Biótopo</b>            | Doméstico              | rô = 0,07; p = 0,48         | rô = -0,14; p = 0,16           | rô = -0,08; p = 0,42        | rô = -0,04; p = 0,69       |
|                           | Peridoméstico          | rô = -0,07; p = 0,48        | rô = 0,14; p = 0,16            | rô = 0,08; p = 0,42         | rô = 0,04; p = 0,69        |
| <b>Solo</b>               | Calcário               | <b>rô = 0,22; p = 0,02</b>  | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>     | rô = 0,02; p = 0,84         | rô = 0,04; p = 0,67        |
|                           | Arenoso                | rô = -0,03; p = 0,75        | <b>rô = -0,27; p = 0,01</b>    | rô = -0,09; p = 0,38        | rô = -0,02; p = 0,83       |
|                           | Argiloso               | <b>rô = 0,27; p = 0,01</b>  | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>     | rô = 0,08; p = 0,44         | rô = -0,15; p = 0,13       |
|                           | Terroso                | rô = -0,11; p = 0,26        | rô = -0,04; p = 0,69           | rô = -0,05; p = 0,58        | rô = -0,01; p = 0,89       |
|                           | Outros                 | <b>rô = -0,27; p = 0,01</b> | rô = -0,05; p = 0,62           | rô = 0,04; p = 0,66         | rô = -0,04; p = 0,66       |
|                           |                        |                             |                                |                             |                            |
| <b>Fitogeografia</b>      | Oliveira               | rô = -0,07; p = 0,48        | rô = 0,11; p = 0,26            | rô = -0,04; p = 0,67        | <b>rô = 0,29; p = 0,01</b> |
|                           | Carvalho               | rô = 0,08; p = 0,39         | <b>rô = -0,24; p = 0,01</b>    | rô = -0,08; p = 0,43        | rô = -0,02; p = 0,84       |
|                           | Pinheiro               | <b>rô = 0,39; p = 0,01</b>  | rô = -0,07; p = 0,46           | rô = -0,17; p = 0,07        | rô = -0,04; p = 0,66       |
|                           | Eucalipto              | rô = -0,03; p = 0,79        | rô = 0,08; p = 0,40            | rô = 0,01; p = 0,94         | <b>rô = 0,37; p = 0,01</b> |
|                           | Frutículas             | rô = -0,14; p = 0,16        | <b>rô = 0,24; p = 0,01</b>     | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>  | rô = 0,08; p = 0,44        |
|                           | Horticultura           | rô = -0,19; p = 0,06        | rô = 0,05; p = 0,62            | rô = -0,02; p = 0,84        | rô = -0,03; p = 0,76       |
|                           | Outros                 | rô = 0,14; p = 0,16         | <b>rô = -0,25; p = 0,01</b>    | rô = -0,17; p = 0,07        | rô = -0,07; p = 0,46       |
| <b>Local de Captura</b>   | Casa Exterior          | rô = 0,01; p = 0,98         | rô = -0,17; p = 0,09           | rô = -0,05; p = 0,58        | rô = -0,01; p = 0,89       |
|                           | Abrigo Animal Interior | rô = 0,07; p = 0,50         | <b>rô = 0,53; p = 0,01</b>     | <b>rô = 0,39; p = 0,01</b>  | rô = 0,10; p = 0,32        |
|                           | Abrigo Animal Exterior | rô = -0,07; p = 0,48        | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>     | rô = -0,19; p = 0,06        | rô = -0,05; p = 0,63       |
|                           | Abrigo Artificial      | rô = 0,07; p = 0,48         | rô = -0,15; p = 0,13           | rô = -0,19; p = 0,06        | rô = -0,05; p = 0,63       |
|                           | Outros                 | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>  | rô = -0,18; p = 0,06           | <b>rô = -0,22; p = 0,02</b> | rô = -0,06; p = 0,57       |
|                           |                        |                             |                                |                             |                            |
| <b>Animais existentes</b> | Cão                    | rô = 0,01; p = 1,00         | rô = 0,15; p = 0,13            | rô = -0,01; p = 0,91        | rô = 0,13; p = 0,19        |
|                           | Gato                   | rô = -0,08; p = 0,43        | rô = 0,16; p = 0,09            | <b>rô = 0,24; p = 0,01</b>  | rô = -0,01; p = 0,92       |
|                           | Aves                   | rô = -0,10; p = 0,32        | rô = 0,18; p = 0,06            | <b>rô = 0,22; p = 0,02</b>  | rô = -0,08; p = 0,44       |
|                           | Coelhos                | rô = 0,15; p = 0,12         | rô = -0,17; p = 0,08           | rô = -0,12; p = 0,20        | rô = -0,03; p = 0,75       |
|                           | Ovinos                 | rô = -0,07; p = 0,45        | rô = 0,15; p = 0,13            | rô = 0,10; p = 0,32         | rô = -0,03; p = 0,78       |
|                           | Outros Animais         | rô = 0,10; p = 0,33         | rô = 0,16; p = 0,10            | rô = 0,09; p = 0,34         | rô = -0,05; p = 0,63       |
|                           | Selvagens              | rô = -0,13; p = 0,17        | rô = -0,07; p = 0,47           | rô = -0,07; p = 0,50        | rô = -0,02; p = 0,87       |
|                           | Coleiras ausentes      | rô = 0,08; p = 0,43         | rô = 0,03; p = 0,78            | rô = 0,04; p = 0,70         | rô = 0,01; p = 0,92        |
|                           | Inseticida             | rô = -0,08; p = 0,43        | rô = -0,03; p = 0,78           | rô = -0,04; p = 0,70        | rô = -0,01; p = 0,92       |
| <b>Dados climáticos</b>   | Humidade (%)           | <b>rô = 0,20; p = 0,04</b>  | rô = 0,02; p = 0,81            | rô = -0,05; p = 0,59        | rô = -0,01; p = 0,88       |
|                           | Temperatura (°C)       | rô = -0,17; p = 0,08        | rô = 0,15; p = 0,13            | <b>rô = 0,22; p = 0,02</b>  | rô = 0,07; p = 0,48        |
|                           | Vento                  | rô = 0,11; p = 0,25         | rô = -0,14; p = 0,14           | rô = -0,16; p = 0,09        | rô = -0,04; p = 0,68       |
|                           | Chuva                  | <b>rô = 0,30; p = 0,01</b>  | rô = 0,02; p = 0,86            | rô = -0,14; p = 0,14        | rô = 0,18; p = 0,06        |

rô= Correlação de Spearman

### 3.3 Fatores de riscos para atividade flebotomínica

#### 3.3.1 *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

Para a Tabela 16, a análise de regressão linear múltipla (método *Backward*), os descritores que apresentaram associação significativa com a presença de *P. ariasi* com uma prevalência de 32% ( $r^2$ ) são os seguintes:

- Biótopo peridoméstico ( $p = 0,04$ )
- Solo do tipo calcário ( $t = 3,04$ )
- Árvore do tipo pinheiro ( $B = 2,36$ )
- A presença de vento local ( $t = 2,86$ )
- A presença de chuva ( $t = 0,08$ )

Em comparação com alguns estudos [22, 63], esta espécie prefere biótopos domésticos, além da presença de vento e chuva, que contribui para a humidade no local.

**Tabela 16** – Análise de regressão linear múltipla (método *Backward*) entre a distribuição da população de *Phlebotomus ariasi* com os descritores.

| Modelos | Preditores    | $r^2$ | <i>B</i> | Erro padrão | <i>T</i> | <i>p</i>    |
|---------|---------------|-------|----------|-------------|----------|-------------|
| 1       | Peridoméstico | 0,34  | -1,58    | 0,70        | -2,24    | <b>0,03</b> |
|         | Calcário      |       | 1,80     | 0,64        | 2,81     | <b>0,01</b> |
|         | Arenoso       |       | -1,49    | 1,17        | -1,27    | 0,21        |
|         | Pinheiro      |       | 1,60     | 0,71        | 2,26     | <b>0,03</b> |
|         | Coelhos       |       | -1,56    | 0,73        | -2,14    | <b>0,03</b> |
|         | Selvagens     |       | -3,45    | 1,35        | -2,55    | <b>0,01</b> |
|         | Vento         |       | 1,80     | 0,67        | 2,67     | <b>0,01</b> |
|         | Chuva         |       | 1,03     | 0,59        | 1,74     | 0,08        |
| 2       | Peridoméstico | 0,33  | -1,22    | 0,65        | -1,88    | 0,06        |
|         | Calcário      |       | 1,98     | 0,63        | 3,16     | <b>0,00</b> |
|         | Pinheiro      |       | 1,84     | 0,68        | 2,69     | <b>0,01</b> |
|         | Coelhos       |       | -1,60    | 0,73        | -2,18    | <b>0,03</b> |
|         | Selvagens     |       | -3,11    | 1,33        | -2,34    | <b>0,02</b> |
|         | Vento         |       | 1,57     | 0,65        | 2,41     | <b>0,02</b> |
|         | Chuva         |       | 0,90     | 0,58        | 1,55     | 0,13        |
| 3       | Peridoméstico | 0,32  | -1,11    | 0,65        | -1,71    | <b>0,04</b> |
|         | Calcário      |       | 1,91     | 0,63        | 3,04     | <b>0,00</b> |
|         | Pinheiro      |       | 2,36     | 0,60        | 3,96     | <b>0,00</b> |
|         | Coelhos       |       | -1,85    | 0,72        | -2,58    | <b>0,01</b> |
|         | Selvagens     |       | -2,55    | 1,29        | -1,98    | <b>0,04</b> |
| Vento   | 1,82          | 0,63  | 2,86     | <b>0,01</b> |          |             |

*B* = Coeficientes não padronizados

### 3.3.2 *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead, 1911

Na Tabela 17 encontra-se, a análise de regressão linear múltipla (método *Backward*), para *P. perniciosus*. Os descritores que apresentaram associação significativa com uma prevalência de 27% ( $r^2$ ) foram:

- Solo do tipo argiloso ( $t = 3,04$ )
- Abrigos de animais em interior ( $B = 5,03$ )
- A presença de gatos ( $B = 23,68$ )
- Outros tipos de animais, com exceção de criação ( $B = 4,92$ )

Esses resultados de acordo com alguns autores sugerem que o *P. perniciosus* seja uma espécie com oportunismo, aproveita-se do fácil acesso ao alimento com preferência para mamíferos e galináceos e a possibilidade de as fêmeas colocarem seus ovos em locais com alta densidade arbórea [88, 90].

**Tabela 17** – Análise de regressão linear múltipla (método *Backward*) entre a distribuição da população de *Phlebotomus perniciosus* com os descritores.

| Modelos | Preditores             | $r^2$ | $B$   | Erro padrão | $T$   | $p$         |
|---------|------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------------|
| 1       | Peridoméstico          | 0,30  | -9,94 | 2,92        | -3,40 | <b>0,00</b> |
|         | Arenoso                |       | -8,23 | 4,55        | -1,81 | 0,07        |
|         | Argiloso               |       | 4,55  | 1,85        | 2,46  | <b>0,02</b> |
|         | Terroso                |       | -9,68 | 6,17        | -1,57 | 0,12        |
|         | Pinheiro               |       | -6,06 | 2,23        | -2,72 | <b>0,01</b> |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 4,89  | 1,54        | 3,18  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 23,03 | 7,99        | 2,88  | <b>0,00</b> |
|         | Outros Animais         |       | 4,79  | 2,14        | 2,24  | <b>0,03</b> |
| 2       | Peridoméstico          | 0,28  | -8,08 | 2,69        | -3,00 | <b>0,00</b> |
|         | Arenoso                |       | -6,01 | 4,36        | -1,38 | 0,17        |
|         | Argiloso               |       | 5,03  | 1,84        | 2,74  | <b>0,01</b> |
|         | Pinheiro               |       | -5,80 | 2,24        | -2,59 | <b>0,01</b> |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 4,77  | 1,55        | 3,08  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 23,44 | 8,04        | 2,91  | <b>0,00</b> |
|         | Outros Animais         |       | 4,86  | 2,15        | 2,26  | <b>0,03</b> |
| 3       | Peridoméstico          | 0,27  | -6,37 | 2,40        | -2,66 | <b>0,01</b> |
|         | Argiloso               |       | 5,50  | 1,81        | 3,04  | <b>0,00</b> |
|         | Pinheiro               |       | -5,52 | 2,24        | -2,47 | <b>0,02</b> |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 5,03  | 1,55        | 3,26  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 23,68 | 8,08        | 2,93  | <b>0,00</b> |
|         | Outros Animais         |       | 4,92  | 2,16        | 2,27  | <b>0,03</b> |

