

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Pedro Henrique Cotrin Rodrigues

Modulação das vias do sistema complemento e da coagulação de
Chrysocyon brachyurus (Illiger, 1815) e mamíferos domésticos pelas glândulas
salivares e intestino de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae)

Belo Horizonte
2026

Pedro Henrique Cotrin Rodrigues

Modulação das vias do sistema complemento e da coagulação de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) e mamíferos domésticos pelas glândulas salivares e intestino de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Coorientadores: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo e Dr. Adalberto Alves Pereira Filho

**Belo Horizonte
2026**

R696m Rodrigues, Pedro Henrique Cotrin, 1997 -
Modulação das vias do sistema complemento e da coagulação de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) e mamíferos domésticos pelas glândulas salivares e intestino de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) /Pedro Henrique Cotrin Rodrigues.-2026.
88 f: il.

Orientadora: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Coorientadores: Ricardo Nascimento Araújo
Adalberto Alves Pereira Filho

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Animal.

Referências bibliográficas: f. 64 – 85.

1. Parasitologia - Teses – 2. Animais selvagens - Teses – 3. Cão – Teses – 4. Hematose - Teses - I. Araújo, Ricardo Nascimento - II. Filho, Adalberto Alves Pereira – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 639

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

PEDRO HENRIQUE COTRIN RODRIGUES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**Modulação das vias do sistema complemento e da coagulação de Chrysocyon brachyurus (Illiger, 1815) e mamíferos domésticos pelas glândulas salivares e intestino de Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera: Pulicidae)**"

Aprovado(a) em 11 de fevereiro de 2026, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Julia Angelica Goncalves da Silveira - Orientador(a)

Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme

Dr.(a). Daniel Avelar

Dr.(a) Adalberto Alves Pereira Filho



Documento assinado eletronicamente por **Julia Angelica Goncalves da Silveira, Professora do Magistério Superior**, em 12/02/2026, às 08:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Moreira de Avelar, Usuário Externo**, em 12/02/2026, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adalberto Alves Pereira Filho, Professor Magistério Superior-Substituto**, em 13/02/2026, às 06:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Presidente**, em 13/02/2026, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4945804** e o código CRC **9423ECAE**.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma forma de expressão seria suficiente para agradecer a todos que, de alguma maneira, contribuíram para que eu alcançasse a posição em que hoje ocupo.

À minha mãe, Isabel, pelo amor incondicional e pela força inspiradora, além de incentivo aos estudos e por acreditar no meu potencial em todas as etapas desta caminhada. Aos demais familiares e amigos, deixo meu mais sincero agradecimento pelo apoio e vibrações positivas que tornaram esta conquista possível.

A professora e orientadora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, por ter enxergado meu potencial desde o período da residência. Agradeço pelo acolhimento, por sempre estar aberta ao diálogo e pela sensibilidade e cuidado em suas palavras. Você é minha inspiração profissional e um exemplo de liderança. Obrigado pela brilhante orientação.

Agradeço ao Laboratório de Protozoologia Veterinária, por ter sido minha segunda casa, e a toda a equipe, por ter se tornado minha segunda família. A companhia de vocês, especialmente nos momentos do café, tornou essa jornada mais leve. Sou profundamente grato por ter tido o privilégio de compartilhar este percurso acadêmico com pessoas dispostas a ensinar e trocar conhecimentos. Agradeço em especial ao João Paulo, pelo apoio constante nos momentos mais desafiadores para além da vida acadêmica.

Agradeço também ao Laboratório de Artrópodes Hematófagos, em especial ao Adalberto Alves Pereira Filho e ao professor Ricardo Nascimento Araújo. Obrigado por ampliarem os meus conhecimentos e por embarcar nessa pesquisa. Sem a colaboração e expertise de vocês, nada disso teria sido possível. Estendo meus agradecimentos a professora Camila Stefanie Fonseca de Oliveira, pela dedicação no auxílio das análises estatísticas.

Agradeço a todos que contribuíram na árdua tarefa de coletar pulgas, assim como aos que gentilmente me presentearam com exemplares para este estudo. Nesse quesito, agradeço em especial a aluna de iniciação científica Júlia Pires, pela dedicação e proatividade.

Agradeço aos profissionais da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte - FPMZB, bem como à Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária, pela parceria institucional e abertura do espaço, além da disponibilização de amostras essenciais na elaboração do projeto.

Agradeço também aos membros da banca, Daniel de Avelar e Fabíola Paes Leme, bem como os suplentes Camila Bastos e Lucas Belchior pelo aceite e disponibilidade de tempo para as considerações e contribuições na melhoria deste trabalho.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, à UFMG e a todos os docentes que contribuíram para minha formação durante este período.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para otimizar minha rotina, possibilitando maior dedicação à pesquisa.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), canídeo de ampla distribuição na América do Sul, enfrenta severas pressões antrópicas decorrentes da perda e fragmentação de habitat. A crescente circulação em ambientes antropizados intensifica o contato com animais domésticos e seus ectoparasitos, como as pulgas do gênero *Ctenocephalides*, para os quais a espécie apresenta maior suscetibilidade. Além disso, pouco se sabe sobre o processo de interação dessa espécie de pulga com canídeos silvestres. Artrópodes hematófagos, de modo geral, desenvolveram múltiplas estratégias adaptativas e evolutivas para o sucesso alimentar. Dentre elas, destacam-se a capacidade de modular mecanismos hemostáticos e imunológicos do hospedeiro, incluindo vasoconstrição, agregação plaquetária, coagulação sanguínea e ativação do sistema complemento, por meio de biomoléculas presentes na saliva e/ou no intestino médio. Considerando esse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar e comparar as interações entre extratos de glândulas salivares (EGS) e intestinais (EI) de *Ctenocephalides felis felis* sobre a coagulação sanguínea e as vias clássica e alternativa do sistema complemento de lobo-guará (*C. brachyurus*), cão (*Canis familiaris*) e gato (*Felis catus*). EGS e EI foram obtidos a partir da dissecação de pulgas *C. felis felis*, sendo posteriormente incubados com soro ou plasma de seus hospedeiros e analisados por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os resultados demonstraram que os EGS apresentaram atividade anticoagulante, prolongando em 53% o tempo de coagulação em cão, 35,5% em lobo-guará e 37% em gato, porém os EI não apresentaram atividade anticoagulante significativa. Em contrapartida, os EI demonstraram capacidade de inibir a via clássica, ao passo que os EGS não apresentaram atividade detectável. A inibição alcançou $63,7 \pm 5,8\%$ para cão, $30,3 \pm 12,1\%$ para lobo-guará e $20,7 \pm 1,5\%$ para gato. Nenhuma das amostras avaliadas interferiu na via alternativa do sistema complemento. As análises estatísticas não indicaram diferenças significativas entre os hospedeiros quanto à capacidade anticoagulante e anti-complemento dos extratos testados ($p > 0,05$). Esses achados contribuem para o entendimento das interações imuno-ecológicas, preenchendo lacunas sobre as dinâmicas parasito-hospedeiro, além de fornecer subsídios para ações de manejo e conservação do lobo-guará.

Palavras-chaves: Hematofagia, hemostasia; imunomodulação; pulga; lobo-guará; cão; gato.

ABSTRACT

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), a canid with a wide distribution in South America, faces severe anthropogenic pressures resulting from habitat loss and fragmentation. Increasing circulation through anthropized environments intensifies contact with domestic animals and their ectoparasites, such as fleas of the genus *Ctenocephalides*, to which this species appears to be more susceptible. Moreover, little is known about the interaction process between this flea species and wild canids. Hematophagous arthropods, in general, have developed multiple adaptive and evolutionary strategies to ensure feeding success. Among these strategies is the ability to modulate host hemostatic and immunological mechanisms, including vasoconstriction, platelet aggregation, blood coagulation, and activation of the complement system, through biomolecules present in the saliva and/or midgut. In this context, the present study aimed to investigate and compare the interactions of salivary gland extracts (SGE) and intestinal extracts (IE) of *Ctenocephalides felis felis* on blood coagulation and the classical and alternative complement pathways of the maned wolf (*C. brachyurus*), dog (*Canis familiaris*), and cat (*Felis catus*). SGE and IE were obtained from the dissection of *C. felis felis* fleas and subsequently incubated with host serum or plasma, followed by analysis using immunoenzymatic assays (ELISA). The results demonstrated that SGE exhibited anticoagulant activity, prolonging clotting time by 53% in dogs, 35.5% in maned wolves, and 37% in cats, whereas IE showed no significant anticoagulant activity. In contrast, IE demonstrated the ability to inhibit the classical complement pathway, whereas SGE showed no detectable activity. Inhibition reached $63.7 \pm 5.8\%$ in dogs, $30.3 \pm 12.1\%$ in maned wolves, and $20.7 \pm 1.5\%$ in cats. None of the evaluated samples interfered with the alternative complement pathway. Statistical analyses revealed no significant differences among hosts regarding the anticoagulant and anti-complement activities of the tested extracts ($p > 0.05$). These findings contribute to a better understanding of immuno-ecological interactions, filling gaps in parasite–host dynamics and providing valuable insights to support management and conservation strategies for the maned wolf.

Key-words: Hematophagy; hemostasis; immunomodulation; flea; maned wolf; dog; cat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais ectoparasitos registrados em canídeos silvestres provenientes de diferentes contextos ecológicos, evidenciando indivíduos oriundos de áreas antropizadas (esquerda) e de ambiente florestal (direita).	19
Figura 2: Diferenças morfológicas entre <i>C. felis felis</i> (I) e <i>C. canis</i> (II).	21
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Ctenocephalides</i> spp.	23
Figura 4: Representação da cascata de coagulação contemplando as três vias (intrínseca, extrínseca e comum).	32
Figura 5: Fluxograma da cascata de eventos do sistema complemento, contemplando as três vias	34
Figura 6: Espécime de pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> após a dissecação.....	39
Figura 7: Efeito dos extratos de 15 glândulas salivares de <i>C. felis felis</i> sobre o tempo de coagulação do plasma de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C)	47
Figura 8: Efeito dos extratos de três intestinos de <i>C. felis felis</i> sobre o tempo de coagulação do plasma de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C)	48
Figura 9: Padronização das concentrações séricas de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C) com base na hemólise de eritrócitos de ovelhas mediada pela via clássica do sistema complemento para cada espécie	49
Figura 10: Padronização das concentrações séricas de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C) com base na hemólise de eritrócitos de coelhos mediada pela via alternativa do sistema complemento	50
Figura 11: Efeito dos extratos de glândulas salivares e intestinais de <i>C. felis felis</i> na via clássica do sistema complemento em cão (A), lobo-guará (B) e gato (C)	52
Figura 12: Efeito dos extratos de glândulas salivares e intestinais de <i>C. felis felis</i> na via alternativa do sistema complemento em cão (A), lobo-guará (B) e gato (C)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios anticoagulante, por hospedeiro, considerando um único ensaio.....	41
Tabela 2: Volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios hemolíticos da via clássica e alternativa, por hospedeiro, considerando um único ensaio.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNA	Controle negativo adicional
DAPE	Dermatite alérgica à picada de ectoparasitos
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGS	Extrato de glândulas salivares
EI	Extratos intestinais
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EV	Escola de veterinária
FPMZB-BH	Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte
FvW	Fator de von Willebrand
HT	Hemólise total
ID	Identificação
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza
MAC	Complexo de ataque à membrana
MBL	Lectina ligante de manose
mRNA	RNA mensageiro
NT	<i>Near Threatened</i>
PAMPs	Padrões moleculares conservados
PAN	Plano de Ação Nacional
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PF-3	Fosfolipídios plaquetários
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VA	Via alternativa
VC	Via clássica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral.....	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1.	Aspectos ecológicos e ameaças à conservação do lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i> , Illiger, 1815).....	14
3.2.	Ectoparasitofauna em canídeos silvestres.....	17
3.3.	Pulgas.....	19
3.3.1.	O gênero <i>Ctenocephalides</i>	20
3.3.2.	<i>Ctenocephalides felis felis</i> como agente infestante	24
3.3.3.	Infestações em hospedeiros não preferenciais.....	25
3.3.4.	<i>Ctenocephalides felis felis</i> como vetor de agentes patogênicos.....	27
3.3.5.	Medidas preventivas e de controle	27
3.4.	A hemostasia e seus mecanismos regulatórios	29
3.4.1.	A cascata de coagulação.....	30
3.5.	O sistema complemento	32
3.6.	Mecanismos anti-hemostáticos e imunomodulatórios de artrópodes hematófagos	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1.	Ética e permissões.....	37
4.2.	Coleta e manutenção das pulgas.....	38
4.3.	Obtenção de extratos de glândulas salivares (EGS) e extratos intestinais (EI) de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	38
4.4.	Obtenção de soro e plasma do Lobo-guará (<i>C. brachyurus</i>)	39
4.5.	Obtenção de soro e plasma de cães e gatos.....	40
4.6.	Ensaio anticoagulante.....	40
4.7.	Ensaio hemolíticos anti-complemento.....	41
4.7.1.	Obtenção e preparação das hemácias de carneiro	41
4.7.2.	Obtenção e preparação das hemácias de coelho.....	42
4.7.3.	Padronização da proporção de soro usada nos ensaios de hemólise	43
4.7.4.	Ensaio hemolíticos da via clássica.....	44
4.7.5.	Ensaio hemolíticos da via alternativa.....	45
4.8.	Análises estatísticas.....	45
5.	RESULTADOS	46
6.	DISCUSSÃO	53
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
8.	CONCLUSÕES	63
9.	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), maior canídeo da América do Sul, tem sua distribuição concentrada nos biomas Cerrado e Pampa, embora haja registros esporádicos em áreas do Pantanal e em zonas de transição entre o Cerrado e a Caatinga/Amazônia/Mata Atlântica (Dietz, 1985; Paula e DeMatteo, 2013; 2015; Silva-Diogo *et al.*, 2020). Apesar da ampla distribuição, a espécie enfrenta pressões antrópicas severas, principalmente devido à perda, fragmentação e alteração de habitat, o que favorece sua ocorrência em áreas antropizadas e zonas de borda de unidades de conservação (Paula *et al.*, 2008; 2013; Spencoski *et al.*, 2012; Paula *et al.*, 2013). Esses fatores, somados à caça, conflitos com humanos, atropelamentos e doenças, contribuem para sua classificação atual como “quase ameaçada” (NT) pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), demandando esforços contínuos para sua conservação (Paula e DeMatteo, 2015).

A aproximação de canídeos silvestres a ambientes antropizados favorece o aumento das interações com os animais domésticos, elevando o risco de transmissão de parasitos e patógenos (Daszak *et al.*, 2000; Curi *et al.*, 2010). Nesse contexto, destaca-se a crescente ocorrência da pulga *Ctenocephalides felis felis*, frequentemente associada a animais domésticos, mas cada vez mais registrada parasitando a fauna silvestre (Clark *et al.*, 2018; Riner *et al.*, 2018; Shultz *et al.*, 2023; Sidhoum *et al.*, 2023; Teixeira *et al.*, 2023).

A infestação por *C. felis felis* tem impactos diretos e indiretos sobre seus hospedeiros (Linardi e Guimarães, 2000). Além de atuar como vetor de agentes patogênicos, como *Rickettsia* (Macaluso *et al.*, 2008), *Bartonella henselae* (Sepúlveda-García *et al.*, 2023) e *Yersinia pestis* (Barbieri *et al.*, 2020), e como hospedeiro intermediário no ciclo de transmissão de *Acanthocheilonema reconditum* (Duarte *et al.*, 2025) e *Dipylidium caninum* (Beugnet *et al.*, 2014), está também associada a quadros de dermatite alérgica à picada de ectoparasitos (DAPE) e, em casos de infestações severas, a ocorrência de anemia e óbito (Carlotti e Jacobs, 2000; Contreras *et al.*, 2018; Moore *et al.*, 2024). O sucesso da hematofagia das pulgas depende de adaptações morfológicas e bioquímicas, especialmente pela ação de biomoléculas salivares, que neutralizam os mecanismos de defesa do hospedeiro e facilitam a ingestão de sangue (Fontaine *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2023; Danchenko e Macaluso, 2024). Apesar dos avanços na caracterização das proteínas salivares de

C. felis felis, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos dessas biomoléculas na modulação da resposta imune dos hospedeiros.

Dentre os mecanismos de defesa do hospedeiro, o sistema complemento se destaca como uma das primeiras barreiras contra agentes invasores (Farries e Atkinson, 1991; Dunkelberger e Song, 2010) e sua ativação representa um risco direto para o próprio artrópode, uma vez que limita o repasto sanguíneo e aumenta a probabilidade de danos teciduais, especialmente no intestino (Khattab *et al.*, 2015; Saab *et al.*, 2020). Assim, muitos artrópodes hematófagos desenvolveram inibidores de complemento nas glândulas salivares e no intestino, como estratégia para garantir sua alimentação e integridade tecidual, permitindo a continuidade do seu ciclo evolutivo (Sant'Anna *et al.*, 2024).

A puliciose constitui um problema significativo para diversos mamíferos silvestres cativos (Costa *et al.*, 2019; Cermolacce *et al.*, 2023; Teixeira *et al.*, 2023), com registros de óbitos atribuídos à alta infestação (Yeruham *et al.*, 1989; Szabó *et al.*, 2000). Em lobos-guará cativos, há um histórico de queixas de médicos veterinários de perda de indivíduos em decorrência de infestações por *C. felis*, frequentemente associadas a quadros de anemia intensa (comunicação pessoal: Fundação de parques municipais e zoobotânica de Belo Horizonte e Plano de ação nacional para a conservação dos canídeos silvestres). Cubas *et al.* (2007) abordaram de forma sucinta a gravidade da puliciose em canídeos silvestres, porém, poucos são os relatos de óbito documentados na literatura, como o de Maia e Gouveia (2002). Apesar disso, os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta de hipersensibilidade desses animais à puliciose e a relação parasito hospedeiro ainda permanecem pouco compreendidos.