$B$  = Coeficientes não padronizados

### 3.3.3 *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

Para *P. sergenti*, na Tabela 18, referente à análise de regressão linear múltipla (método *Backward*), os descritores que apresentaram associação significativa com uma prevalência de 19% ( $r^2$ ), foram:

- Abrigos de animais em interior ( $B = 3,98$ )
- A presença de gatos ( $B = 2,24$ )
- Presença de chuva e humidade alta ( $p = 0,04$ ).

Essa espécie está associada com a atividade humana, com maior preferência por biótopos domésticos e peridomésticos. Os resultados deste estudo, estão de acordo com alguns autores, como demonstram as colheitas positivas [61, 91].

**Tabela 18** – Análise de regressão linear múltipla (método *Backward*) entre a distribuição da população de *Phlebotomus sergenti* com os descritores.

| Modelos | Preditores             | $r^2$ | $B$   | Erro padrão | $t$   | $p$         |
|---------|------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------------|
| 1       | Argiloso               | 0,23  | 0,05  | 0,08        | 0,62  | 0,54        |
|         | Frutículas             |       | 0,11  | 0,08        | 1,34  | 0,18        |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 0,28  | 0,07        | 3,85  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 0,99  | 0,39        | 2,55  | <b>0,01</b> |
|         | Chuva                  |       | -0,20 | 0,11        | -1,83 | 0,07        |
|         | Humidade (%)           |       | 0,01  | 0,01        | 1,12  | 0,26        |
| 2       | Frutículas             | 0,22  | 0,12  | 0,08        | 1,56  | 0,12        |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 0,28  | 0,07        | 3,87  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 0,96  | 0,38        | 2,51  | <b>0,01</b> |
|         | Chuva                  |       | -0,20 | 0,11        | -1,85 | 0,07        |
|         | Humidade (%)           |       | 0,01  | 0,01        | 1,12  | 0,26        |
| 3       | Frutículas             | 0,21  | 0,11  | 0,08        | 1,43  | 0,16        |
|         | Abrigo Animal Interior |       | 0,27  | 0,07        | 3,79  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 0,90  | 0,38        | 2,36  | <b>0,02</b> |
|         | Chuva                  |       | -0,14 | 0,09        | -1,48 | 0,14        |
| 4       | Abrigo Animal Interior | 0,19  | 0,29  | 0,07        | 3,98  | <b>0,00</b> |
|         | Gato                   |       | 0,85  | 0,38        | 2,24  | <b>0,03</b> |
|         | Chuva                  |       | -0,18 | 0,09        | -2,02 | <b>0,04</b> |

$B$  = Coeficientes não padronizados

### 3.3.4 *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843

Na Tabela 19, para a análise de regressão linear múltipla (método *Backward*), os descritores que apresentaram associação significativa com a presença de *S. minuta* com uma prevalência de 8% ( $r^2$ ) foram:

- a. Presença de oliveiras ( $t = 3,07$ )

Devido à baixa densidade desta espécie, os resultados foram considerados insuficientes.

**Tabela 19** – Análise de regressão linear múltipla (método *Backward*) entre a distribuição da população de *Sergentomyia minuta* com os descritores.

| Modelos | Preditores | $r^2$ | <i>B</i> | Erro padrão | <i>t</i> | <i>p</i>    |
|---------|------------|-------|----------|-------------|----------|-------------|
| 1       | Oliveira   | 0,13  | 0,08     | 0,03        | 2,65     | <b>0,01</b> |
|         | Pinheiro   |       | -0,04    | 0,03        | -1,27    | 0,21        |
|         | Selvagens  |       | -0,8     | 0,06        | -1,42    | 0,16        |
|         | Chuva      |       | 0,06     | 0,03        | 2,27     | <b>0,03</b> |
| 2       | Oliveira   | 0,11  | 0,09     | 0,03        | 2,99     | <b>0,00</b> |
|         | Selvagens  |       | -0,06    | 0,06        | -1,13    | 0,26        |
|         | Chuva      |       | 0,04     | 0,02        | 1,88     | 0,06        |
| 3       | Oliveira   | 0,10  | 0,09     | 0,03        | 2,89     | <b>0,00</b> |
|         | Chuva      |       | 0,03     | 0,02        | 1,61     | <b>0,11</b> |
| 4       | Oliveira   | 0,08  | 0,09     | 0,03        | 3,07     | <b>0,00</b> |