Visto a importância da conservação, a vulnerabilidade da espécie e a severidade do parasitismo nesses indivíduos, o presente estudo tem como objetivo investigar, de forma comparativa, as interações das glândulas salivares e intestino da pulga *C. felis felis* na modulação da cascata de coagulação e sistema complemento dos lobos-guará, cães e gatos domésticos, hospedeiros preferenciais desse pulcideo, além de determinar a influência dessas interações no desempenho alimentar do artrópode.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito dos extratos de glândulas salivares e intestinais da pulga *Ctenocephalides felis felis* na coagulação e modulação imunológica do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cão (*Canis familiaris*) e gato (*Felis catus*).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de extratos de glândulas salivares e intestino de *C. felis felis* sobre o tempo de coagulação do plasma de lobo-guará, cão e gato doméstico;
- Padronizar o volume de soro de lobo-guará, cão e gato doméstico nos ensaios hemolíticos para obtenção de 80–90% de hemólise nas vias clássica e alternativa do sistema complemento;
- Determinar a capacidade inibitória dos extratos de glândulas salivares e intestino de *C. felis felis* sobre as vias clássica e alternativa do sistema complemento do lobo-guará, cão e gato doméstico;
- Comparar a modulação exercida por *C. felis felis* sobre o sistema complemento e a cascata de coagulação entre lobo-guará, cão e gato doméstico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos ecológicos e ameaças à conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815)

Pertencente ao filo Chordata, classe Mammalia e ordem Carnívora, a família Canidae tem como representantes os cães, lobos, raposas, chacais e coiotes. Até o presente momento, já foram catalogadas 36 espécies distribuídas pelo mundo, cada qual com suas particularidades (Bueno e Motta-Junior, 2004; ICMBio, 2020). No Brasil, seis espécies da família estão presentes: a raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o cachorro-do-mato-de-orelha-curta (*Atelocynus microtis*), o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Reis *et al.*, 2006; ICMBio, 2020).

O lobo-guará (*C. brachyurus*) é o maior canídeo selvagem neotropical do continente sul-americano e se distribui do nordeste do Brasil até o norte do Uruguai (Dietz, 1985; Rumiz e Sainz, 2002; Queirolo *et al.*, 2011; Paula e DeMatteo, 2015),

onde habita predominantemente os biomas do Cerrado e Pampa, embora haja registros esporádicos em áreas do Pantanal e em zonas de transição entre o Cerrado e a Caatinga/Amazônia/Mata Atlântica (Paula *et al.*, 2013; 2015; Silva-Diogo *et al.*, 2020). Esse canídeo é reconhecido como uma espécie guarda-chuva e considerado um dos principais símbolos da fauna do Cerrado. Seu papel ecológico é fundamental na manutenção da dinâmica dos ecossistemas por meio da dispersão de sementes (principalmente lobeira, *Solanum lycocarpum*) (Santos, 1999), regulação de populações de presas e influência na estrutura da comunidade de pequenos vertebrados (Terborgh *et al.*, 2008; Quintela *et al.*, 2020). Com hábito alimentar onívoro e diversificado, sua dieta é composta por frutos, artrópodes e pequenos vertebrados, como roedores, marsupiais, tatus, aves e répteis. No entanto, há registros brasileiros recentes de predação de presas maiores, como a ema (*Rhea americana*) (Meniz *et al.*, 2025). Embora a frequência de itens vegetais e animais encontrados nas amostras fecais seja semelhante, a biomassa consumida é majoritariamente de origem animal (Bueno e Motta-Júnior, 2004; Motta-Júnior *et al.*, 2014). Além disso, sua dinâmica alimentar sofre variações sazonais e geográficas, de acordo com a disponibilidade de alimento (Motta-Junior *et al.*, 1996; Motta-Junior, 1997; Motta-Junior e Martins, 2002; Vynne *et al.*, 2011).

Do ponto de vista comportamental, o lobo-guará apresenta hábito predominantemente solitário, sendo observado em pares apenas durante o período reprodutivo (agosto a outubro no hemisfério sul), estendendo-se até os primeiros meses de vida da prole (Dietz, 1984; 1985; Paula *et al.*, 2013). A gestação possui duração de 60-65 dias, resultando no nascimento de dois a cinco filhotes (Rodrigues, 2002), que são amamentados até cerca de quatro meses de vida. A partir do terceiro mês, passam a acompanhar a mãe em suas atividades de caça onde, durante esse período, são alimentados por regurgitação até aproximadamente dez meses. A maturidade sexual é geralmente alcançada por volta de um ano de idade, marcando o fim da dependência parental e o início da vida independente (Rodden *et al.*, 2008).

A espécie é territorialista, utilizando marcação odorífera com urina e fezes para demarcar território e evidenciar sua presença. A vocalização também é utilizada na marcação de território, além de auxiliar na comunicação entre casais e na interação com os filhotes (Rodrigues, 2002; Paula *et al.*, 2013). Esses indivíduos apresentam um padrão de atividade crepuscular-noturna, entretanto, estudos indicam que sua atividade sofre influência direta da temperatura e umidade, sendo mais noturnos

durante o período chuvoso e mais diurnos em estações secas e frias, quando as temperaturas noturnas são reduzidas (Rodrigues, 2002; Emmons, 2012).

Esse comportamento é particularmente relevante diante das crescentes pressões ambientais sobre o Cerrado, principal bioma de ocorrência do lobo-guará. Reconhecido como um dos mais importantes *hotspots* de biodiversidade do planeta, o Cerrado encontra-se em uma situação crítica (Paula e DeMatteo, 2013; Strassburg *et al.*, 2017). Apesar de abrigar mais de 4.800 espécies endêmicas de plantas e vertebrados e contribuir significativamente para os recursos hídricos e o sequestro de carbono no Brasil, apenas 19,8% de sua vegetação nativa permanece intacta (Strassburg *et al.*, 2017; Rigui *et al.*, 2023). Nos últimos anos, o bioma tornou-se o principal polo de expansão agropecuária do país, respondendo por quase metade da produção nacional de soja em 2015 (Carneiro-Filho e Costa, 2016). Essa pressão agrícola, somada à frágil proteção legal, com apenas 13% do Cerrado protegido, tem levado a uma taxa de desmatamento 2,5 vezes maior do que a observada na Floresta Amazônica entre 2002 e 2011 (Soterroni *et al.*, 2019; Bastos *et al.*, 2023). Projeções indicam que, caso o cenário atual se mantenha, até 34% da vegetação remanescente do Cerrado poderá ser convertida em monocultura até 2050, o que resultaria na extinção de aproximadamente 480 espécies (Strassburg *et al.*, 2017).

Entre as espécies ameaçadas, inclui-se o lobo-guará (Paula *et al.*, 2015). Estudos estimaram que sua densidade populacional nesse bioma varia entre $3,64 \pm 0,77$ e $5,19 \pm 2,62$ indivíduos por 100 km², refletindo sua relativa dependência dos ambientes abertos e savânicos (Trolle *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2009). No entanto, por ocupar extensas áreas, a espécie é sensível à redução, fragmentação e alteração de habitat (Munguía *et al.*, 2016; Rija *et al.*, 2020). Como consequência, tem-se tornado cada vez mais comum seu registro em regiões antropizadas e nas zonas de amortecimento ou transição de unidades de conservação (Paula *et al.*, 2008; 2013; Sperciski *et al.*, 2012; Paula *et al.*, 2013).

Embora o lobo-guará possua boa capacidade de transitar por habitats antropizados (Jacomio *et al.*, 2009) e aparente adaptação a paisagens alteradas (Trolle *et al.*, 2007; Vynne *et al.*, 2014), sobretudo pela elevada densidade de roedores nesses ambientes (Vynne *et al.*, 2011), há evidências de que a coexistência com áreas alteradas pode ter custos a sua saúde. Estudos comparativos conduzidos por Sperciski *et al.* (2012), por meio de amostragem não invasiva, revelaram uma maior concentração de corticóides fecais excretados por lobos-guará provenientes de áreas

agrícolas, em comparação com indivíduos de reservas protegidas e zonas de transição. Esses achados podem sugerir uma intensificação da atividade adrenal associada ao estresse crônico, condição que pode impactar negativamente a taxa reprodutiva da espécie, no entanto, tais evidências ainda não permitem estabelecer essa relação de forma conclusiva, sendo necessários estudos adicionais, com maior robustez metodológica e amostral, para sua confirmação (Comizzoli *et al.*, 2009; Sperciski *et al.*, 2012).

Além disso, a caça e/ou conflito humano, as doenças infecciosas mediadas pelo contato com animais domésticos e o atropelamento também foram listados pelo Plano de Ação Nacional para Conservação (PAN) dos Canídeos Silvestres como fatores críticos de perda de espécimes (Maia e Gouvea 2002; Paula *et al.*, 2008, 2015; ICMBio, 2025). De acordo com a avaliação mais recente da Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), todos esses fatores contribuem para que o lobo-guará esteja atualmente classificado como "quase ameaçado" (NT – *Near Threatened*) (Paula e DeMatteo, 2015), reforçando a urgência de ações coordenadas de manejo e conservação para garantir a viabilidade populacional da espécie a longo prazo.

3.2. Ectoparasitofauna em canídeos silvestres

De acordo com Gompper (2014), cães domésticos (*Canis familiaris*) figuram entre os principais reservatórios de patógenos em escala global, representando uma ameaça relevante para a conservação da fauna silvestre. Além disso, características ecológicas dos canídeos, como ampla área de distribuição, hábito de forrageamento onívoro e marcação territorial por odor (Paula *et al.*, 2013), favorecem a disseminação de patógenos entre espécies e ambientes. Nesse contexto, o lobo-guará compartilha suscetibilidade com o cão doméstico a diversos agentes infecciosos e ectoparasitos com potencial patogênico, o que pode ser parcialmente explicado por sua estreita relação evolutiva (Curi *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2024).

Considerando esse cenário, canídeos silvestres que transitam por áreas antropizadas e/ou bordas de mata tendem a apresentar maiores infestações por ectoparasitos (Labruna *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2016), resultado do aumento das interações ecológicas, diretas ou indiretas, entre os seres humanos e seus animais domésticos (Daszak *et al.*, 2000; Curi *et al.*, 2010). Situação semelhante pode ser observada em ambientes cativos (Diniz *et al.*, 1999; Gilioli e Silva 2000; Teixeira *et al.*,

2023), especialmente em instituições onde a circulação de ectoparasitos ocorre de forma facilitada. Nesse contexto, o estudo de ectoparasitos em canídeos silvestres pode ser empregado como um importante indicador ambiental, permitindo inferir interações multihospedeiros e multipatógenos em paisagens naturais e antropizadas (Figura 1) (Labruna *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2018).

Como exemplo, observa-se um número crescente de relatos de canídeos silvestres parasitados pela sarna sarcóptica (*Sarcoptes Scabiei*). Fiori *et al.* (2023) detectaram a presença desse ácaro em lobos-guará provenientes do estado de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e, em todos os casos, os indivíduos circulavam por áreas antropizadas. Além disso, Teodoro *et al.* (2018) descreveram o óbito de dois indivíduos de cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) parasitados pelo agente no estado de Minas Gerais, evidenciando a ocorrência da infecção em animais debilitados, embora não tenha sido possível estabelecer relação causal direta entre a positividade e a causa da morte. No entanto, até o momento, a provável fonte de transmissão desse agente no ciclo silvestre permanece desconhecida. Em razão das manifestações clínicas severas observadas, a escabiose tem sido classificada como uma ameaça emergente para canídeos silvestres (Fiori *et al.*, 2025).

Em populações de vida livre, Arrais *et al.* (2021) estudando populações de lobos-guará provenientes do Parque Nacional da Serra da Canastra-MG, detectaram a presença de *Amblyomma tigrinum*, *A. ovale*, *A. brasiliensis* e *A. sculptum*, além de *Rhipicephalus microplus*. A ocorrência concomitante de carrapatos associados a fauna silvestre e doméstica evidencia a sobreposição de habitats e potencial interação entre ambos os grupos. Curi *et al.* (2012) também observaram a infestação por carrapatos *A. sculptum* e *A. tigrinum* em indivíduos de vida livre provenientes de uma reserva cercada por fazendas e pequenos assentamentos humanos, onde há uma elevada densidade de cães domésticos. Nesse mesmo estudo, todos os animais avaliados ($n=15$) estavam parasitados por *A. sculptum*, embora apenas uma única fêmea adulta apresentasse alta carga parasitária.

Em ambientes cativos, os lobos-guará também estão sujeitos à infestação por ectoparasitos compartilhados com animais domésticos, especialmente quando mantidos em instituições situadas em áreas urbanas, onde o contato indireto ou ocasional com esses animais é mais provável. Gilioli e Silva (2000), avaliaram 36 indivíduos mantidos em 11 zoológicos do estado de São Paulo, dos quais 12,5% apresentavam infestações por *R. linnaei* (antigo *R. sanguineus* sensu lato), um

carrapato amplamente distribuído em áreas urbanas e periurbanas que tem o cão como hospedeiro preferencial (Silveira *et al.*, 2009).

Além dos Ixodídeos, a pulga *C. felis felis*, embora associada aos animais domésticos, tem sido cada vez mais documentada em canídeos silvestres (Dobler e Pfeffer, 2011), principalmente em ambientes cativos, onde há registros de óbitos envolvendo o parasitismo como *causa mortis* em lobo-guará (Maia e Gouvea, 2002). No mesmo estudo que avaliou os carrapatos, Gilioli e Silva (2000) detectaram que 56,2% (9/16) dos lobos-guará examinados estavam infestados por *C. felis felis*, sendo essa a espécie de ectoparasito mais prevalente entre os indivíduos analisados.

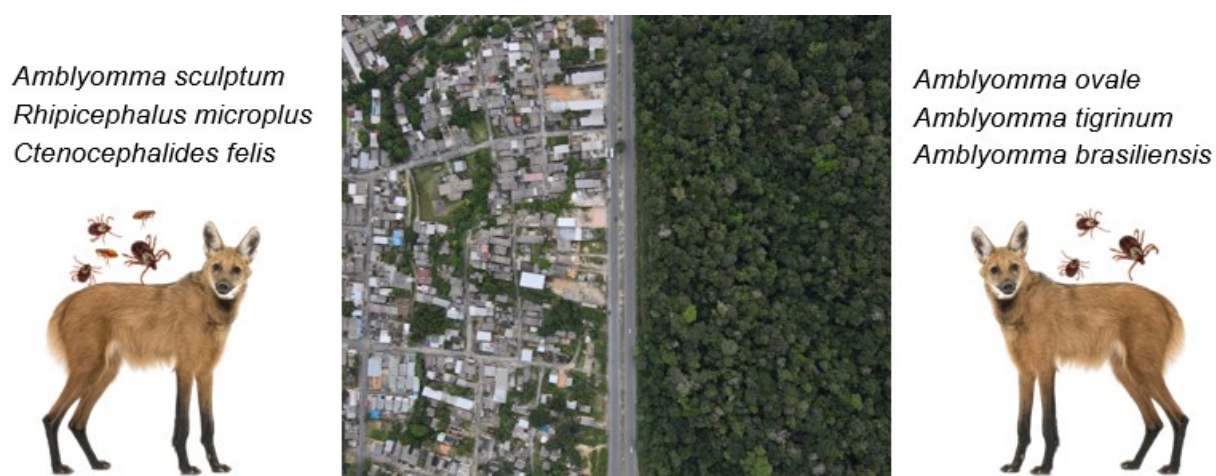


Figura 1: Principais ectoparasitos registrados em canídeos silvestres provenientes de diferentes contextos ecológicos, evidenciando indivíduos oriundos de áreas antropizadas (esquerda) e de ambiente florestal (direita).

3.3. Pulgas

As pulgas são ectoparasitos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta e ordem Siphonaptera na qual estão presentes oito famílias brasileiras, sendo elas Pulicidae, Tungidae, Ceratophyllidae, Leptopsyllidae, Ischnopsyllidae, Stephanocircidae, Ctenophthalmidae, Rhopalopsyllidae. Estima-se que quase 3.000 espécies e/ou subespécies de pulgas tenham sido descritas mundialmente, das quais aproximadamente 250 ocorrem na América do Sul e 63 circulam pelo Brasil (Linardi e Guimarães, 2000; Pesenato *et al.*, 2025). Dentre os gêneros de maior importância epidemiológica, destacam-se aqueles pertencentes à família Pulicidae, como *Pulex*, *Xenopsylla* e *Ctenocephalides*; e a família Tungidae, representada principalmente pelo gênero *Tunga*.

Didaticamente, as pulgas podem ser classificadas em três grupos distintos, com base em sua relação ecológica com o hospedeiro:

- Pulgas penetrantes: cujas fêmeas adultas penetram ativamente na pele do hospedeiro, onde permanecem fixadas para completar seu ciclo reprodutivo, como o gênero *Hectopsylla*, *Rhynchopsyllus* e *Tunga*, responsável pela tungíase (Linardi e Guimarães, 2000; Harvey *et al.*, 2021).
- Pulgas não penetrantes e permanentes: constituem a maioria das espécies descritas, cujos adultos habitam continuamente o corpo do hospedeiro, onde realizam hematofagia de forma intermitente. Nessa categoria, estão incluídas as pulgas do gênero *Polygenis*, *Xenopsylla* e *Ctenocephalides* (Linardi e Guimarães, 2000; Boyer *et al.*, 2022).
- Pulgas não penetrantes e não permanentes: encontradas predominantemente no ambiente, cujos adultos aproximam-se do hospedeiro apenas para se alimentar, sem estabelecer uma permanência contínua sobre ele. A exemplo, temos as espécies *Pulex irritans* e *Nosopsyllus fasciatus* (Linardi e Guimarães, 2000; Azarm *et al.*, 2022).

Além disso, esses insetos apresentam adaptações morfológicas e evolutivas altamente especializadas ao parasitismo (Linardi e Guimarães, 2000; Moore *et al.*, 2024). O aparelho bucal sugador-pungitivo confere eficiência no processo de hematofagia. A ausência de asas (ápteros) é compensada por pernas posteriores saltatórias, que servem como um eficiente mecanismo de dispersão. O corpo, comprimido lateralmente e provido de cerdas orientadas para trás, facilita a locomoção entre os pelos, enquanto a cutícula fortemente esclerotizada confere resistência e proteção. Os ctenídios estão presentes em 80% das espécies conhecidas, que são cerdas mais robustas semelhantes a um pente que auxilia na fixação ao hospedeiro, dificultando sua remoção mecânica (Linardi e Guimarães, 2000).