*B* = Coeficientes não padronizados

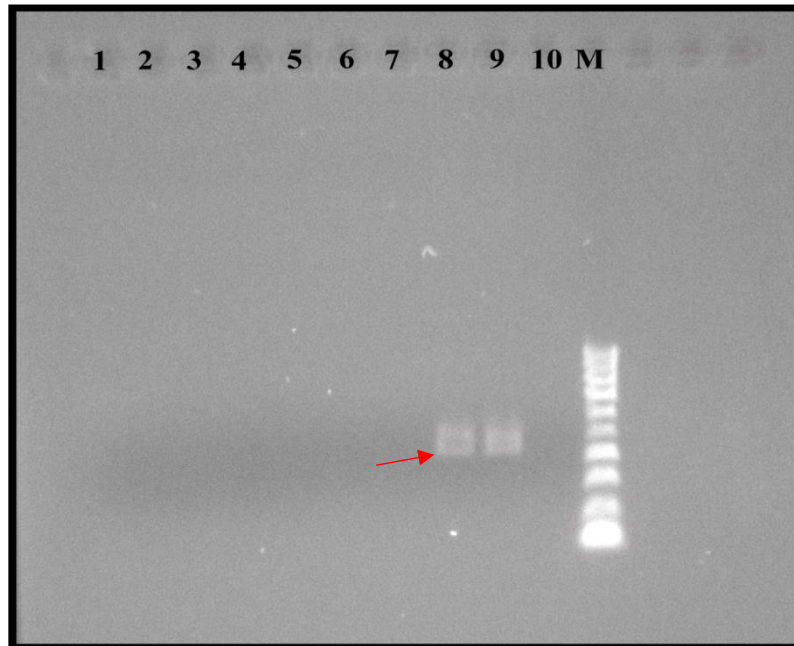
## 3.4 Análise Molecular

Em relação às 16 fêmeas analisadas por PCR com os “*primers*” MC1 e MC2 (Figura 43), não foi observada amplificação do DNA cinetoplastideal de *L. infantum*.

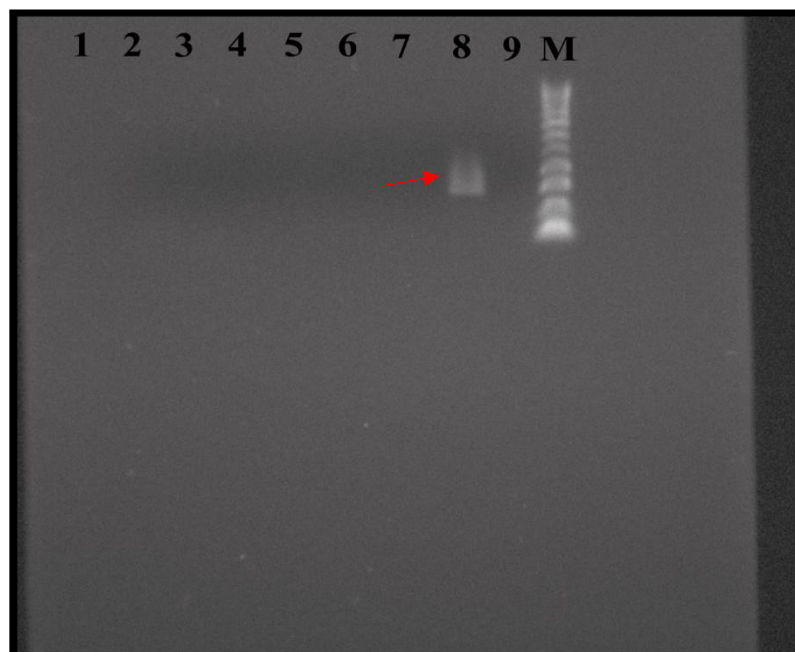
O DNA das mesmas 16 fêmeas, foi amplificado com os “*primers*” LITRS e L5.8S, para o ITS1 do operão ribossomal (Figura 44) e também não foi observada amplificação para o DNA de *L. infantum*.

De igual modo a restrição enzimática do produto de ITS1-PCR com a enzima HaeIII, não foi positivo tal como se esperava.

A necessidade de continuidade do estudo com mais amostras e a construção de uma base de dados, torna-se importante para o estudo da doença na região de Coimbra.



**Figura 43** – Eletroforese em gel de agarose para os produtos de amplificação por PCR, com as sequências iniciadoras MC1 e MC2 / DNA extraídos de fêmeas: Linha 1 – *P. ariasi*; Linha 2 e 3 – *P. perniciosus*; Linha 4 – *P. ariasi*; Linha 5 – *P. sergenti*; Linha 6 e 7 – *P. perniciosus*; Linha 8 – M01, controle positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linha 9 – M02, controle positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linha 10 – controle negativo (H<sub>2</sub>O); M - marcador HyperLadder™ IV.



**Figura 44** - Eletroforese em gel de agarose para os produtos de amplificação por PCR, com as sequências iniciadoras LITSR/L5.8S / DNA extraídos de fêmeas: Linha 1 – *P. ariasi*; Linha 2 e 3 – *P. perniciosus*; Linha 4 – *P. ariasi*; Linha 5 – *P. sergenti*; Linha 6 e 7 – *P. perniciosus*; Linha 8 – M04, controle positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linha 9 – controle negativo (H<sub>2</sub>O); M - marcador HyperLadder™ IV.

Em relação ao método de análise molecular para a determinação e infeção dos flebótomos, a utilização dos “*primers*” para o kDNA (DNA cinetoplastideal): MC (MC1/MC2) e os “*primers*” rDNA (DNA recombinante): ITS1 são eficazes para a identificação de *L. infantum*, uma vez que houve amplificação no controlo positivo.

A utilização do Red Dye Master Mix, teve como objetivo diminuir as variáveis na PCR e demonstrou ser eficaz na deteção de *L. infantum*. Entretanto, face aos resultados negativos, alguns fatores podem ser melhorados como, por exemplo, o aumento do número de amostras analisadas em laboratório. No presente estudo foi utilizado um número reduzido de flebótomos, devido ao tempo disponível para esta análise.

Além disso, a necessidade de alargar o estudo a todo o Distrito de Coimbra, com a possibilidade de colheitas diárias em vários pontos, a utilização dos flebótomos para análise molecular sem a conservação em álcool o qual pode inibir a amplificação poderia permitir comprovar a endemicidade para a Leishmaniose no Distrito.

A deteção de *Leishmania* spp. em fêmeas no território português já foi reportada [8, 55], porém os dados são antigos, sendo necessário uma atualização.

No ano de 2020, houve a tentativa de um estudo na freguesia de Santo António dos Olivais, que foi descontinuada, em virtude da pandemia pelo SARS-Cov-2/Covid-19, precisamente durante a época de atividade flebotomínica, entre os meses de maio e outubro.