3.3.1. O gênero *Ctenocephalides*

O gênero *Ctenocephalides* pertence à família Pulicidae e subfamília Archaeopsyllinae (Hopkins e Rothschild, 1953), compreendendo 13 espécies e subespécies descritas, embora apenas *C. canis* (Curtis, 1826) e *C. felis felis* (Bouché, 1835) ocorram no Brasil (Lewis, 1993; Linardi e Guimarães, 2000). Classificado como pulgas não penetrantes e permanentes, uma característica morfológica marcante desse gênero é a presença de dois ctenídios, localizados na região cefálica (genal) e no protórax (pronotal) (Gage, 2004; Linardi e Santos, 2012; Moore *et al.*, 2024). Tanto *C. felis felis* quanto *C. canis* são cosmopolitas e podem ocorrer em uma mesma região

geográfica, além de parasitar os mesmos hospedeiros. No entanto, *C. felis felis* é frequentemente relatada como mais abrangente e adaptável quando comparada a *C. canis*, apresentando ampla distribuição e maior prevalência em diferentes contextos (Linardi e Guimarães, 2000; Clark *et al.*, 2018).

Além das distinções epidemiológicas, *C. canis* e *C. felis felis* apresentam diferenças morfológicas marcantes, conforme representado na Figura 1. Segundo Linardi e Santos (2012), a conformação da cabeça é uma das características mais evidentes: em *C. felis felis*, o perfil é alongado e arqueado, com a região frontal suavemente curvada para baixo, enquanto que em *C. canis*, a cabeça é mais curta, com curvatura frontal abrupta e contorno globoso. No ctenídio genal, o primeiro espinho de *C. felis felis* possui comprimento semelhante aos demais, ao passo que em *C. canis* o primeiro espinho é nitidamente mais curto. Adicionalmente, no metepisterno, *C. felis felis* exibe uma ou duas cerdas, enquanto *C. canis* apresenta três (Linardi e Guimarães, 2000; Linardi e Santos, 2012). Além disso, García-Sánchez *et al.* (2022) obtiveram resultados promissores por meio de análises morfométricas comparativas entre *C. canis* e *C. felis felis*, sugerindo abordagens inovadoras e complementares para a diferenciação morfológica entre essas duas espécies.

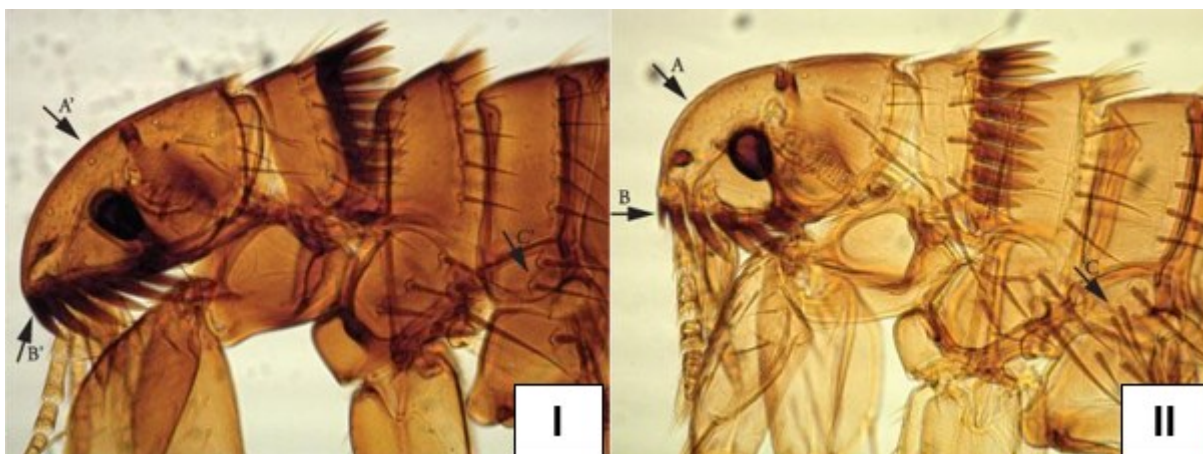


Figura 2: Diferenças morfológicas entre *C. felis felis* (I) e *C. canis* (II). Imagem I e II: Em A: Conformação da cabeça: alongada e arqueada, com curvatura frontal suave em *C. felis felis* (I); curta e globosa, com curvatura frontal abrupta em *C. canis* (II). B: Ctenídio genal: primeiro espinho com comprimento semelhante aos demais em *C. felis felis* (I); mais curto em *C. canis* (II). C: Metepisterno: duas cerdas em *C. felis felis* (I) e três cerdas em *C. canis* (II). Adaptado de Linardi e Santos (2012).

Esses artrópodes apresentam desenvolvimento holometábolo, caracterizado por metamorfose completa que compreende quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adultos (Dryden e Rust, 1994) (Figura 2). Em condições ambientais favoráveis de temperatura e umidade, esse ciclo é completado em cerca de 25 a 30 dias. Os adultos

são hematófagos estritos e generalistas, parasitando principalmente mamíferos (Whiting *et al.*, 2008; Durden e Hinkle, 2018). Após infestarem o hospedeiro, os adultos realizam a hematofagia e o acasalamento, com pico de reprodução entre o quarto e o nono dia de parasitismo. As fêmeas depositam, em média, cerca de 25 ovos/dia, ainda sobre o hospedeiro e predominantemente durante o período noturno (Dryden, 1989; Linardi e Guimarães, 2000). No entanto, devido à ausência de estruturas adesivas, os ovos não se fixam ao pelo e acabam caindo no ambiente, concentrando-se especialmente nas áreas de repouso dos animais (Rust, 1992; Dryden e Rust, 1994). Segundo Dryden (1989), uma única fêmea pode ovipositar até 1.745 ovos em 50 dias, evidenciando sua elevada capacidade reprodutiva e o conseqüente potencial de dispersão ambiental.

As larvas eclodem após dois a nove dias. Nesse estágio, apresentam comportamento de geotropismo positivo e fototropismo negativo, o que favorece sua permanência em locais escuros e próximos ao solo (Dryden e Rust, 1994, Halos *et al.*, 2014). Possuindo aparelho bucal do tipo mastigador, as larvas alimentam-se de fezes excretadas pelos indivíduos adultos (constituídas por sangue parcialmente digerido, rico em proteínas), as quais se aderem a detritos orgânicos disponíveis no ambiente. Passam por três estádios larvais (L1, L2 e L3), com mudas a cada três dias, atingindo o terceiro estágio (L3) em cerca de cinco a dez dias (Dryden e Rust, 1994; Linardi e Guimarães, 2000). Estímulos ambientais, como a presença de superfícies verticais (por exemplo, o solo), induzem as larvas L3 a tecerem um casulo, dando início ao estágio de pupa (Dryden e Smith, 1994).

A fase pupal ocorre no interior de um casulo que não mantém contato direto com o ambiente externo (Dryden e Rust, 1994; Dryden e Smith, 1994). Posteriormente, após uma média de oito dias, sofre metamorfose em um adulto pré-emergente, sendo considerada a principal fase de resistência do ciclo (Dryden e Rust, 1994). A emergência dos adultos é hospedeiro-dependente, desencadeada por estímulos mecânicos e térmicos, como a movimentação dos animais ou vibrações no ambiente. Na ausência desses estímulos, o estágio pupal pode se prolongar por até 140 dias (Silverman *et al.*, 1981; Dryden e Rust, 1994), funcionando como uma forma de sobrevivência prolongada frente à ausência de hospedeiros. Adultos recém-emergidos apresentam comportamento oposto ao das larvas, com geotropismo negativo e fototropismo positivo. Utilizam estímulos visuais e térmicos para localizar os hospedeiros (Osbrink e Rust, 1985) e, uma vez encontrados, iniciam o parasitismo

ativo. Após o início do parasitismo, a pulga adulta sobrevive por apenas três a cinco dias caso abandone o hospedeiro (Halos *et al.*, 2014). Assim, é pouco provável que ela deixe o hospedeiro inicial após se estabelecer. Franc *et al.* (2013) observaram uma taxa de transferência inferior a 4% entre gatos domésticos que compartilham o mesmo ambiente e apresentavam comportamento social. Nesse sentido, o adulto tende a permanecer em parasitismo ativo no mesmo hospedeiro por cerca de 50 dias, podendo se estender até 100 dias em condições favoráveis, dando continuidade ao seu ciclo de vida (Linardi e Guimarães, 2000).

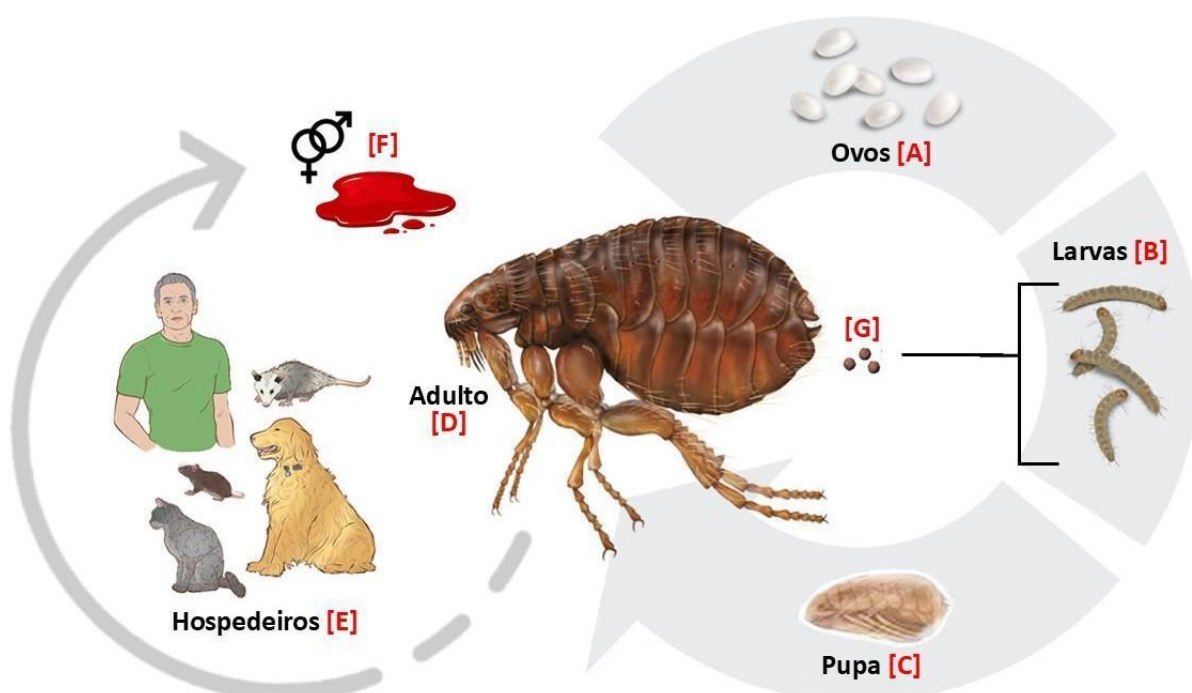


Figura 3: Ciclo de vida de *Ctenocephalides* spp. Representa-se em [A], os ovos no ambiente após a postura; em [B], as larvas no ambiente; [C] pupa em estágio de desenvolvimento dentro do casulo, também no ambiente; [D] indivíduo adulto; [E] Potenciais hospedeiros, representados por humanos, mamíferos domésticos e silvestres; [F] Processo de hematofagia por machos e fêmeas adultos; [G] Fezes de pulga, servindo como fonte alimentar para as larvas. Adaptado de Enciclopédia Britânica (2013).

Beugnet *et al.* (2004) estimaram, através de modelos matemáticos, que a distribuição das diferentes fases evolutivas das pulgas no ambiente ocorra de forma desigual, com aproximadamente 50% dos indivíduos na forma de ovos, 35% como larvas, 10% como pupas e apenas 5% como adulto. Essa predominância das formas imaturas no ambiente reforça a importância do controle ambiental no manejo de infestações, que será discutido posteriormente. A alternância entre estágios de vida livre e parasitária permite que as pulgas participem de diferentes elos na cadeia epidemiológica, atuando como vetores mecânicos ou biológicos de diversos

patógenos, a depender do contexto ecológico e do hospedeiro envolvido (Dryden e Rust, 1994; Linardi e Guimarães, 2000).

3.3.2. *Ctenocephalides felis felis* como agente infestante

Ctenocephalides felis felis é considerado um dos ectoparasitos de maior relevância global (Rust e Dryden, 1997; Linardi e Guimarães, 2000) e um dos parasitos mais importantes que acometem cães e gatos domésticos. No Brasil, estudos apontam prevalência variando de 8,9% a 100% (Rodrigues *et al.*, 2008; Dantas-Torres *et al.*, 2009; Klimpel *et al.*, 2010; Linardi e Santos, 2012), reforçando sua importância médica, veterinária e econômica (Dobler e Pfeffer, 2011). Embora carnívoros, especialmente cães e gatos domésticos, sejam considerados seus hospedeiros preferenciais, esse artrópode é capaz de se adaptar a diferentes condições ecológicas e hospedeiros (Linardi e Guimarães, 2000; Clark *et al.*, 2018), conforme será discutido posteriormente.

A infestação por *C. felis felis* está associada a manifestações clínicas diretas nos hospedeiros parasitados, sendo uma das principais causas de dermatopatias em cães e gatos. Aproximadamente 50% das doenças alérgicas de pele nesses animais ocorrem devido a picadas de pulgas. A consequência mais comum é a dermatite alérgica à picada de ectoparasitos (DAPE), provocada pelo elevado potencial alergênico dos compostos presentes na saliva do inseto (Carlotti e Jacobs, 2000; Lam e Yu, 2009). Essa condição se manifesta clinicamente por pápulas, prurido intenso, desconforto e irritação, além de desencadear hipersensibilização em indivíduos mais sensíveis (Dryden e Rust, 1994; Carlotti e Jacobs, 2000; Contreras *et al.*, 2018). Somado a isso, o processo de hematofagia exerce danos diretos sobre o hospedeiro, uma vez que uma única pulga consome, em média, 13,6 μ L de sangue por dia (cerca de 15 vezes o seu peso corporal) o que, em casos de infestação massiva, pode resultar em processos anêmicos e óbito, principalmente em hospedeiros não preferenciais (Yeruham *et al.*, 1989; Dryden e Gaafar, 1991; Linardi e Guimarães, 2000; Szabó *et al.*, 2000).

O processo de hematofagia é dependente de modulações imunofisiológicas dos hospedeiros, conforme será detalhado posteriormente, mediadas por biomoléculas salivares e intestinais. Nesse contexto, quanto maior a modulação, maior seu desempenho alimentar. Em pulgas, as glândulas salivares são organizadas em dois pares, sendo quatro unidades no total, dois de cada lado do abdômen,

conectados a um par de ductos salivares (Danchenko e Macaluso, 2024). Já o sistema digestivo é composto por esôfago, proventrículo, intestino médio, tubo de Malpighi, intestino posterior e glândulas retais (Linardi e Santos, 2012; Hinnebusch *et al.*, 2021). De forma geral, o intestino médio, e o proventrículo em algumas espécies, constitui o principal local de digestão sanguínea, enquanto os demais segmentos são responsáveis pelos processos de absorção e excreção (Araújo *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2009).

Maia e Gouvea (2002) relataram a morte de seis lobos-guará mantidos em cativeiro por anemia severa associada a intensa infestação por pulgas. Contudo, não é possível descartar a participação concomitante de enfermidades infecciosas, incluindo desordens hemorrágicas, que podem ter contribuído tanto para o quadro anêmico quanto para a elevada carga parasitária. Dessa forma, embora o achado indique que infestações intensas possam representar importante fator clínico para a espécie, esses resultados devem ser interpretados com cautela, visto que evidências filogenéticas os caracteriza como hospedeiros preferenciais (Zhao *et al.*, 2016). Entretanto, permanecem desconhecidos os mecanismos imunológicos envolvidos na interação do lobo-guará com *C. felis felis*, bem como se há adaptação diferencial da pulga ao seu sistema imunológico, quando comparado com os cães e gatos domésticos.

3.3.3. Infestações em hospedeiros não preferenciais

Hospedeiros não preferenciais são aqueles que não fazem parte do ciclo de vida usual do parasito, mas que podem ser parasitados sob determinadas condições ecológicas e epidemiológicas. Esse conceito é temporal e espacial, uma vez que a disponibilidade e a densidade de hospedeiros preferenciais, bem como o ambiente em que ocorrem as interações, influenciam diretamente na oportunidade de contato entre os ectoparasitos e novos hospedeiros (Begon *et al.*, 2002). No caso das pulgas *C. felis felis*, seu comportamento generalista e oportunista, além de estreita associação ao hospedeiro, permite que indivíduos de espécies não usuais sejam acometidos com frequência, especialmente mamíferos (Linardi e Guimarães, 2000; Clark *et al.*, 2018).

Diversos relatos têm documentado a ocorrência dessa espécie em hospedeiros não preferenciais (Clark *et al.*, 2018). Entre os mamíferos vertebrados acometidos estão os seres humanos, lagomorfos, bovinos e bubalinos, além de diversas espécies

silvestres, como marsupiais, edentatos, primatas, ungulados e pequenos roedores (Linardi e Guimarães, 2000; Linard, 2006; Singh *et al.*, 2011; Linardi e Santos 2012; Rust, 2017; Riner *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019; Paz *et al.*, 2022; Amini Rarani *et al.*, 2023; Cermolacce *et al.*, 2023). Há, ainda, registros de parasitismo em uma espécie de ave bicudinho (*Sporophila crassirostris*) (Linardi e Santos, 2012), o que evidencia a adaptabilidade da espécie. Essa capacidade de infestar uma ampla gama de hospedeiros é favorecida por ambientes onde há sobreposição entre a fauna silvestre e doméstica, criando oportunidades para o transbordamento de ectoparasitos entre espécies (Linardi e Guimarães, 2000; Clark *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2023).

Estudos demonstram que animais jovens tendem a abrigar um número maior de pulgas quando comparados aos adultos (Osbrink & Rust, 1985; Singh *et al.*, 2011; Paz *et al.*, 2022). Somado a isso, Rust (1994) observou um declínio progressivo na ingestão sanguínea de pulgas que infestavam gatos adultos, possivelmente em decorrência de respostas imunes adaptativas do hospedeiro. Esses achados corroboram a hipótese de que a exposição repetida às picadas pode induzir o desenvolvimento de uma resistência adquirida ao longo do tempo.

Nesse contexto, a ausência de um histórico evolutivo comum entre o parasitismo e os hospedeiros não preferenciais pode resultar em manifestações clínicas mais intensas. Diferente dos cães e gatos, que compartilham longo histórico de exposição e coevolução com *C. felis felis* (Linardi e Guimarães, 2000), outros hospedeiros podem não apresentar mecanismos imunológicos eficazes de tolerância ou modulação frente aos antígenos da pulga. Isso pode resultar em quadros exacerbados de hipersensibilidade e, em casos extremos, anemia, comprometimento sistêmico e óbito, especialmente em situações de infestações severas ou prolongadas (Araújo *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2022).

Como exemplo, Yeruham *et al.* (1989) descrevem infestações graves por *C. felis felis* em rebanhos bovinos, ovinos e caprinos, com taxas de mortalidade de 40%, 26% e 28%, respectivamente. Neste estudo, animais jovens apresentaram altos níveis de parasitismo e manifestações clínicas intensas, ao passo que os adultos exibiram cargas parasitárias mais baixas e manifestações brandas. De forma semelhante, Szabó *et al.* (2000) atribuíram a morte de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) cativos à infestação por *C. felis felis*. Em todos os casos, a presença de hospedeiros preferenciais domésticos foi associada como a provável fonte de infestação.

Apesar do aumento nos relatos de infestação por *C. felis felis* em hospedeiros não preferenciais (Teixeira *et al.*, 2023), ainda são escassos os estudos que avaliem sua competência como fontes viáveis de alimentação para a pulga. Essa lacuna é relevante diante da possibilidade de que diferenças na resposta imune entre hospedeiros domésticos e silvestres influenciem diretamente a permanência e o sucesso do parasitismo (Clark *et al.*, 2018).

3.3.4. *Ctenocephalides felis felis* como vetor de agentes patogênicos

Segundo Youssefi *et al.* (2014) e Rajamannar *et al.* (2022), *C. felis felis* implica impactos significativos à saúde única (*One Health*) em função da sua notória capacidade de albergar e transmitir microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, protozoários e helmintos (Rust e Dryden, 1997; de Avelar *et al.*, 2007; 2008; Eisen e Gage, 2012;). Dentre os agentes, já foi documentado a transmissão de *Rickettsia felis* e *R. typhi* (Macaluso *et al.*, 2008; Caravedo Martinez *et al.*, 2021), *Bartonella henselae* (Sepúlveda-García *et al.*, 2023) e potencialmente *Yersinia pestis* (Bland e Hinnebusch 2016; Barbieri *et al.*, 2020). Além disso, *C. felis felis* atua como hospedeiro intermediário no ciclo evolutivo do *Acanthocheilonema reconditum* (Duarte *et al.*, 2025) além do *Dipylidium caninum* (Cestoda, Dilepididae), prevalente em populações de animais domésticos e, ocasionalmente, crianças e humanos imunocomprometidos (Elston e Do 2010; Portokalidou *et al.*, 2019).

3.3.5. Medidas preventivas e de controle

De modo geral, o controle de pulgas exige abordagens integradas, com medidas direcionadas aos animais parasitados e às habitações infestadas. Para isso, podem ser empregados métodos físicos, químicos e mecânicos, que, quando combinados de forma estratégica, aumentam sua eficácia (Linardi e Santos, 2012, Dryden, 2009).

O controle ambiental tem como intuito a eliminação de formas livres não parasitárias presentes no ambiente (ovos, larvas e pupas). Em residências infestadas, recomenda-se a aspiração frequente de tapetes e frestas, além da lavagem de camas e panos utilizados pelos animais (Linardi e Santos, 2000; Rust, 2017; Lebon *et al.*, 2018). Considerando o comportamento das larvas, o fechamento de frestas em pisos pode ser uma estratégia eficaz para limitar seu desenvolvimento (Linardi e Santos, 2012). Adicionalmente, a utilização de "vassoura de fogo" tem se mostrado eficaz no

controle dessas formas ambientais, embora seu uso seja restrito conforme as características do local de aplicação (Cubas *et al.*, 2007; Rust, 2020).

Em ambiente peridomiciliar, a aplicação de inseticidas diretamente no solo pode ser considerada, mas deve ser feita com cautela, a fim de evitar a contaminação ambiental e os riscos de intoxicação ao aplicador e/ou animais que tiverem contato direto com o composto químico (Linardi e Santos, 2012). Além disso, o controle biológico vem sendo explorado em estudos recentes, com destaque ao uso de bactérias e fungos (Rust, 2017; Pittarate *et al.*, 2018). No entanto, a aplicação prática dessas estratégias ainda é limitada e requer mais pesquisas. De acordo com Paz *et al.* (2015), os maiores índices de infestação por *C. felis felis* em cães do sudeste do Brasil foram observados nos meses mais secos do ano (julho a setembro), período em que a precipitação pluviométrica é reduzida. Dessa forma, estratégias de manejo ambiental devem ser intensificadas nesse intervalo, aproveitando o padrão sazonal de infestação para otimizar a eficácia das medidas de controle.

Na última década, avanços foram alcançados no controle químico, especialmente com a introdução de terapias orais e *spot-on*, priorizando o tratamento direto dos animais e minimizando a dependência do uso de inseticidas no ambiente. Os esforços de pesquisa e desenvolvimento têm se concentrado em formulações de compostos adulticidas, interrompendo o ciclo de vida do parasito e prevenindo novas infestações (Rust, 2020). Nesse contexto, diversos produtos vêm sendo lançados no mercado, apresentando diferentes formulações, vias de administração e períodos residuais (Dryden, 2009; Rust, 2016; 2020).

Estima-se que o mercado global movimente mais de 15 bilhões de dólares por ano, sendo os ectoparasiticidas o principal segmento entre os parasiticidas veterinários (Nisbet e Huntley, 2006). No Brasil, o cenário é semelhante: o setor pet movimentou aproximadamente 68 bilhões de reais em 2023 com os medicamentos veterinários, incluindo os antiparasitários, representando uma fração expressiva desse mercado (Brasil, 2024). Entre os ectoparasiticidas mais utilizados no controle de pulgas, destaca-se a classe das espinosinas, representado por spinosad (Confortis®) (White *et al.*, 2017), os fenilpirazóis, representado pelo fipronil (Frontiline®) (Dryden *et al.*, 2000) e as atuais isoxazolininas (Sojka, 2018), representadas por afoxolaner (NexGard®), fluralaner (Bravecto®), lotilaner (Credeli®) e sarolaner (Simparic®) (McTier *et al.*, 2016; Ranjan *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2019; Paarlberg *et al.*, 2021). Apesar da eficácia comprovada, o uso contínuo desses

compostos pode exercer pressão seletiva futuras sobre as populações parasitárias favorecendo o surgimento de resistência (Halos *et al.*, 2014). Esse comportamento já foi observado em outras classes de inseticidas, como carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretróides e piretrinas (Coles e Dryden, 2014; Rust, 2016; Erkunt Alak *et al.*, 2020).

Até o momento não há vacinas disponíveis contra insetos ectoparasitos (Rust, 2020). Avanços recentes com a vacinação contendo antígenos recombinantes mostraram eficácia parcial (32-46%) na redução da fertilidade e viabilidade dos ovos de *C. felis* (Contreras *et al.*, 2018). Além disso, estudos com antígenos de saliva de pulgas demonstraram potencial na atenuação da hipersensibilidade alérgica à picada desses pulcícolas em gatos domésticos (Jin *et al.*, 2010). Apesar dos progressos, uma vacina eficaz contra pulgas ainda parece distante.

O controle de pulgas em animais silvestres representa um desafio, sendo frequentemente baseado na extrapolação de dados obtidos em estudos com animais domésticos. Além disso, a utilização de fármacos nessas espécies geralmente ocorre de forma *off label* (Sojka, 2018), uma vez que faltam evidências científicas que comprovem a segurança e a eficácia dessas substâncias nesses indivíduos. A principal medida preventiva, além das já mencionadas, consiste em restringir o contato com hospedeiros parasitados (Clark *et al.*, 2018). Nesse contexto, cães e gatos domésticos têm sido amplamente apontados como as principais fontes de infestação e disseminação da pulga, desempenhando um papel central na manutenção do ciclo em ambientes domiciliares (Linardi e Santos, 2000; Szabó *et al.*, 2000). No entanto, o ciclo de vida das pulgas em ambientes naturais ainda é pouco compreendido. Diante disso, são necessárias pesquisas que aprofundem o conhecimento sobre a ecologia desses ectoparasitos na natureza e que avaliem intervenções seguras e específicas para o seu manejo.

Por fim, o controle eficaz de pulgas requer a integração de medidas voltadas tanto ao ambiente quanto aos hospedeiros, com base na compreensão da ecologia e sazonalidade do parasito, escolha criteriosa dos tratamentos e conscientização dos envolvidos quanto ao tempo necessário para o rompimento do ciclo de infestação.

3.4. A hemostasia e seus mecanismos regulatórios

A hemostasia é o mecanismo fisiológico responsável por preservar a integridade do sistema circulatório, garantindo a fluidez sanguínea e promovendo a

contenção de hemorragias após lesões vasculares (Smith *et al.*, 2015). Esse processo envolve uma série de eventos coordenados de natureza mecânica e bioquímica, didaticamente divididos em três fases interdependentes, iniciadas pela lesão tecidual e exposição do sangue aos componentes subendoteliais (Broos *et al.*, 2011; de Witt *et al.*, 2014).

A hemostasia primária caracteriza-se pela vasoconstrição local e pela adesão e agregação plaquetárias, culminando na formação de um tampão plaquetário provisório. Esse processo depende da presença do fator de von Willebrand (FvW), glicoproteína essencial para a adesão das plaquetas ao colágeno exposto na matriz subendotelial (Broos *et al.*, 2011).

A hemostasia secundária refere-se à ativação sequencial de proteínas plasmáticas pró-coagulantes, que resultam na formação de uma rede de fibrina sobre o tampão plaquetário, promovendo sua estabilização e formando o coágulo definitivo (Bagoly *et al.*, 2012; Coban *et al.*, 2022). Esse processo é mediado por um conjunto de reações enzimáticas denominado cascata de coagulação, detalhado no próximo item (3.4.1. A cascata de coagulação).

Por fim, a hemostasia terciária, também conhecida como fibrinólise, corresponde ao processo de resolução do coágulo. Nessa fase, o plasminogênio é ativado e degrada a rede de fibrina, permitindo o restabelecimento do fluxo sanguíneo e o reparo do tecido lesionado (Chapin e Hajjar, 2015). A falha em qualquer uma dessas etapas pode resultar em distúrbios hemorrágicos ou trombóticos (Furie, 2009; Bagoly *et al.*, 2012).

3.4.1. A cascata de coagulação

A cascata de coagulação constitui um mecanismo de defesa inato do hospedeiro, caracterizado por uma complexa sequência de reações bioquímicas mediadas por diversas proteínas plasmáticas de coagulação, estruturalmente conservada em todos os vertebrados (Schenone *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2025). Essas reações são desencadeadas principalmente pela exposição do sangue a componentes subendoteliais ou tecidos extravasculares, como o fator tecidual, após lesão vascular (Coban *et al.*, 2022). A cascata é classificada didaticamente em três vias inter-relacionadas: via intrínseca, via extrínseca e via comum (Figura 3) (Doolittle *et al.*, 2009; Chaudhry *et al.*, 2025).

A via intrínseca é ativada pelo contato do sangue com o colágeno subendotelial da parede vascular lesionada, superfícies carregadas negativamente ou material estranho (por exemplo, cateter). Esse estímulo leva a ativação do fator XII (fator de Hageman), em associação ao sistema de contato composto pela pré-caliceína e pelo cininogênio de alto peso molecular (HMWK), que atua como cofator essencial para a ativação e amplificação dessa via, que por sua vez ativa o fator XI (antecedente da tromboplastina plasmática). Posteriormente, o fator XI ativado ativa o IX (fator de Christmas), que ativa o VIII (fator anti-hemolítico) em sistema de amplificação (Grover e Mackman, 2019; Chaudhry *et al.*, 2025).

A via extrínseca por sua vez é iniciada pela exposição do sangue ao fator tecidual (fator III ou tromboplastina tecidual), uma glicoproteína expressa por células subendoteliais e fibroblastos em resposta à lesão. Em sequência, o fator III ativado ocasiona na ativação do fator VII (proconvertina), também em sistema de amplificação (Chaudhry *et al.*, 2025).

A ativação de ambas as vias a partir do fator VII (proconvertina, via extrínseca) e fator VIII (fator anti-hemolítico, via intrínseca), somada a presença de fosfolipídios plaquetários (PF-3) e cálcio (fator IV), convergem para um ponto em comum, onde se inicia a via comum, com ativação do fator X (Stuart-Prower) (Schenone *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2025). O fator X ativado, em associação com o fator V (acelerador da protrombina), converte a protrombina (fator II) em trombina (fator II ativado). A trombina é uma enzima pró-coagulante com papel central na coagulação sanguínea, responsável pela conversão do fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina (fator I ativado), que se polimerizam formando uma rede (Coban *et al.*, 2022). O fator XIII (fator estabilizador da fibrina), ativado também pela trombina, promove ligações covalentes entre os monômeros de fibrina, conferindo maior estabilidade ao coágulo (Bagoly *et al.*, 2012; Chaudhry *et al.*, 2025).

Proteases da coagulação, especialmente a trombina e o fator Xa, também são capazes de clivar componentes do sistema complemento (a ser discutido no próximo tópico), incluindo C3 e C5, estabelecendo uma interface funcional entre os dois sistemas.

Diversas proteínas envolvidas na coagulação sanguínea são dependentes da vitamina K para sua ativação funcional, incluindo os fatores II, VII, IX e X. Além disso, a síntese dessas proteínas ocorre predominantemente no fígado, embora macrófagos também contribuam em menor escala para sua produção (Pant *et al.*, 2018).

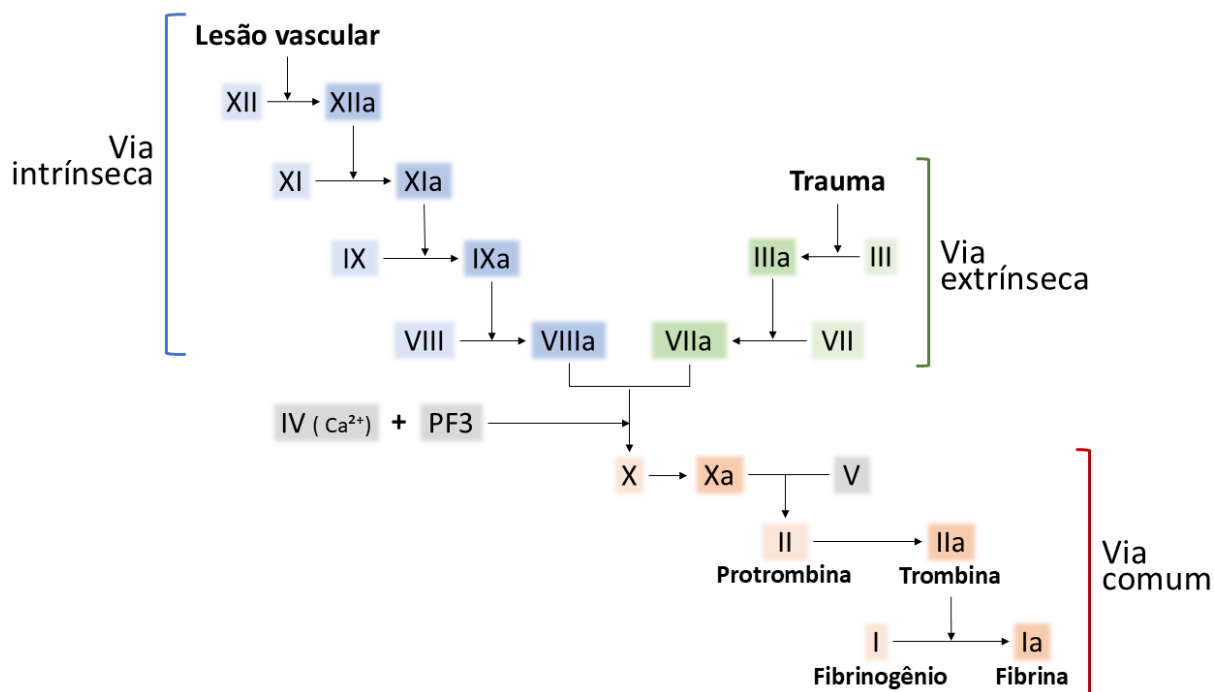


Figura 4: Representação da cascata de coagulação contemplando as três vias (intrínseca, extrínseca e comum). Elaborado pelo autor. Adaptado de Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Thrall *et al.*, 2004

3.5. O sistema complemento

O sistema complemento constitui uma parte crucial do sistema imunológico inato dos vertebrados. Funcionando como uma primeira barreira de defesa, sua principal função é auxiliar o organismo no combate a infecções e eliminar células danificadas ou patógenos, bem como modular a resposta imune adaptativa (Farries e Atkinson, 1991; Nonaka & Yoshizaki, 2004; Dunkelberger & Song, 2010). Esse sistema é composto por mais de 40 proteínas séricas e de superfície celular, produzidas predominantemente pelo fígado, que circulam no plasma em sua forma inativa ou estão ancoradas em membranas celulares (Ricklin *et al.*, 2010; Merle *et al.*, 2015a,b). Sua ativação desencadeia uma série de reações em cascata, caracterizadas por clivagens proteolíticas sucessivas que resultam em processos de opsonização, inflamação e lise celular (Janeway *et al.*, 2001).