## 4 Conclusões

Este trabalho contribui para o conhecimento sobre a Leishmaniose, como também alerta para a importância da continuidade da pesquisa em Cernache e demais regiões do Distrito de Coimbra, para compreensão e obtenção de dados em relação a esta zoonose. Contudo, analisando o complexo ecológico e relação hospedeiro e vetor, algumas sugestões podem ser tomadas no combate à Leishmaniose:

- a. O uso de vacinas para os animais domésticos, atualmente em Portugal, a vacina comercializada é a CaniLeish®, tomar conhecimento dos melhores horários de passeio, visto que, o flebótomo tem preferência crepuscular.
- b. Neste trabalho, o uso de coleira foi considerado ausente em 99,1% dos casos analisados, sendo valioso o uso deste tipo de proteção no combate à doença, reduzindo a mortalidade dos animais.
- c. Segundo a OMS (2019), o uso de repelente também se torna um aliado no verão, além de proteção não somente contra a leishmaniose humana, mas para outros tipos de doenças.
- d. Para os criadores de animais, sejam eles de interior e exterior (como por exemplo, gaiolas, criadouros de aves em geral e pocilgas) há a necessidade de uso de barreiras verticais com inseticidas que inibam o avanço dos flebótomos.
- e. Cuidados tópicos de ambientes peridomésticos, como limpeza constante, remoção de resíduos fecais de animais, resíduos de vegetais, que potencialmente podem se tornar criadouro dos estádios larvais dos flebótomos, além de uso de inseticida em armazéns.
- f. Conscientização da população sobre a doença, não apenas em clínicas veterinárias, mas estender para a população por meios de veículos digitais e sociais, alertando dos perigos da Leishmaniose, além de informar que não é o cão que transmite a doença.
- g. Um estudo continuado, devido as alterações climáticas e ambientais, os ecossistemas estão em constante adaptação, sendo necessário uma base de dados atualizada para que seja acompanhado o crescimento ou redução dos flebótomos. A preferência alimentar destes pode alterar de acordo com essas variações.



## 5 Referências Bibliográficas

- [1] World Health Organization – WHO (2020), Key facts of Leishmaniasis. Geneva, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Acesso em 2 de abril de 2021).
- [2] P. Desjeux (2004), Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 27(5): 305-18.
- [3] Kupfer B., Vehreschild J., Cornely O., Kaiser R., Plum G., Viazov S., Franzen C., Tillmann R., Simon A., Schildgen O. (2006). Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Núbia. *Emerging Infectious Diseases.* 12(10): 1616-7.
- [4] Basano A.S., Camargo L.M.A. (2004), Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, Vol. 7, nº 3.
- [5] Lainson R. (2010), Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde.* 1(2):13-32.
- [6] Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q., Varela, M.C. (1999). *Parasitologia Veterinária*. 1ª Edição (pp.651-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- [7] Guerra J. A. O. (2009), Leishmaniose Mucosa – Estudo de casos atendidos em um centro de referência em Manaus, Amazonas. Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.
- [8] Branco, S.I.M. (2010), Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de *Leishmania* sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal. Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- [9] Silva, F.S. (2007), Patologia e patogénese da leishmaniose visceral canina, *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, V.1, n.1, p.20.
- [10] Abbiati, T.C., Freitas, D.M., Alves, L.C., Freitas, B.G., Rezende, R.S., Barbosa, S.G., Jorge, A.L.T.A., Santos, S.M., Lopes, M.C., (2019), Leishmaniose visceral canina: relato de caso, Uberaba, Brasil. *PUBVET*, v.13, n.4, a307,p.1-8.

- [11] Esch K. J., Petersen C. A. (2013), Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. Artigo em Clinical Microbiology Reviews. Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- [12] Mans D.R.A., Kent A. D., Ricardo V.P.F., Schaling H.D.F.H. (2017), Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasi on Busi Yasi in Suriname. Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research.
- [13] Kamhawi, S., (2006), Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? – Trends in Parasitology, Vol.22, nº 9.
- [14] Sacks, D.L., (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vectorcompetence. Cell. Microbiol., 3: 189-196.
- [15] Tempone, A.J., Pitaluga, A.N., and Traub-Csekö, Y.M., (2014) Aspectos Moleculares da Interação Flebotomíneo-Leishmania. In: Conceição-Silva, F., and Alves, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, pp. 159-180. ISBN 978-85-7541-568-9
- [16] El Khoury Mansour, C. (2018), Investigação e documentação de flagelados no tubo digestório de flebotomíneos, São Paulo, 87 p.
- [17] Da Silva S, (2007), Avaliação Clínica e Laboratorial de cães naturalmente infetados, submetidos a um protocolo terapêutico em Clínica Veterinária de Belo Horizonte, Tese de Mestrado Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 32-60
- [18] Solano G., (2001), *Leishmania infantum* and dog: immunological and epidemiological studies about infection and disease, Tese Doctoral Facultat de Veterinària – Universitat Autònoma de Barcelona, 1-27;
- [19] Neta, AVC. et al, (2006), Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, Arq.Bras. Med. Vet. Zootec., vol 58, nº4, 480-488
- [20] Killick-Kendrick, R., (1991), *Leishmania*: intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. Ann. Parasitol. Hum. Com., 66: 71-74
- [21] Killick-Kendrick, R., (1999), The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin. Dermatol., 17:279-289