A ativação do sistema complemento ocorre por três vias distintas, a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Figura 4). A via clássica, depende do reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo pela proteína C1q associada às serino-proteases C1r e C1s. A via das lectinas é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares conservados (PAMPs) presentes em superfícies microbianas por moléculas como a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas, que recrutam e

ativam as proteases MASP-1 e MASP-2. Já a via alternativa é caracterizada pela ativação espontânea de C3 e sua deposição em superfícies não próprias, como as de microrganismos (Sim & Dodds, 1997; Sarma & Ward, 2012; Dobó *et al.*, 2016).

Apesar das diferenças iniciais, todas as vias convergem para um ponto em comum, resultando na formação da C3 convertase, responsável por clivar o componente C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b, ao se associar às convertases iniciais, gera a C5 convertase, enzima que cliva o C5 em C5a e C5b. O C5b, por sua vez, inicia a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), composto por C5b, C6, C7, C8 e múltiplas cópias de C9, promovendo a formação de poros na bicamada lipídica das membranas de células-alvo e resultando em lise celular (Ribeiro e Spielman, 1986; Dunkelberger & Song, 2010; Thurman & Nester, 2016).

Além da atividade citolítica, a ativação da cascata do complemento gera subprodutos biologicamente ativos com papel central na inflamação e na comunicação intercelular. As anafilatoxinas C3a e C5a atuam como potentes mediadores pró-inflamatórios, promovendo quimiotaxia e ativação de células fagocíticas, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores inflamatórios (Klos *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2016). Já as moléculas de C3b atuam como opsoninas, marcando superfícies microbianas e apoptóticas para fagocitose, além de participar no processamento de antígenos e na modulação da resposta adaptativa (Ricklin *et al.*, 2010; Merle *et al.*, 2015b).

O sistema complemento e os processos de coagulação compartilham origem evolutiva comum, derivando de um ancestral sistema proteolítico da imunidade inata, motivo pelo qual apresentam mecanismos regulatórios e efetores interconectados. Dessa forma, a interação entre ambos os sistemas ocorre de forma bidirecional, uma vez que produtos do complemento também modulam a coagulação e a inflamação vascular, caracterizando um processo integrado denominado imunotrombose (Farries e Atkinson, 1991; Doolittle *et al.*, 2009; Chaudhry *et al.*, 2025).

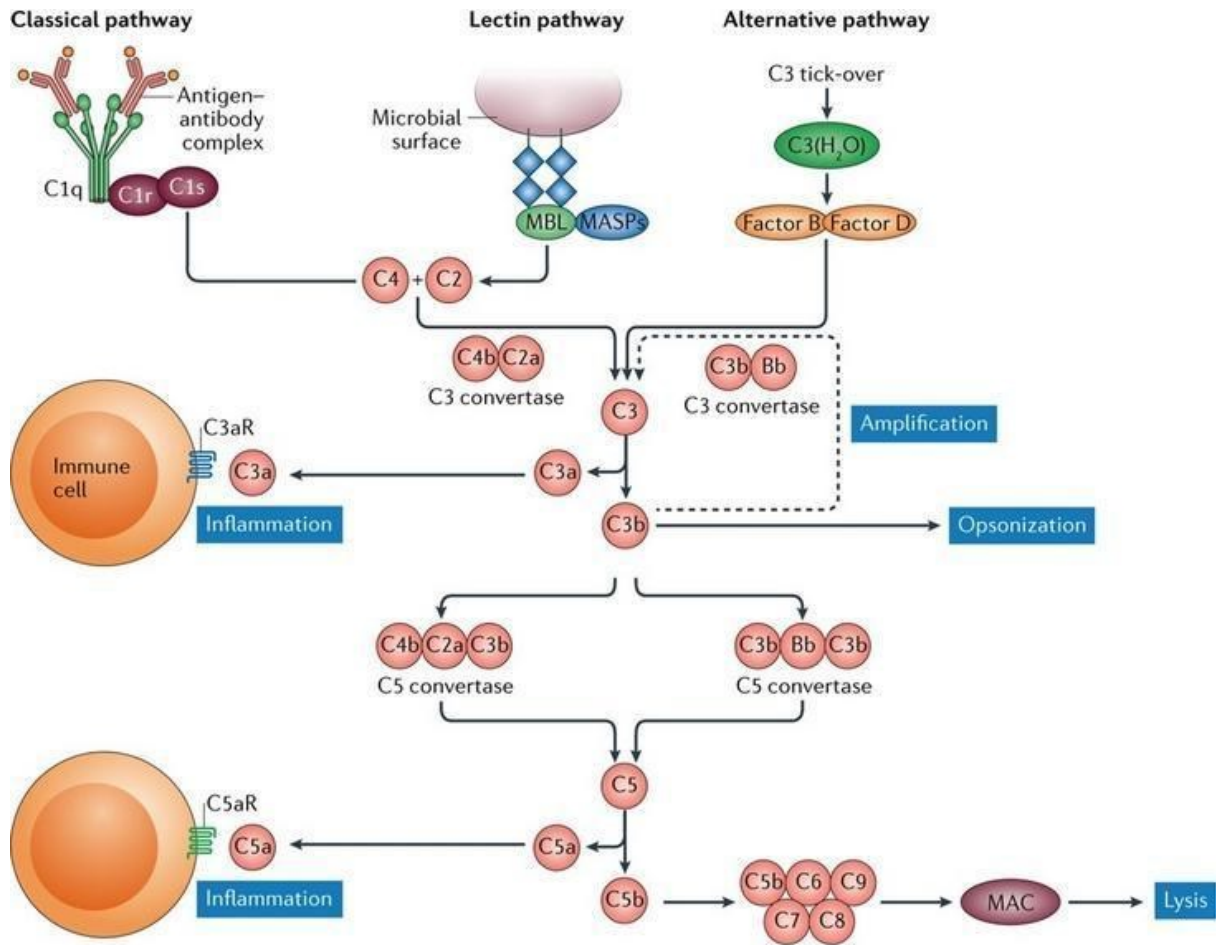


Figura 5: Fluxograma da cascata de eventos do sistema complemento, contemplando as três vias (Reproduzido de Janeway *et al.*, 2001).

3.6. Mecanismos anti-hemostáticos e imunomodulatórios de artrópodes hematófagos

Desde o fim do século XX até a atualidade, diversos estudos têm investigado os mecanismos pelos quais os artrópodes hematófagos modulam ou inibem as respostas imunológicas, hemostáticas e inflamatórias do hospedeiro. A pressão seletiva exercida pelo sistema complemento e suas respostas fisiológicas favoreceu o desenvolvimento de múltiplas estratégias adaptativas dos artrópodes, incluindo a secreção de moléculas inibitórias presentes tanto na saliva quanto no intestino (Schroeder *et al.*, 2009).

Nessa perspectiva, o sucesso alimentar, o desenvolvimento e a reprodução de artrópodes hematófagos dependem diretamente da capacidade de superar os mecanismos de defesa impostos pelo hospedeiro (Paim *et al.*, 2011; Arcà & Ribeiro, 2018), como a coagulação sanguínea, a vasoconstrição, agregação plaquetária e as respostas imunoinflamatórias locais (Barros *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2009). Para

isso, secretam uma ampla variedade de biomoléculas salivares, farmacologicamente ativas (Lu *et al.*, 2023; Danchenko & Macaluso, 2024). Dentre elas estão, pelo menos, um vasodilatador, um anticoagulante e um fator antiagregante plaquetário (Kamhawi, 2000; Ribeiro, 2003; Champagne, 2005, Fontaine *et al.*, 2011).

Além disso, a saliva e o intestino médio de artrópodes hematófagos contêm proteínas capazes de neutralizar a resposta imunológica do hospedeiro (Titus *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Fontaine *et al.*, 2011), incluindo inibidores das vias do sistema complemento (Cavalcante *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2016). De modo geral, cada espécie dispõe de inibidores direcionados a uma ou mais vias desse sistema (Sant'Anna *et al.*, 2024).

Ao bloquear a formação de anafilatoxinas, tais inibidores não apenas reduzem a inflamação no local da picada, mas também previnem a opsonização de moléculas salivares essenciais para a hematofagia, como os anti-hemostáticos, além de reduzir a percepção do hospedeiro a sua presença (Schroeder *et al.*, 2009; Saab *et al.*, 2020). Caso essa regulação falhe, a ativação descontrolada do sistema complemento compromete a hematofagia e pode provocar lise do epitélio intestinal, além de causar danos teciduais ao inseto (Schroeder *et al.*, 2009; Sant'Anna *et al.*, 2024), sobretudo pelo fato do epitélio intestinal desses organismos ser constituído por uma única camada de células, altamente vulnerável a lesões (Richards, 1975; Billingsley, 1990). Assim, o comprometimento da integridade do intestino médio, por sua vez, pode impactar diretamente a sobrevivência do artrópode (Barros *et al.*, 2009; Khattab *et al.*, 2015).

Os primeiros estudos foram conduzidos com espécies de ixodídeos do gênero *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. uriae* e *I. scapularis*) e demonstraram que proteínas salivares desses carrapatos eram capazes de inibir a via alternativa e da lectina do sistema complemento, além de reduzir a geração de anafilatoxinas produzidas durante a ativação da cascata, embora não interferissem na via clássica (Ribeiro e Spielman, 1986; Ribeiro, 1987a; Lawrie *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2000). Posteriormente, diferentes estudos buscaram esclarecer as interações entre o sistema complemento de hospedeiros vertebrados e outros artrópodes hematófagos, caracterizando tanto as vias de inibição quanto as moléculas envolvidas, sejam elas do vetor ou da cascata do complemento. Mais recentemente, Sant'Anna *et al.* (2024), em uma revisão abrangente, sintetizaram os avanços alcançados nas últimas

décadas, reunindo e discutindo, de forma detalhada, as evidências disponíveis sobre os mecanismos de modulação do sistema complemento por artrópodes hematófagos.

Em carrapatos ixodídeos e argasídeos, a inibição do sistema complemento foi descrita principalmente nas glândulas salivares (Roversi *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). Contudo, observa-se uma marcante variação quanto à especificidade e ao mecanismo de ação. Carrapatos dos gêneros *Ixodes* inibem somente as vias alternativas e das lectinas, enquanto *A. sculptum* e *R. microplus* exibem um espectro mais amplo, atuando também na via clássica. Já em *Ornithodoros moubata*, foi caracterizada uma proteína que se liga especificamente ao componente C5, uma molécula chave na via comum da cascata. Essa ligação impede sua clivagem e, conseqüentemente, bloqueia a formação de C5a e do complexo de ataque à membrana, independentemente da via de ativação inicial (Sant'Anna *et al.*, 2024).

Entre os dípteros, espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Aedes* têm sido amplamente estudadas quanto à presença de moléculas modulatórias do sistema complemento. Em *L. longipalpis* e *L. migonei*, foram identificadas proteínas salivares capazes de interferir na ativação do sistema complemento. Para *L. longipalpis*, as inibições ocorrem nas vias clássica e alternativa, enquanto em *L. migonei* o efeito inibitório parece restrito à via clássica (Cavalcante *et al.*, 2003; Mendes-Sousa *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2016; Mendes-Sousa *et al.*, 2017). Em *Aedes aegypti*, por outro lado, a atividade anticomplemento manifesta-se predominantemente no intestino, atuando sobre as vias clássica e da lectina, o que sugere um papel local na proteção do epitélio intestinal contra o ataque do complemento do hospedeiro (Barros *et al.*, 2009; Pereira-Filho *et al.*, 2020).

Em anofelinos (*Anopheles albimanus* e *A. aquasalis*), moléculas inibitórias presentes na saliva atuam preferencialmente sobre a via alternativa (Mendes-Sousa *et al.*, 2016; 2018). Além disso, células intestinais de *Anopheles* spp. demonstraram capacidade de capturar o fator H, representando um mecanismo adicional de evasão imune (Khattab *et al.*, 2015). Em moscas tsé-tsé (*Glossina morsitans morsitans*), principal vetor de *Trypanosoma vivax* na África, Ooi *et al.* (2015) identificaram no intestino médio uma serina protease inibitória capaz de bloquear a ativação das vias clássica e alternativa do complemento, contribuindo para a integridade do epitélio intestinal.

Entre os triatomíneos (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *T. brasiliensis*), vetores da doença de Chagas nas Américas, foram descritos inibidores presentes tanto na saliva quanto no intestino, com ação moduladora semelhante sobre as vias clássica e alternativa (Barros *et al.*, 2009). Glândulas salivares de *Panstrongylus megistus* também apresentaram efeito inibitório sobre a via clássica, embora essa tenha sido, até onde sabemos, a única via testada para a espécie (Cavalcante *et al.*, 2003).

Em outros grupos, como o ácaro *Sarcoptes scabiei*, a inibição do sistema complemento foi observada exclusivamente em extratos intestinais, abrangendo as três vias de ativação (clássica, alternativa e da lectina), com ação diferenciada tanto nas etapas iniciais quanto na via terminal (Mika *et al.*, 2012).

Pulgas continuam sendo o táxon menos estudado entre os artrópodes hematófagos. Até o momento, apenas um estudo investigou os possíveis mecanismos de modulação de *Ctenocephalides felis* no sistema complemento humano (Cavalcante *et al.*, 2003). Nesse estudo, foi avaliada exclusivamente a via clássica, utilizando extratos de glândulas salivares, e não foi observado efeito inibitório sobre a ativação do complemento.

Grande parte dos estudos mencionados avançaram na caracterização estrutural e funcional das moléculas inibitórias, identificando o ponto exato de bloqueio dentro das vias clássica, alternativa e/ou da lectina, o que permitiu compreender melhor os mecanismos de evasão imune empregados por cada espécie (Sant'Anna *et al.*, 2024). Assim, as moléculas anti-complemento, produzidas por artrópodes, configuram-se como promissores alvos vacinais, capazes de comprometer sua sobrevivência, aptidão reprodutiva e reduzir o potencial risco de transmissão de patógenos aos hospedeiros (Costa *et al.*, 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ética e permissões

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, protocolo nº 206/2025, Anexo I). A coleta das pulgas foi realizada após a obtenção do consentimento livre e esclarecido (Anexo II) dos tutores dos animais ou dos responsáveis pelos domicílios, os quais foram devidamente informados sobre os objetivos, procedimentos e eventuais riscos do estudo. Todos os procedimentos de contenção, manejo e coleta

de amostras biológicas foram conduzidos em conformidade com as diretrizes éticas e normativas vigentes para o bem-estar animal.

4.2. Coleta e manutenção das pulgas

A amostragem foi realizada por conveniência, por meio da coleta de pulgas de cães e gatos naturalmente infestados. Para a coleta, os animais foram contidos manualmente, apenas pelo tempo necessário para a inspeção e remoção dos ectoparasitos. A inspeção consistiu na avaliação de toda a superfície corporal dos animais, utilizando um pente fino, com ênfase nas regiões de maior predileção dos ectoparasitos (cabeça, pescoço, ventre e base da cauda) (Linardi e Guimarães, 2000). As pulgas encontradas foram coletadas manualmente e acondicionadas em microtubos estéreis perfurados com agulha 25x0,7 mm, permitindo a troca gasosa, e mantidas em recipientes com temperatura ambiente estável e ao abrigo da luz (como caixas de isopor), até o momento da dissecação, realizada em até 12 horas após a coleta. A identificação taxonômica foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio binocular Olympus (Tokio, Japão) modelo SZ 40, utilizando as chaves descritivas propostas por Linardi e Guimarães (2000) e Linardi e Santos (2012). Para este estudo, foram incluídas apenas pulgas pertencentes à espécie *C. felis felis*.

4.3. Obtenção de extratos de glândulas salivares (EGS) e extratos intestinais (EI) de *Ctenocephalides felis felis*

Para a obtenção dos extratos de glândulas salivares (EGS) e intestinais (EI), as pulgas, ainda vivas, foram inicialmente imobilizadas em gelo por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada, a fim de remover detritos superficiais, fezes secas, sangue residual do hospedeiro e eventuais microrganismos. A dissecação foi realizada individualmente com auxílio de um estereomicroscópio binocular Olympus (Tokio, Japão) modelo SZ 40 e sob uma gota de solução fisiológica (NaCl 0,9%), seguindo o guia de dissecação elaborado por Danchenko e Macaluso (2024). Os pares de glândulas salivares e os intestinos inteiros coletados (Figura 5) foram transferidos para microtubos de 0,5 mL contendo 20 µL de solução fisiológica, sendo acondicionadas 20 glândulas ou 10 intestinos por microtubo (duas glândulas ou um intestino para cada 2 µL de NaCl 0,9%). As amostras foram então submetidas a um banho ultrassônico (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EUA, modelo 1510R-MT) por 60 segundos, seguido de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi transferido para microtubos estéreis para

utilização nas análises subsequentes. Posteriormente, os extratos foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976), com base na absorbância das amostras, usando albumina sérica bovina (BSA; Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brasil) como padrão.

4.4. Obtenção de soro e plasma do Lobo-guará (*C. brachyurus*)

A captura e contenção dos animais foram conduzidas pela equipe de médicos veterinários da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZB-BH), seguindo o cronograma de manejo e avaliação sanitária dos indivíduos. Como critério de inclusão, foram consideradas apenas amostras provenientes de animais clinicamente saudáveis, conforme avaliação clínica e resultados dentro dos valores de referência para hemograma e perfil bioquímico completo. Após a contenção, a coleta sanguínea foi realizada por punção da veia cefálica, utilizando seringas e agulhas estéreis, com prévia antisepsia do local com solução alcoólica a 70%. Foram coletados 10 mL de sangue total de cada indivíduo, sendo 5 mL acondicionados em tubo estéril sem anticoagulante e 5 mL em tubo contendo 770 μL de citrato de sódio a 129 mM (correspondendo a uma proporção citrato:sangue de 1:6,5). Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e processadas dentro de um intervalo de 2 horas. A amostra sem anticoagulante foi centrifugada a 4.000 g por 5 minutos, para obtenção do soro, enquanto a amostra contendo citrato de sódio foi centrifugada a 3.000 g, por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para obtenção do plasma. Amostras provenientes de cinco exemplares de lobos-guará foram utilizadas para a formação de um *pool* de plasma e outro de soro. Posteriormente, ambos foram aliquotados em microtubos de 0,5 mL (100 μL por microtubo) e mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a execução das análises. Cada alíquota foi usada apenas uma vez.