- [22] Killick-Kendrick, R., (1987), Methods for the study of phlebotomine sandflies. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine, 1, W. Peters e R. Killick-Kendrick. Academic Press, Inc. Ltd. (Ed.), London, 473-497.
- [23] Depaquit, J., Léger N., Gantier, J.C., Rioux, J.A., (2001), Phlebotomines of the Isle of Cyprus. III. Species inventory/Inventaire Faunistique. Parasite, 8: 11-20
- [24] Sergent, EDM., Sergent, ET., Parrot, L., Donatien, A., Lestoquard, F., (1933), Revue historique du problème de la transmission des leishmanioses. Bull. Soc. Pathol. Exot., 5:93-98.
- [25] Pinheiro, F.G., (2013), Fauna de Flebotómíneros (Diptera: Psychodidae) e Circulação de Tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em Área de Risco para Leishmaniose Cutânea no Município de São Gabriel da Cachoeira, AM-BR., Universidade Federal do Amazonas/UFAM
- [26] Laurence W. Quate (1964), *Phlebotomus* Sandflies of the Paloich Area in the Sudan (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology. Vol. 1, no. 3: 213-268
- [27] Shimabukuro P., Galati E. (2010), Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Pyschodidae) do estado de São Paulo, Brasil. Artigo Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)
- [28] J. Prudhomme, F. Gunay, N. Rahola, F. Ouanaïmi, S. Guernaoui, A. Boumezzough, A.-L. Bañuls, D. Serteno, B. Alten (2012), Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *Journal of Vector Ecology*. 37: 137-147.
- [29] Dantas F., Otranto D., Tarallo V. (2014), Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sandflies (Diptera: Pyschodidae: Phlebotominae). Artigo Parasites & Vectors
- [30] Artwork by Margo Duncan and Hilda Mufioz, Life cycle of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia diabolica* (Hall). Alamy Images.
- [31] Lewis, D.J., Domoney, C. R., (1966), Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology, 41: 175–179

- [32] Lucientes, J. Castillo, J.A., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., (2005), Flebotomos, de labiología al control. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, Vol. VI, 8: 1-8.
- [33] Lane, R.P., (1993), Sandflies (Phlebotominae). In: R.P. Lane & R.W. Crosskey, ed. Medical Insects and Arachnids., Chapman & Hall, London: 78-119
- [34] Dolmatova, A.V., Demina, N.A., (1971), Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. Initiation - Documentacion technique, Orstom, Paris: 169 pp.
- [35] Alves-Pires, C., Campino, L., Janz, J.G., Afonso, M.O., (2008), Os flebotomos de Portugal. XIV – Os vectores de leishmaniose no foco zoonótico do Sotavento Algarvio. Acta Parasitológica Portuguesa, 15 (1-2): 39-52
- [36] Chelbi, I., Zhioua, E., Hamilton, J.G.C., (2011), Behavioral evidence for the presence of a sex pheromone in male *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol., 48 (3): 518-525.
- [37] Madeira de Carvalho, Luis. (2011), ONLeish Observatório Nacional das Leishmanioses Descrição da LEISHnet – rede de vigilância epidemiológica da LCan. Veterinary Medicine. Veterinary Medicine. 22-26.
- [38] Alexander, B., Maroli, M., (2003), Control of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol., 17: 1-18.
- [39] Feliciangeli, M.D., (2004), Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol., 18: 71-80.
- [40] Kumar, V., Kesari, S.K., Sinha, N.K., Palit, A., Ranjan, A., Kishore, K., Saran, R., Kar, S.K., (1995), Field trial of an ecological approach for the control of *Phlebotomus argentipes* using mud and lime plaster. Indian J. Med. Res., 101: 154-156.
- [41] Kishore, K., (2006), Vector control in leishmaniasis. Indian J. Med. Res. 123: 467-472.
- [42] Amóra, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijó, F.M.C., Alves, N.D., Maciel, M.V. (2009), Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. Neotrop. Entomol., 38 (3): 303-310.
- [43] Santos, M. A.T., Areas, M.A., Reyes, F.G.R., (2007), Piretróides – Uma visão geral. Alimentos e Nutrição, v.18, n.3, p. 339-349, 2007.

- [44] Müller, G.C., Schlein, Y., (2011). Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. J. Vector Ecol. 36 (Supl.1): 64-70.
- [45] Robert, L. L., Perich, M. J., Schlein, Y., Jacobson, J. L., Wirtz, R. A., Lawyer, P. G., Githure, J. I., (1997), Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide's *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. J. Am. Mosq. Control Assoc. 13: 140-144.
- [46] Wasserberg, G., Poche, R., Miller, D., Chenault, M., Zollner, G., Rowton, E.D., (2011), Imidacloprid as a potential agent for the systemic control of sand flies. J. Vector Ecol., 36 (Supl.1): 148-156.
- [47] Warburg, A., Faiman, R., (2011), Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. J. Vector Ecol., 36 (Supl.1): 10-16.
- [48] Bray, D.P., Alves, G.B., Dorval, M.E., Brazil, R.P., Hamilton, J.G.C., (2010), Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. Parasit. Vectors, 11: 3-16.
- [49] Meira, M., Ferreira, T., (1944), Espèces de Phlébotomes de Lisbonne et de ses environs. An. Inst.Med.Trop, 1: 269- 287.
- [50] Pires, C.A., (1979), Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (Diptera, Psychodidae). Bolm Soc. Port. Ciênc. Nat., 19: 197- 210.
- [51] Pires, C.A., (1984), Les phlébotomes du Portugal I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). Ann. Parasitol. Hum.Comp. 59 (5): 521-524.
- [52] Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L., (2010), Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. Vet. Parasitol., 3-4: 336-340.
- [53] Miró G. & R. Molina, (2006), Leishmaniose canina: Manejo clínico y situación actual en España. Spain: Bayer Health Care; 2006.
- [54] Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L., Abranches, P., (1991), Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus*

*ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 66 (1): 47-48.

[55] Pires, C.A., (2000), Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 228 pp.

[56] Baptista, S., Afonso, M.O., Casimiro, E., Campino, L., Ready, R.P., Alves-Pires, C., (2007), Spatial distribution of *Leishmania* sand fly vectors in Portugal: risk areas, climate changes and impacts on tourism. International Conference on Climate Change Impacts on Tourism (CLITOP), 7-8 Setembro, Lisboa, Portugal. Abstract book.

[57] Pereira, M., Afonso, M.O., Machado, M., Sousa, M.C., (2009), Entomological survey of phlebotomine sand flies in a focus of visceral leishmaniasis in a regional centre of Portugal (Coimbra municipality). ESCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16-19 May. Abstract book: S263.

[58] França, C., (1913), *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. Bull. Soc. Pathol. Exotique, 6: 123-124.

[59] Azevedo, J.F., Teixeira, A.W.G., (1946), Sobre as preferências hemáticas das espécies portuguesas de *Phlebotomus*. An. Inst. Med. Trop, 3: 159-181.

[60] Ferreira, F.C., Ferreira, T.G., (1944), Sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. An. Inst. Med. Trop, 1: 289-313.

[61] Alves-Pires, C., Afonso, M.O., Janz, J.G., Semião-Santos, S.J., (2004), The phlebotomine sand flies of Portugal. XII. The phlebotomine of the Évora leishmaniasis focus (1999-2000). Acta Parasitológica Portuguesa, 11 (1-2): 41-45.

[62] Semião-Santos, S.J., Harith, A.E., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C.A., Gusmão, R., (1995), Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. Parasitol. Research, 81: 235-239.

[63] Schrey, C., Pires, C., Macvean, D., (1989), Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. Med. Vet. Entomol., 3: 125-30.

[64] Amaro, F.I.F., (2010), Phlebovirus, importância em Saúde Pública em Portugal. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa: 202 pp.



- [65] Mendonça, J., (2011), Risco de introdução de novas espécies de *Leishmania* na região do Algarve. Tese de Mestrado, UNL, IHMT: 79 pp.
- [66] Maia, C., Afonso, M.O., Cristóvão, J., Branco, S., Mendonça, J., Freitas, F.B., Almeida, A.P., Campino, L., (2011), Phlebotomine survey in the Algarve Region, Portugal 2009-2010. ISOPS 7, International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Kusadisi, Turkey, 25-30 April. Abstract book: 190.
- [67] Alexander, B., (2000), Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, 14: 109-122.
- [68] Munstermann, L.E., (2004), Chapter 12: Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: W.C. Marquardt, ed. *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, Burlington M.A., U.S.A.: 127-140.
- [69] Hashiguchi Y., Gomez E. A. L., (1991), A review of leishmaniasis in Ecuador. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 25: 64-76
- [70] Schallig H. D., Oskam L., (2002), Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health*, 7: 641-651.
- [71] Maia C. (2008), *Interacção Parasita-Hospedeiro e susceptibilidade de Leishmania infantum a fármacos*. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Tese de Doutoramento. 301 pp.
- [72] Saraiva, L., Andrade-Filho, J.D., Silva, S.O., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., (2010), The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105 (8): 1033-1039.
- [73] Pordata, Base de Dados Portugal Contemporâneo, (2021). <https://www.pordata.pt/Home> (Acesso em 1 de maio de 2021).
- [74] Tavares, A. O., Cunha, L. (2004). Espaços de planeamento no concelho de Coimbra. A importância das variáveis biofísicas, demográficas e sociais. *Cadernos de Geografia*, nº 21/23, 2002-2004, Coimbra, Faculdade de Letras, pp. 241-254.

- [75] Cruz, M. P., & Revez, A. L. (2011). Cernache, os Moinhos, sua História, sua Gente (1ª ed.). Junta de Freguesia de Cernache.
- [76] Portal do Clima – Alterações Climáticas em Portugal. Instituto Português do Mar e da Atmosfera, (2021). <http://portaldoclima.pt/pt/> (Acesso em 8 de maio de 2021)
- [77] ICNF, (2019). IFN6 – Anexo Técnico. [pdf], 31 pp, versão 1.0 Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, Lisboa
- [78] Guia de Campo, Dia B (2010), Dia Internacional da Biodiversidade. [pdf], Universidade de Lisboa, Museu Nacional de História Natural e Centro de Biologia Ambiental
- [79] Seccombe, A.K., Ready, P.D., Huddleston, L.M., (1993) A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), 8:1-57
- [80] Depaquit, J., Léger, N., Killick-Kendrick, R., (1998b). Description de *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) riouxi n.sp. (Diptera, Psychodidae) d'Afrique du Nord. Parasite, 5 (2): 151-158.
- [81] Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., (1998a). The taxonomic status of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917, vector of *Leishmania tropica* (Wright, 1903) and *Phlebotomus similis* Perfiliev, 1963 (Diptera - Psychodidae). Morphologic and morphometric approaches. Biogeographical and epidemiological corollaries. Bull. Soc. Pathol. Exot, 91(4): 346-352.
- [82] Ghrab, J., Rhaim, A., Bach Hamba, D., Aoun, K., Bouratbine A., 2005. *Phlebotomus* (*Larroussius*) *langeroni* Nitzulescu, 1930, en Tunisie : présence de la femelle et actualisation de la distribution géographique. Bull. Soc. Pathol. Exot. 98 (5): 411-412
- [83] Kakarsulemankhel, J. K., (2009). Taxonomic review of sand flies of the subgenus *Phlebotomus* Rondani and Berte (Diptera, Psychodidae). Pakistan Entomologist, 31 (2): 71-91.
- [84] Kakarsulemankhel, J. K., (2010). Taxonomic review of sand flies of the subgenus *Paraphlebotomus* Theodor (Diptera, Psychodidae). Pakistan Entomologist, 32 (2): 125-147.
- [85] Pereira-Chioccola, V. L., (2009). Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. Bepa, 6(68):4-13.

- [86] Escobar, T. A., (2015). Presença de *Leishmania* spp em equinos de zona urbana de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. 62 p.
- [87] Maroli, M., Jalouk, L., Al-Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C., Gradoni, L., (2009). Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria. *Med.Vet. Entomol.*, 23(2): 148-154.
- [88] Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105(2): 158-65.
- [89] França, C., (1913). *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 6: 123-124.
- [90] De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.*, 32 (3): 229-233.
- [91] D'Urso, V., Ruta, F., Khoury, C., Bianchi, R., Depaquit, J., Maroli, M., (2004). About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. *Parasite*, 11: 279-283.