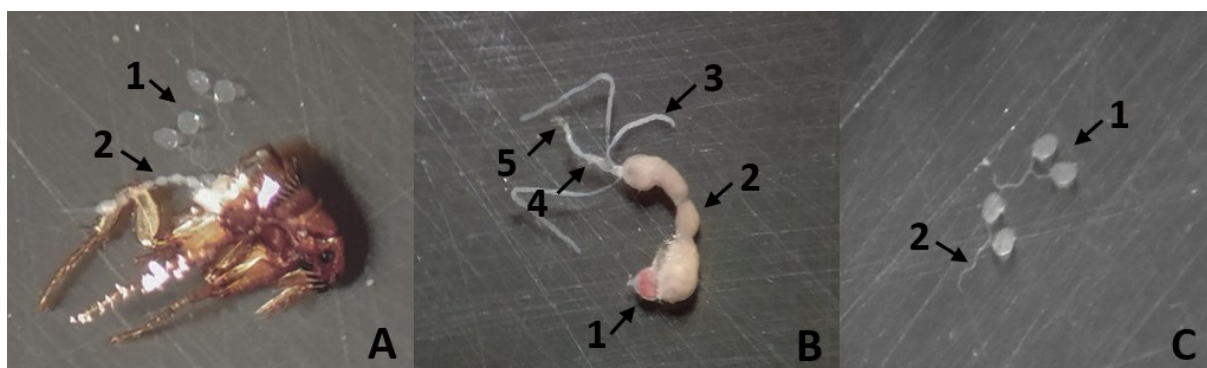


Figura 6: Espécime de pulga *Ctenocephalides felis felis* após a dissecação. Em (A): (1) dois pares de glândulas salivares e (2) cordão nervoso ventral. Em (B): sistema digestório exteriorizado: (1) proventrículo, (2) intestino médio, (3) tubo de Malpighi, (4) intestino posterior

e (5) glândulas retais. Em (C): pares de glândulas salivares, evidenciando (1) os quatro ácidos e (2) ductos salivares. Fonte: arquivo pessoal.

4.5. Obtenção de soro e plasma de cães e gatos

Para cães e gatos domésticos, as amostras sanguíneas foram coletadas considerando os mesmos critérios de inclusão amostral estabelecido para o lobo-guará, e processadas sob as mesmas condições. Entretanto, considerando o menor volume coletado (5 mL), o sangue foi igualmente dividido entre os dois tubos (2,5 mL cada), na mesma proporção anteriormente estabelecida. Nessa situação, o tubo contendo citrato de sódio recebeu 335 μ L da solução na mesma concentração (129 mM). Assim como para o lobo-guará, foi formado um *pool* de soro e outro de plasma a partir de cinco cães e cinco gatos.

4.6. Ensaio anticoagulante

Devido à ausência de protocolos de processamento anticoagulante descritos especificamente para pulgas *C. felis felis*, o presente estudo partiu de padronizações previamente estabelecidas para triatomíneos e dípteros hematófagos, conforme descrito por Ribeiro (2000) e Paim *et al.* (2011). Para os ensaios, foram utilizadas quantidades equivalentes a 15 glândulas e três intestinos. Para cada condição, o volume correspondente da amostra foi diluído em tampão HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4), de modo a completar 30 μ L finais. Em seguida, as misturas foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços, juntamente com 30 μ L de plasma obtido dos diferentes hospedeiros (lobo-guará, cão e gato doméstico), conforme metodologia acima. Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de extrato de glândulas salivares extraídas de *R. prolixus*, armazenadas em tampão HEPES, as quais apresentam atividade anticoagulante conhecida em mamíferos (Paim *et al.*, 2011), correspondendo a 7/8 unidade de glândula por repetição. Já como controle negativo, utilizaram-se 30 μ L de tampão HEPES sem EGS e EI. Além disso, considerando que as amostras de EGS e EI das pulgas estavam armazenadas em NaCl 0,9%, foi incluído um controle negativo adicional (CNA), composto pela mesma proporção de tampão HEPES e NaCl 0,9% utilizada nas amostras. Nesse controle, a fração correspondente às amostras foi substituída pelo volume equivalente de NaCl. As misturas foram incubadas a 37 °C por 5 minutos, no próprio leitor de ELISA (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA; modelo VersaMax Microplate Reader). Após esse período, a coagulação foi desencadeada pela adição de 30 μ L de CaCl_2 25 mM

pré-aquecido a 37 °C. Uma tabela contendo os volumes utilizados foi elaborada para melhor compreensão (Tabela 1). A reação foi realizada a 37 °C, e o aumento da turbidez foi monitorado a 655 nm por 200 leituras em intervalos de 10 segundos, utilizando o leitor de ELISA.

O valor do tempo de coagulação foi definido como o tempo necessário para que a turbidez atingisse uma leitura de absorvância de 0,025, sendo a absorvância no tempo zero considerada como unidades de absorvância zero (Ribeiro, 2000). O processamento foi conduzido em três repetições biológicas independentes, correspondentes a cada hospedeiro. Cada amostra foi analisada em duplicata em cada uma das repetições, e a média dos valores obtidos foi utilizada para a determinação do tempo de coagulação considerado nas análises.

Tabela 1: Volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios anticoagulante, por hospedeiro, considerando um único ensaio.

ID	EGS	EI	NaCl 0,9%	Hepes	Plasma	Ca ²⁺	Vol. Total
CN	-	-	-	30 µL	30 µL	30 µL	90 µL
CNA ¹	-	-	15 µL	15 µL	30 µL	30 µL	90 µL
CNA ²	-	-	6 µL	24 µL	30 µL	30 µL	90 µL
15 EGS pulga	15 µL	-	-	15 µL	30 µL	30 µL	90 µL
03 EI pulga	-	6 µL	-	24 µL	30 µL	30 µL	90 µL
7/8 EGS triatomíneo	5 µL	-	-	25 µL	30 µL	30 µL	90 µL

ID: identificação; EGS: extratos de glândulas salivares; EI: extratos intestinais; CN: controle negativo; CNA¹: controle negativo adicional para ensaios utilizando EGS; CNA²: controle negativo adicional para ensaios utilizando EI.

4.7. Ensaios hemolíticos anti-complemento

4.7.1. Obtenção e preparação das hemácias de carneiro

O sangue de carneiro (*Ovis aries*) adulto, necessário para os ensaios hemolíticos da via clássica do sistema complemento, foi coletado pela equipe de médicos veterinários da Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária, localizada na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após a contenção dos animais, a coleta foi realizada por punção da veia jugular, utilizando seringas de 10 mL e agulhas estéreis, com prévia antisepsia do local com solução alcoólica a 70%. Foram coletados 5 mL de sangue, os quais foram imediatamente acondicionados em tubos estéreis contendo 5 mL de solução conservadora de hemácias (glicose 113,8 mM, ácido cítrico 30 mM, NaCl 72 mM, pH 7,4). Após a coleta, o sangue foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL, em capela de fluxo laminar, e armazenado sob refrigeração a

4 °C até o uso, por um período máximo de dois meses. A metodologia de preparo das hemácias seguiu o descrito por Whaley e Northy (1997). Para isso, alíquotas armazenadas foram lavadas e opsonizadas com anticorpo anti-hemácias de carneiro, produzido previamente em coelho. Inicialmente, os microtubos de 1,5 mL contendo as hemácias foram centrifugados a 510 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento contendo as hemácias foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 15 mL (Falcon®, Corning Inc., EUA). As hemácias foram, então, lavadas três vezes por centrifugação com 5 mL da solução GHB-EDTA (Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4), por 5 minutos a 1.700 g e 4 °C, descartando o sobrenadante, ressuspensando o sedimento e homogeneizando lentamente após cada lavagem. Após essa etapa, as hemácias foram incubadas com anticorpo anti-hemácia de carneiro, na proporção de 1:1000 (1 µL para cada 1 mL presente no tubo), a 37 °C, por 30 minutos. Os anticorpos utilizados foram produzidos em coelhos imunizados com eritrócitos de carneiro e gentilmente cedidos pela Dra. Marilene S. M. Michalick (antigo Laboratório de Sorologia, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG). Concluída a opsonização, as hemácias foram lavadas novamente, uma vez com 5 mL de GHB-EDTA e duas vezes com 5 mL de GHB+2 (Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4), para remover os anticorpos não ligados. Ao final do processo, as hemácias foram ressuspensas em 10 mL de GHB+2 e sua concentração foi determinada por espectrofotometria a 414 nm, ajustando-se a densidade para 2 x 10⁸ células/mL, correspondente a uma absorvância de 0,654. As hemácias opsonizadas e lavadas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C até a realização dos ensaios hemolíticos.

4.7.2. Obtenção e preparação das hemácias de coelho.

A captura e contenção dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram realizadas pela equipe de médicos veterinários da FPMZB de Belo Horizonte. A coleta sanguínea foi conduzida mediante punção da veia auricular marginal, cefálica ou safena, utilizando seringas estéreis de 5 mL acopladas a agulhas descartáveis, após antissepsia do local com solução alcoólica a 70%. Foram coletados 2,5 mL de sangue total, que posteriormente foi acondicionado em tubos estéreis contendo 2,5 mL de solução conservadora de hemácias (glicose 113,8 mM, ácido cítrico 3 mM, NaCl 72 mM, pH 7,4). Após a coleta, o sangue misturado à solução conservadora de hemácias foi alíquotado em microtubos de 1,5 mL, sob capela de fluxo laminar, e armazenado

sob refrigeração a 4 °C até o uso por no máximo duas semanas. As amostras sanguíneas foram utilizadas para a realização dos ensaios hemolíticos da via alternativa do sistema complemento, e seu preparo foi realizado conforme descrito por Whaley e Northy (1997). Dessa forma, as alíquotas foram inicialmente centrifugadas uma vez, por 5 minutos, a 510 g a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. As hemácias foram então transferidas para um tubo cônico de polipropileno de 15 mL (Falcon®, Corning Inc., EUA) e lavadas. Foram realizadas três lavagens utilizando 5 mL da solução de Mg-EGTA (Hepes 1 mM, NaCl 30 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 7 mM, glicose 3%, gelatina 0,02%, pH 7,4), com centrifugação por 5 minutos a 1.700 g a 4 °C e descarte do sobrenadante após cada lavagem, seguido por ressuspensão e homogeneização. Após as lavagens, as hemácias foram ressuspensas em 10 mL de Mg-EGTA e sua concentração foi determinada por espectrofotometria a 414 nm, sendo ajustada para 2 x 10⁸ células/mL. As hemácias preparadas foram então armazenadas a 4 °C, podendo ser utilizadas por até uma semana.

4.7.3. Padronização da proporção de soro usada nos ensaios de hemólise

Inicialmente, foi realizada a padronização da proporção soro:tampão, utilizando amostras de lobo-guará, cães e gatos domésticos, previamente coletadas. O objetivo foi determinar a diluição que promovesse hemólise parcial próximo a 90% em ambas as vias, conforme requerido para os testes subsequentes (Pereira-Filho *et al.*, 2020). Foram avaliadas diluições de 1:1 a 1:60, utilizando Mg-EGTA para a via alternativa e GHB+2 para a via clássica do sistema complemento. Cada reação foi conduzida com um volume de 25 µL da solução do soro diluído em diferentes proporções, 25 µL do tampão (Mg-EGTA ou GHB+2) e 25 µL da suspensão de hemácias a 2 x 10⁸ células/mL (de coelho para a via alternativa e de carneiro para a via clássica), totalizando 75 µL por microtubo.

Para cada ensaio, foram utilizados dois controles diferentes: hemólise total (nas mesmas condições experimentais, utilizando a menor diluição do soro) e um controle negativo (ou hemólise espontânea, com substituição do soro por PBS 1x na mesma proporção). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 250 µL de água destilada no microtubo de hemólise total e 250 µL de PBS 1x gelado nos demais, para interromper a hemólise. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.700 g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, onde a absorbância da hemoglobina liberada foi medida em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 414 nm (Sim e Dodds, 1997), utilizando um leitor ELISA (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA; modelo VersaMax Microplate Reader). O experimento foi conduzido com três repetições biológicas independentes, sendo que, em cada repetição, as amostras foram analisadas em duplicata, com o intuito de verificar a reprodutibilidade do método. A média entre as duplicatas foi calculada e a porcentagem de hemólise foi determinada com base na absorbância do controle de hemólise total (considerada como 100%).

4.7.4. Ensaios hemolíticos da via clássica.

Após a padronização, os ensaios hemolíticos da via clássica foram realizados de acordo com Whaley e Northy (1997), com modificações realizadas por Silva *et al.* (2016), sendo conduzidos em um volume final de 75 μL . Inicialmente, o volume de solução de EGS ou EI foi adicionado separadamente aos ensaios, de modo que a quantidade de glândulas salivares ou de intestinos das pulgas correspondesse ao número a ser testado (um, dois ou quatro intestinos; dois, quatro ou oito glândulas salivares, considerando 2 μL por intestino ou por 2 glândulas). O volume de 25 μL foi então completado com solução GHB2+. Em seguida, foram adicionados 25 μL da diluição de soro de lobo-guará (1:15), cão (1:10) ou gato (1:1) em GHB2+, conforme metodologia estabelecida acima, e 25 μL da suspensão de hemácias de carneiro (2×10^8 células/mL). Os volumes utilizados encontram-se detalhados na Tabela 2, a fim de facilitar a compreensão dos procedimentos descritos.

As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 250 μL de PBS 1x gelado em cada tubo. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 1.700 g por 1 minuto a 4 °C. As etapas de processamento do sobrenadante e leitura da absorbância foram realizadas conforme descrito no item 4.7.3. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, com três repetições biológicas. Para cada experimento, foram utilizados três controles diferentes: hemólise total (na qual o PBS 1x foi substituído por água destilada), controle positivo (hemólise provocada pelo soro dos hospedeiros sem qualquer adição de EGS ou EI) e controle negativo (sem o soro dos hospedeiros, no qual ocorre apenas hemólise espontânea). Os dados foram convertidos em porcentagem de hemólise após a subtração da média dos valores obtidos nos controles negativos. Para o cálculo, considerou-se o controle de hemólise total como equivalente a 100% de atividade hemolítica, enquanto o

controle positivo apresentou valores correspondentes a aproximadamente 80–90% da hemólise total.

4.7.5. Ensaio hemolítico da via alternativa.

Os ensaios hemolíticos da via alternativa foram realizados conforme a padronização de Whaley e Northy (1997), com protocolo modificado por Silva *et al.* (2016), conduzidos em volume final de 75 μ L. O volume correspondente da solução de EGS ou EI testada foi idêntico ao padronizado na via clássica, entretanto, o volume de 25 μ L foi completado com a solução Mg-EGTA. Posteriormente, foram adicionados 25 μ L da diluição do soro de lobo-guará (1:5), cão (1:1) e gato (1:2) em Mg-EGTA, conforme padronização descrita no tópico 4.7.3, e 25 μ L da solução de hemácias de coelho (2×10^8 células/mL). Os volumes de reagentes e amostras utilizados estão detalhados na Tabela 2. A reação foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. As demais etapas e procedimentos foram realizados de forma semelhante ao ensaio da via clássica, conforme descrito anteriormente.

Tabela 2: Volumes de reagentes e amostras utilizadas nos ensaios hemolíticos da via clássica e alternativa, por hospedeiro, considerando um único ensaio.

ID microtubo	Soro diluído	PBS 1x	Hemácias de coelho ¹ ou carneiro ²	Sol. tampão (Mg-EGTA ¹ ou GHB2+ ²)	EGS	EI	Vol. Total
HT	25 μ L	-	25 μ L	25 μ L	-	-	75 μ L
C-	-	25 μ L	25 μ L	25 μ L	-	-	75 μ L
C+	25 μ L	-	25 μ L	25 μ L	-	-	75 μ L
02 EGS	25 μ L	-	25 μ L	23 μ L	2 μ L	-	75 μ L
04 EGS	25 μ L	-	25 μ L	21 μ L	4 μ L	-	75 μ L
08 EGS	25 μ L	-	25 μ L	17 μ L	8 μ L	-	75 μ L
01 EI	25 μ L	-	25 μ L	23 μ L	-	2 μ L	75 μ L
02 EI	25 μ L	-	25 μ L	21 μ L	-	4 μ L	75 μ L
04 EI	25 μ L	-	25 μ L	17 μ L	-	8 μ L	75 μ L

HT: hemólise total; C-: controle negativo; C+: controle positivo; EGS: extratos de glândulas salivares; EI: extrato intestinal; ¹Via alternativa; ²Via clássica.

4.8. Análises estatísticas

Todos os dados gerados foram organizados em uma planilha do Software Microsoft Excel 2016 (Versão 2408 Build 16.0.17928.20114). A análise dos dados ocorreu exclusivamente através de testes não paramétricos. Para comparações entre dois grupos pareados, empregou-se o teste de Wilcoxon. Para comparações entre dois grupos independentes, utilizou-se o teste de Mann–Whitney. Enquanto a comparação envolvendo mais de dois grupos independentes, utilizou-se o teste de

Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dwass–Steel–Critchlow–Fligner para as comparações múltiplas. Os dados foram analisados de acordo com Favero e Belfiore (2017). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

Ao todo, foram coletados 598 espécimes de pulgas provenientes de 14 hospedeiros, sendo nove gatos (*F. catus*) e cinco cães (*C. familiaris*). A análise morfológica confirmou a identidade de todos os exemplares como *C. felis felis*. Ainda que os exemplares tenham sido mantidos nos recipientes descritos na metodologia, permaneceram viáveis por apenas 8 a 12 horas, em média.

A dissecação dos espécimes resultou na obtenção de 1.064 glândulas salivares e 368 intestinos. A quantificação proteica revelou valores médios aproximados de 1,46 µg por intestino ($n = 28$) e 0,22 µg por glândula salivar ($n = 92$).