# Anexos

## Anexo 1 – Ficha de Campo

Nova Versão - FLEBÓTOMOS - Ficha de Campo de Felipe Melo Machado, Mestrado em Ecologia, UC (adaptado de Pires, 2000) - Guia Estatístico

### FLEBÓTOMOS - Ficha de Campo

Biótopo n° \_\_\_\_\_

#### 1 – LOCALIZAÇÃO \_\_\_\_\_

Distrito de: \_\_\_\_\_ ; Concelho de: \_\_\_\_\_

Latitude: \_\_\_\_\_

Longitude: \_\_\_\_\_

Altitude: \_\_\_\_\_

#### 2 – TIPO DE FORMAÇÃO SUPERFICIAL \_\_\_\_\_

a. Solo calcário \_\_\_\_\_

b. Solo arenoso \_\_\_\_\_

c. Solo argiloso \_\_\_\_\_

d. Solo terroso \_\_\_\_\_

e. Outros \_\_\_\_\_

#### 3 – CARACTERÍSTICAS FITOGEOGRÁFICAS \_\_\_\_\_

a. Videira \_\_\_\_\_

f. Eucalipto \_\_\_\_\_

b. Oliveira \_\_\_\_\_

g. Fruteira \_\_\_\_\_

c. Carvalho \_\_\_\_\_

h. Horta familiar \_\_\_\_\_

d. Figueira \_\_\_\_\_

i. Cultura cerealífera \_\_\_\_\_

e. Pinheiro \_\_\_\_\_

j. Outros: \_\_\_\_\_

#### 4 – LOCAL DE CAPTURA \_\_\_\_\_

a. Casa = interior \_\_\_\_\_ / exterior \_\_\_\_\_

b. Abrigo animal: \_\_\_\_\_ = interior \_\_\_\_\_ / exterior \_\_\_\_\_

c. Abrigo artificial \_\_\_\_\_

d. Buraco nas rochas \_\_\_\_\_

e. Parede/Muro \_\_\_\_\_

f. Gruta \_\_\_\_\_

g. Outros: \_\_\_\_\_

#### 5 – ANIMAIS EXISTENTES/QUANTIDADE \_\_\_\_\_

a. Cão / n° \_\_\_\_\_

e. Bovinos \_\_\_\_\_

b. Gato / n° \_\_\_\_\_

f. Ovinos \_\_\_\_\_

c. Aves / n° \_\_\_\_\_

g. Outros animais domésticos / n° \_\_\_\_\_

d. Coelho / n° \_\_\_\_\_

h. Animais selvagens? Quais? \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_

#### 6 – PRESENÇA/AUSÊNCIA DE COLEIRAS INSECTICIDAS EM CÃES \_\_\_\_\_

a. Sem coleira \_\_\_\_\_

b. Com coleira / marca \_\_\_\_\_

#### 7 – HUMIDADE APARENTE \_\_\_\_\_

a. Seco \_\_\_\_\_

c. Húmido \_\_\_\_\_

b. Semi-húmido \_\_\_\_\_ d. Muito húmido \_\_\_\_\_

8 – TEMPERATURA \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ °C

9 – PRESENÇA DE VENTO \_\_\_\_\_

a. Com vento \_\_\_\_\_

b. Sem vento \_\_\_\_\_

9.1 – PRESENÇA DE CHUVA \_\_\_\_\_

a. Com chuva \_\_\_\_\_

b. Sem chuva \_\_\_\_\_

10 – TIPO DE CAPTURA \_\_\_\_\_

a. Armadilha CDC (n° \_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

b. Aspirador eléctrico (\_\_\_\_\_ m) \_\_\_\_\_

c. Outros: \_\_\_\_\_

11 – CAPTURA \_\_\_\_\_

a. Data: \_\_\_\_\_ Horário da montagem: \_\_\_\_\_ Horário da colheita: \_\_\_\_\_

b. Duração da captura (horas): \_\_\_\_\_

12 – ESPÉCIES ENCONTRADAS (IDENTIFICAÇÃO EM LABORATÓRIO) \_\_\_\_\_

| Espécies               | Macho | Fêmea | Alimentadas | Grávidas | TOTAL |
|------------------------|-------|-------|-------------|----------|-------|
| <i>P. ariasi</i>       |       |       |             |          |       |
| <i>P. papatasi</i>     |       |       |             |          |       |
| <i>P. peniculousus</i> |       |       |             |          |       |
| <i>P. sergenti</i>     |       |       |             |          |       |
| <i>S. minuta</i>       |       |       |             |          |       |
|                        |       |       |             |          |       |
|                        |       |       |             |          |       |
| TOTAL                  |       |       |             |          |       |

13 – ICONOGRAFIA \_\_\_\_\_

Foto n°: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

14 – COLECTOR \_\_\_\_\_

15 – DESCRIÇÃO / OBSERVAÇÕES

---

---

---

---

## Anexo 2 – Folheto de Divulgação

Exemplo de Folheto montado por Felipe Melo Machado: Frente/Verso

**O VERÃO CHEGOU!**

Com ele, aparecem os insectos!

**Sabem** que a **Leishmaniose** é uma doença transmitida por pequenos insectos que infetam as células de cães e de outros mamíferos (como o homem)?

Um cão ou gato saudável podem ser infectados ao ser mordido por um insecto transmissor da doença.

A Leishmaniose é transmitida por um insecto muito pequeno, denominado “moscas da areia” e o agente da doença é um protozoário do género *Leishmania*

Mosca da areia    *Leishmania*

Caso seu cão ou gato apresentem sintomas como perda de peso, febre, lesões nas mucosas, olhos irritados e vermelhos, nódulos na pele e /ou diarreia, leve-o imediatamente ao médico veterinário

Mas espera... eu também posso ficar doente?

Se sentir os sintomas como lesão das mucosas da boca, nariz, lesões na pele por alguma mordida, febre, perda de peso, cefaleia e /ou inchaço na região da barriga, deverá procurar com urgência os serviços de saúde mais próximos.

O seu cão ou gato **NÃO** transmitem a doença, mas sim os insectos. Afinal eles são seus melhores companheiros e amigos

NEMAT CFCR FOR FUNCTIONAL ECOLOGY dcv.uc 1 2 9 0 UNIVERSIDADE D COIMBRA