Ensaio anticoagulantes realizados demonstraram que a adição de extratos obtidos de 15 glândulas salivares de *C. felis felis* promoveram um aumento significativo no tempo de coagulação do plasma em todos os hospedeiros avaliados ($p < 0,05$) (Figura 6). No plasma canino, o tempo médio de coagulação passou de $98 \pm 10,5$ segundos para $149,8 \pm 27,5$ segundos, prolongando em 53% o tempo de coagulação quando comparado ao tempo basal. De forma semelhante, observou-se aumento de 35,5% no plasma do lobo-guará (de $160,5 \pm 13,9$ para $217,9 \pm 15,8$ segundos) e de 37% no plasma felino (de $115,7 \pm 23,3$ para $158,8 \pm 14$ segundos). Esses resultados indicam que o EGS apresenta atividade anticoagulante, retardando significativamente a formação do coágulo nos diferentes hospedeiros. Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas no tempo de coagulação entre os três grupos de hospedeiros ($p > 0,05$), sugerindo um perfil semelhante de atividade. Curiosamente, os extratos provenientes de três intestinos não alteraram significativamente o tempo de coagulação do plasma de nenhum dos hospedeiros testados ($p > 0,05$) (Figura 7), indicando ausência de atividade anticoagulante detectável nessa amostragem.

As análises estatísticas não indicaram diferença significativa entre ambos os controles negativos utilizados (CN e CNA), tanto para os ensaios de testagem de EGS quanto para os EI, considerando os diferentes hospedeiros ($p > 0,05$). Dessa forma, apenas um controle negativo foi representado graficamente para simplificar a

apresentação dos resultados, uma vez que ambos representam a mesma tendência experimental.

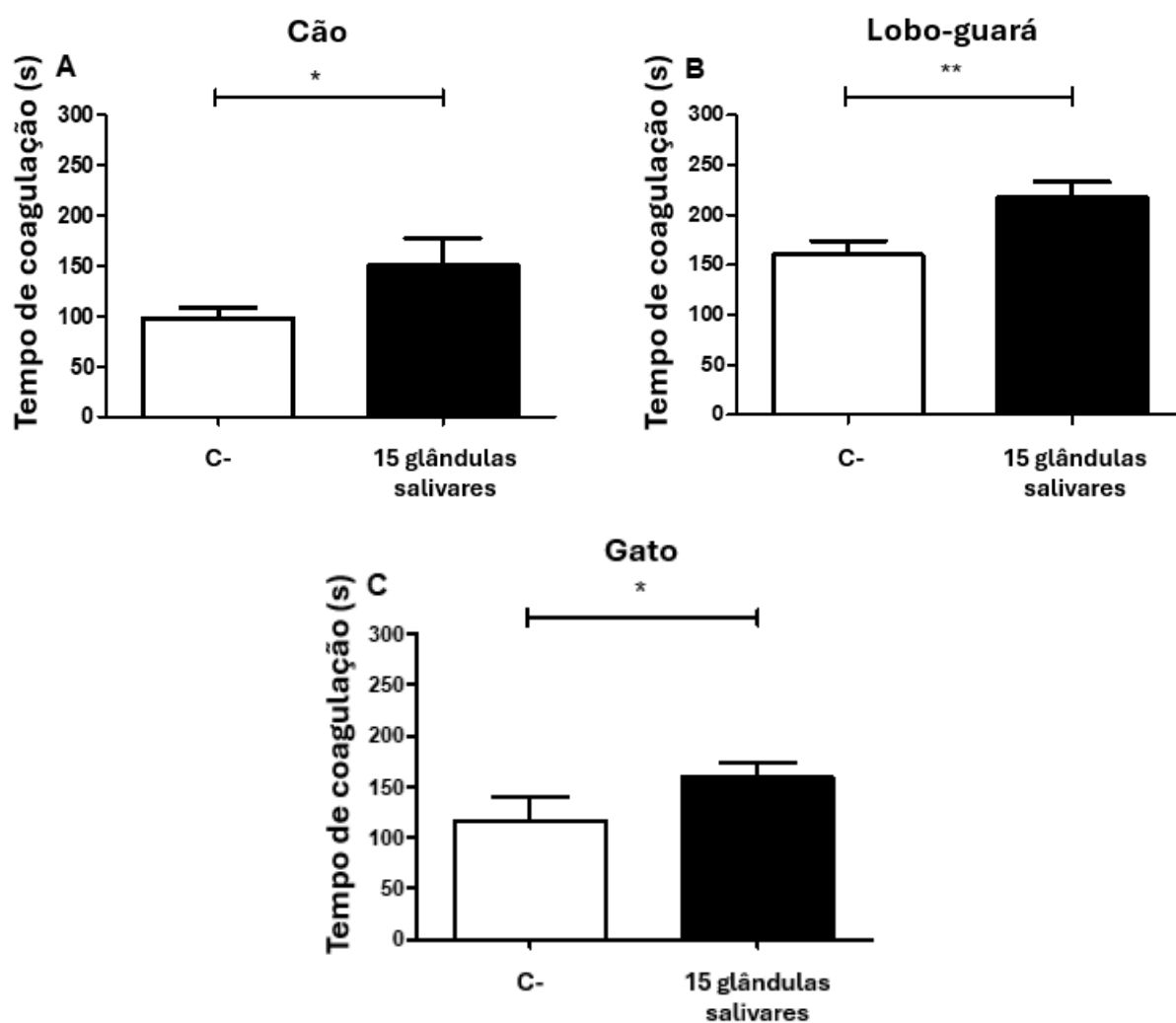


Figura 7: Efeito dos extratos de 15 glândulas salivares de *C. felis felis* sobre o tempo de coagulação do plasma de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições biológicas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Wilcoxon ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em comparação com os respectivos grupos controle). C-: Controle negativo.

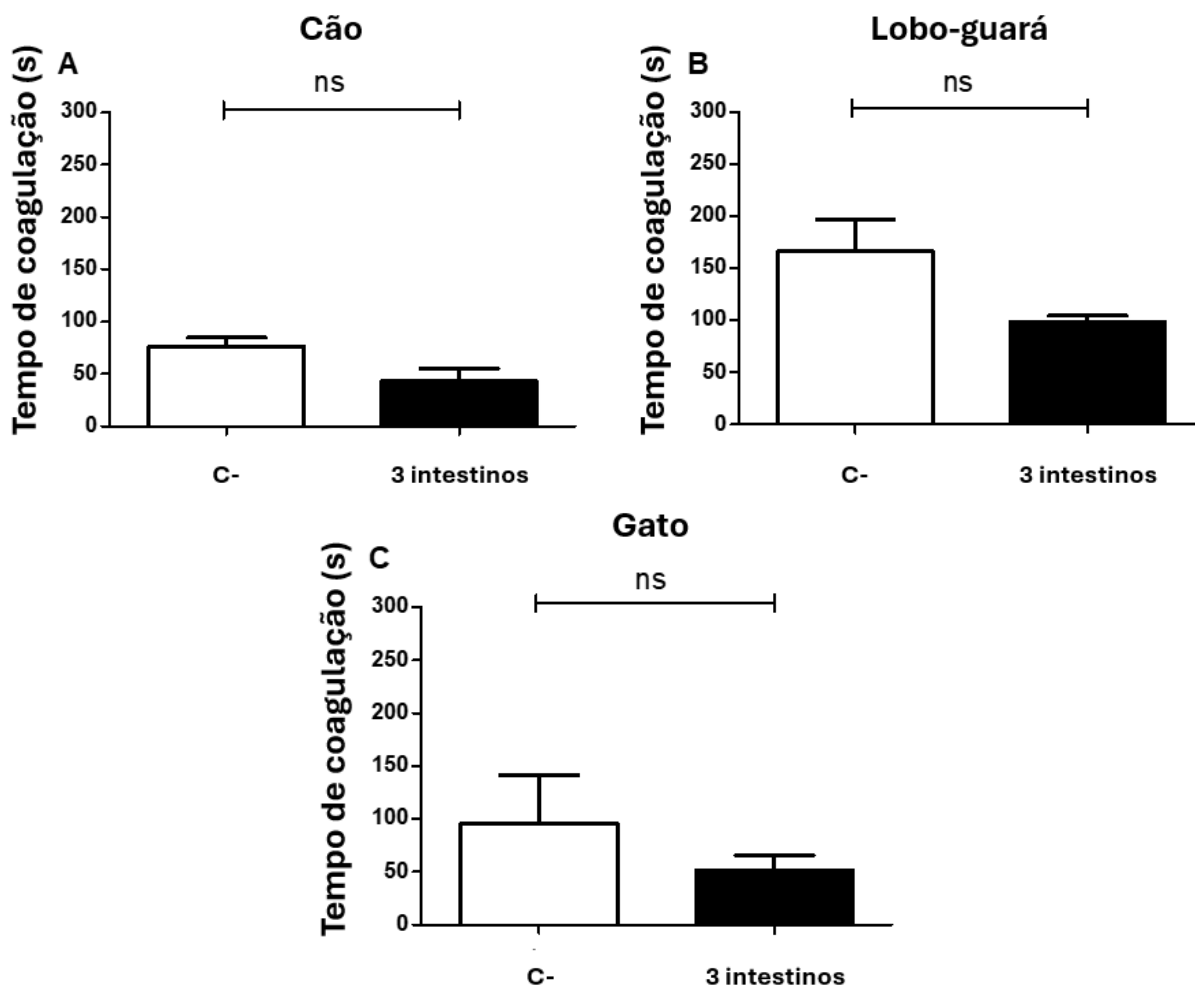


Figura 8: Efeito dos extratos de três intestinos de *C. felis felis* sobre o tempo de coagulação do plasma de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições biológicas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Wilcoxon (ns: não foram observadas diferenças significativas em comparação com os respectivos grupos controle). C-: Controle negativo.

Os resultados dos ensaios de padronização da diluição soro estão apresentados na Figura 8 (via clássica) e Figura 9 (via alternativa), contemplando as diluições que se mostraram mais próximas da faixa de hemólise considerada adequada (80–90%), bem como valores superiores e inferiores observados durante os testes. Para a via clássica, as diluições definidas foram de 1:10 para cães (média de hemólise: 91%), 1:15 para lobo-guará (89,4%) e 1:1 para gatos (87%). Em relação a via alternativa, a padronização foi estabelecida nas diluições de 1:1 para cães (89%), 1:5 para lobo-guará (93%) e 1:2 para gatos (86%).

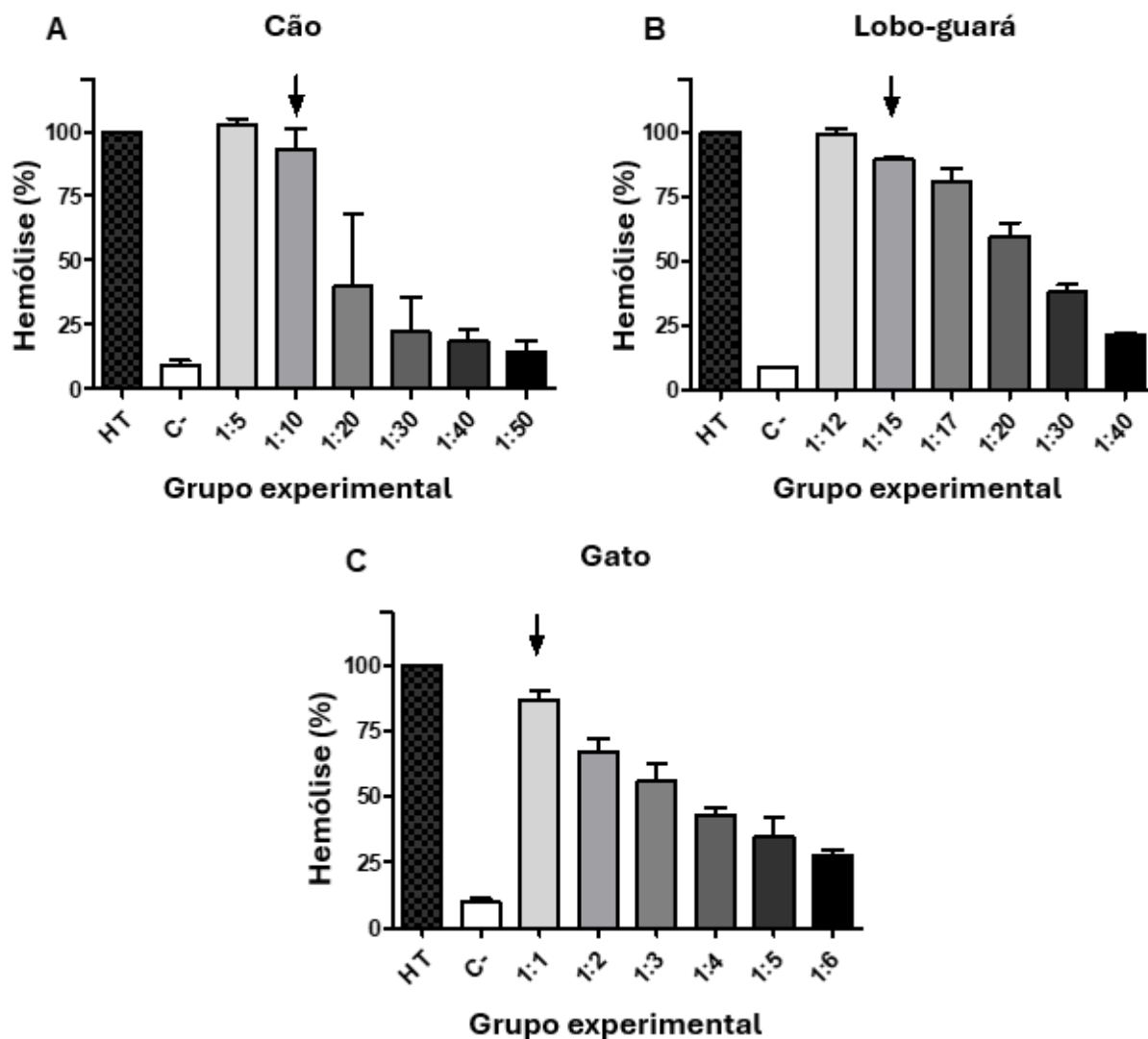


Figura 9: Padronização das concentrações séricas de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C) com base na hemólise de eritrócitos de ovelhas mediada pela via clássica do sistema complemento para cada espécie. As barras representam a média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. A seta acima de cada barra indica a concentração selecionada (correspondente a 80-90% de hemólise), utilizada em ensaios subsequentes para avaliar a atividade de extratos de glândulas salivares e intestinais de *C. felis felis*. HT: hemólise total; C-: controle negativo, amostras sem soro.

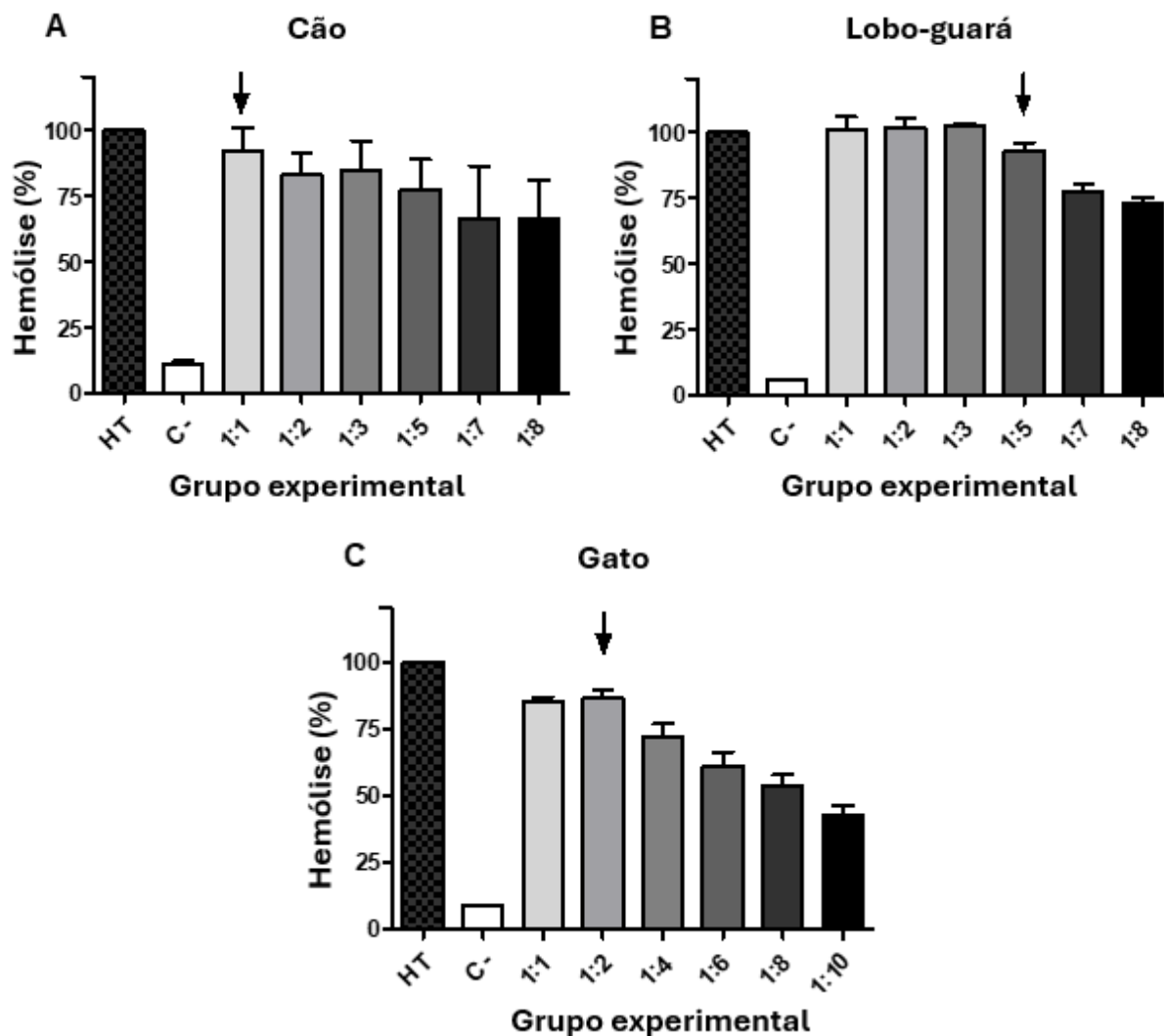


Figura 10: Padronização das concentrações séricas de cão (A), lobo-guará (B) e gato (C) com base na hemólise de eritrócitos de coelhos mediada pela via alternativa do sistema complemento. As barras representam a média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. A seta acima de cada barra indica a concentração selecionada (correspondente a 80-90% de hemólise), utilizada em ensaios subsequentes para avaliar a atividade de extratos de glândulas salivares e intestinais de *C. felis felis*. HT: hemólise total; C-: controle negativo, amostras sem soro.

Por fim, foram avaliados os efeitos inibitórios dos EGS e EI de *C. felis felis* sobre a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento. Observou-se que, na via clássica, os EGS não apresentaram efeito inibitório significativo em cães, gatos ou lobos-guará, uma vez que os níveis de hemólise permaneceram semelhantes aos dos controles positivos em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$). Em contraste, os extratos intestinais exibiram capacidade inibitória variável entre os hospedeiros, de forma dose-dependente e estatisticamente significativa (Figura 10). Em comparação com a média do controle positivo (projetado para hemolisar 80-90% das hemácias), nos cães, apenas a maior concentração (quatro intestinos) reduziu significativamente

a hemólise ($p < 0,001$), alcançando uma média de $63,7 \pm 5,8\%$ de inibição. No soro de lobo-guará e gato, tanto as concentrações intermediárias quanto a maior (dois e quatro intestinos, respectivamente) foram capazes de inibir de maneira significativa a via clássica ($p < 0,01$). No lobo-guará, os valores médios de inibição foram de $27 \pm 13,5\%$ e $30,3 \pm 12,1\%$, respectivamente, enquanto em gatos observaram-se médias de $18 \pm 5,5\%$ e $20,7 \pm 1,5\%$ para as mesmas concentrações. Apesar disso, o teste de Kruskal–Wallis não indicou diferença significativa na comparação entre os grupos quando utilizado dois e quatro intestinos ($p > 0,05$).

Já na via alternativa, tanto o EGS quanto os EI não apresentaram capacidade de inibição em nenhuma das concentrações testadas ($p > 0,05$), independentemente do hospedeiro, mesmo quando utilizada a quantidade equivalente a oito glândulas e quatro intestinos (Figura 11).

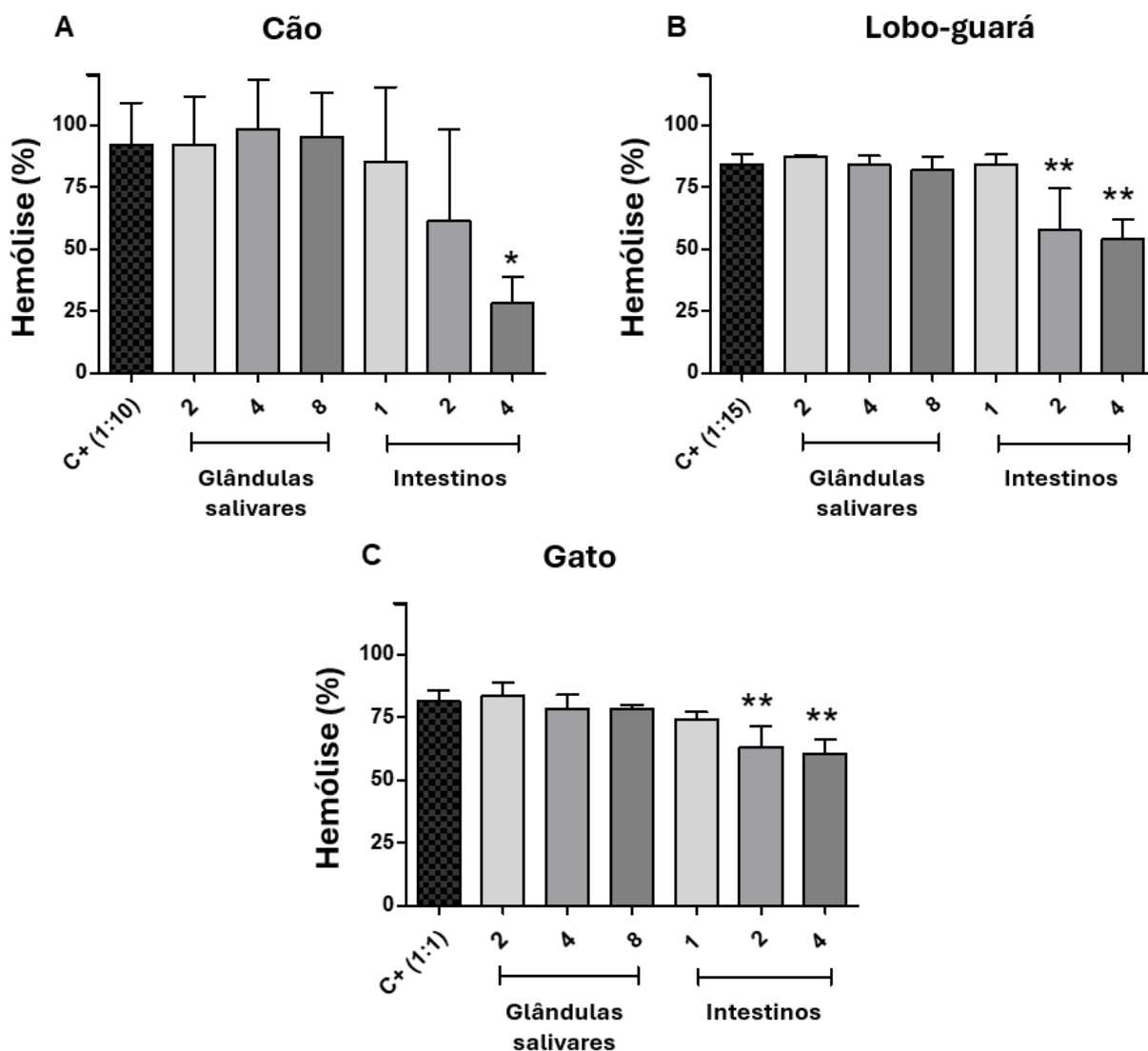


Figura 11: Efeito dos extratos de glândulas salivares e intestinais de *C. felis felis* na via clássica do sistema complemento em cão (A), lobo-guará (B) e gato (C). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann–Whitney (** $p < 0,01$; * $p < 0,001$, em comparação com os respectivos grupos controle). C+: controle positivo.

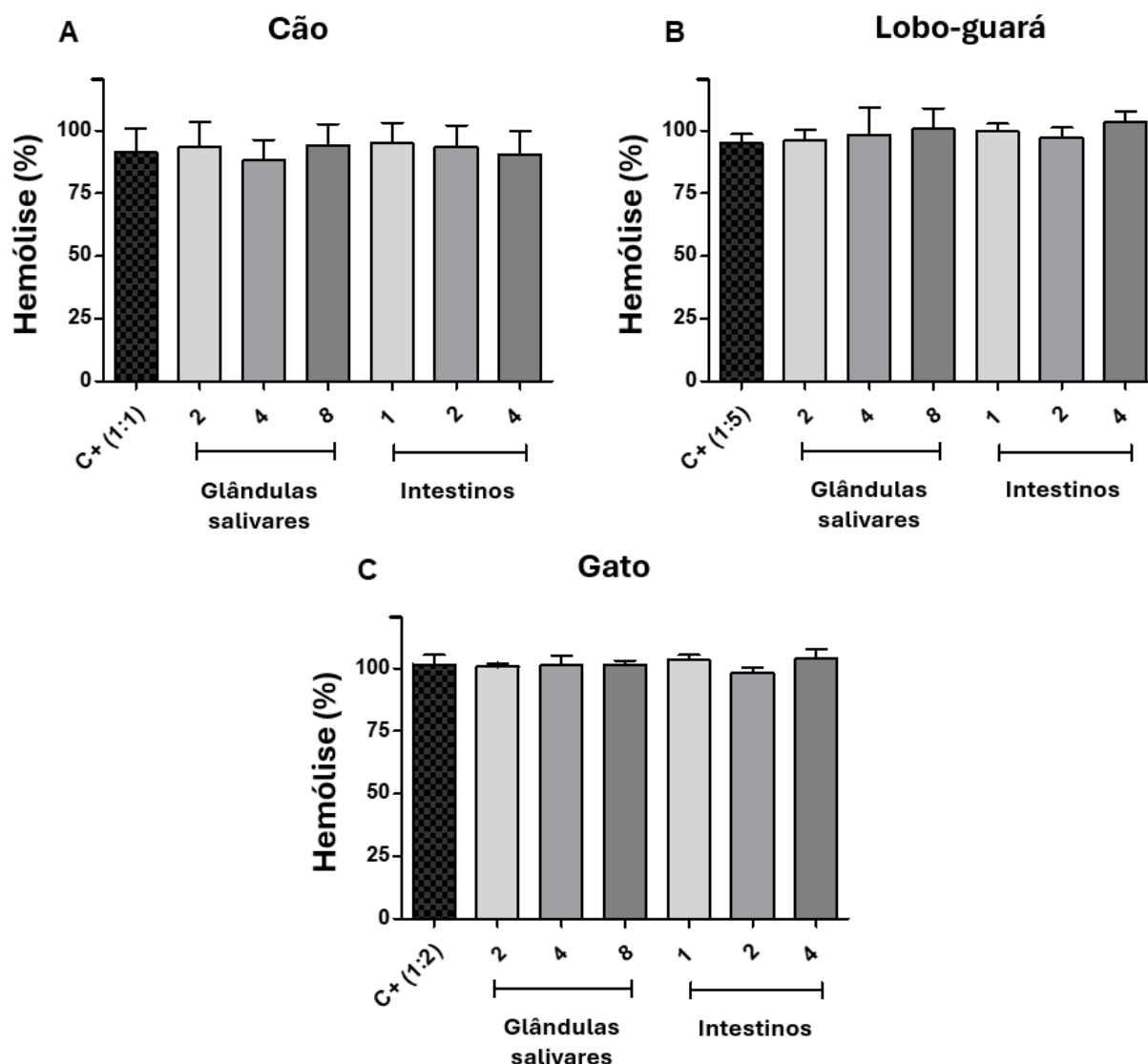


Figura 12: Efeito dos extratos de glândulas salivares e intestinais de *C. felis felis* na via alternativa do sistema complemento em cão (A), lobo-guará (B) e gato (C). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. C+: controle positivo.

6. DISCUSSÃO

De acordo com nossos conhecimentos, o presente estudo apresenta a primeira evidência experimental da presença de atividade anticoagulante em moléculas salivares de *C. felis felis*, bem como a detecção da atividade anti-complemento sobre a via clássica a partir de extratos intestinais desse parasito. Esses achados revelam mecanismos fisiológicos até então desconhecidos, ampliando a compreensão das adaptações de *C. felis felis* frente a hematofagia. Além disso, fornece novos *insights* que podem subsidiar o desenvolvimento de intervenções mais eficazes, uma vez que os componentes hemostáticos e/ou imunomodulatórios aqui identificados poderão ser

explorados como potenciais alvos na formulação de vacinas futuras, direcionadas ao controle desse artrópode.

Estudo de Linardi e Santos (2012), que compilou dados de prevalência de pulgas em cães e gatos de diferentes estados brasileiros, demonstrou uma predominância de *C. felis felis* em relação a *C. canis*, embora essa tendência não tenha sido uniforme em todas as regiões analisadas. No estado de Minas Gerais, incluído nessa compilação, a predominância de *C. felis felis* sobre *C. canis* também foi consistente, reforçando o padrão observado na região Sudeste. Essa tendência sugere que *C. felis felis* possui maior capacidade de adaptação ecológica e parasitária, especialmente em áreas urbanas e periurbanas, em concordância com a elevada ocorrência observada nos animais urbanos no presente estudo. Por outro lado, *C. canis* tende a ocorrer em áreas de maior altitude e a climas mais frios (Ahn *et al.*, 2018), enquanto *C. felis felis* está associada a climas quentes e úmidos (Moore *et al.*, 2024), o que pode contribuir para sua ausência no ambiente avaliado.

Lu *et al.* (2023) em estudos recentes sobre as proteínas provenientes das glândulas salivares de *C. felis*, identificaram a presença de 902 proteínas codificadas por RNA mensageiro (mRNA) expressos nas glândulas salivares, onde as proteínas secretadas foram a classe funcional mais prevalente. Dessa forma, estudos sobre as glândulas salivares e seu papel na fisiologia alimentar enriquecem o conhecimento das interações parasito-hospedeiro. No entanto, a atividade de proteínas salivares e intestinais da pulga *C. felis felis* tem sido pouco estudada quando comparada a outros artrópodes hematófagos.

A quantificação proteica obtida das amostras neste estudo revelou valores médios aproximados de 1,46 µg/intestino e 0,22 µg/glândula salivar, indicando maior concentração de proteínas no trato intestinal em comparação às glândulas. Esse padrão é consistente com o observado em outros artrópodes hematófagos. Em *A. aegypti*, por exemplo, foram reportadas médias de $0,81 \pm 0,02$ µg/glândula e $1,43 \pm 0,19$ µg/intestino (Pereira-Filho *et al.*, 2020), enquanto em *Lutzomyia longipalpis* as concentrações foram de $0,22 \pm 0,02$ µg por glândula e $1,1 \pm 0,09$ µg por conteúdo intestinal (Mendes-Sousa *et al.*, 2013).

Esses resultados sugerem que a maior concentração proteica encontrada nos extratos intestinais é uma característica comum entre insetos hematófagos, possivelmente relacionada ao maior tamanho do intestino somado à intensa atividade enzimática envolvida na digestão do sangue e no metabolismo de proteínas

plasmáticas (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2022). Além disso, parte das proteínas detectadas nos EI derivam diretamente da dieta, principalmente considerando que as pulgas utilizadas neste estudo não foram coletadas em jejum. Por outro lado, embora as glândulas salivares apresentem menor concentração proteica, possuem secreções ricas em moléculas bioativas, responsáveis por modular a homeostasia e a resposta imune dos hospedeiros durante o repasto sanguíneo (Champagne, 2005; Sant'Anna *et al.*, 2024).

É sabido que a concentração de proteínas plasmáticas varia significativamente entre hospedeiros vertebrados, inclusive de uma mesma espécie, refletindo diferenças fisiológicas e imunológicas (De Smet, 1978; Caron *et al.*, 2022). Essas variações interferem diretamente nos ensaios realizados, uma vez que níveis distintos de proteínas circulantes podem influenciar a sensibilidade do sistema à ação de moléculas moduladoras. No presente estudo, a utilização de diferentes diluições de soro para cão, gato e lobo-guará foi necessária para igualar a atividade das moléculas do sistema complemento entre as espécies, evitando resultados imprecisos durante a realização dos ensaios. Para reduzir ainda mais o viés individual, o preparo de um *pool* de amostras provenientes de cinco indivíduos de cada espécie, garantiu que os resultados obtidos refletissem um perfil representativo e não particular de um único hospedeiro. Dessa forma, a padronização das diluições e o uso de *pools* de soro para os ensaios anti-complemento, ou plasma para os ensaios anticoagulantes, permitiram minimizar interferências decorrentes de diferenças intrínsecas na concentração ou na potência biológica das proteínas séricas, assegurando que as variações observadas nos ensaios refletissem, de fato, diferenças reais na interação entre os extratos e a cascata de coagulação e sistema complemento de cada espécie.

Durante o processo de hematofagia, a penetração do aparelho bucal na pele do hospedeiro provoca lesões teciduais e a ruptura de pequenos vasos sanguíneos, desencadeando a ativação das vias da coagulação (Linardi e Guimarães, 2000; Chaudhry *et al.*, 2025). Dessa forma, a presença de moléculas com atividade anticoagulante é essencial para garantir o sucesso do repasto sanguíneo (Koh e Kini, 2009; Paim *et al.*, 2011). No presente estudo, foi observada uma discreta elevação do tempo de coagulação em lobo-guará, cães e gatos, associada aos EGS. Esses resultados sugerem que a saliva das pulgas contém moléculas com atividade anticoagulante local limitada. Tal perfil parece estar relacionado ao comportamento alimentar desse artrópode, caracterizado por uma hematofagia rápida e intermitente.

Estudos experimentais realizados com gatos corroboram esses achados. Cadiergues *et al.* (2000) observaram pulgas virgens ingurgitadas após 03 minutos de alimentação, sendo o tempo médio de 25 ± 18 minutos para fêmeas e 11 ± 8 para os machos. Em contrapartida, estudos com outros artrópodes hematófagos que apresentam um perfil de alimentação semelhante ao das pulgas, como *Aedes* spp., *Anopheles* spp., flebotomíneos e triatomíneos, reconhecem a elevada atividade anticoagulante desses insetos (Paim *et al.*, 2011; Collin *et al.*, 2012; Pirone *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2022).

Lu *et al.* (2021), a partir de análises transcriptômicas da pulga *Xenopsylla cheopis*, identificaram e caracterizaram um inibidor de trombina (XC-43) com alta afinidade, capaz de interferir na coagulação sanguínea. Entretanto, estudos subsequentes de Lu *et al.* (2023), empregando abordagens transcriptômicas complementadas por análise proteômica, não detectaram essa mesma molécula em *C. felis*. Contudo, esses autores relataram a presença de oito transcritos codificando inibidores de serino peptidases, além de três proteínas correspondentes identificadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Embora a função específica dessas moléculas em *C. felis felis* ainda seja desconhecida, os autores levantam a hipótese de que um desses inibidores possa atuar sobre a trombina ou no fator Xa, ou que a espécie possua um anticoagulante salivar ainda não descrito.

Uma das hipóteses é de que a presença de outros anti-hemostáticos, como vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária, compense a baixa atividade anticoagulante observada, uma vez que tais moléculas já foram descritas nas glândulas salivares de *C. felis* em análises transcriptômicas conduzidas por Lu *et al.* (2023). Além disso, evidências indicam que a agregação plaquetária desempenha papel mais relevante na hemostasia de pequenos vasos, quando comparada à coagulação (Ribeiro, 1987b; 1995; Champagne, 2004). Nesse contexto, artrópodes hematófagos que obtém sangue a partir de vasos superficiais da derme, como vênulas e arteríolas, são beneficiados quando moduladores antiagregante plaquetário estão presentes, os quais podem ser suficientes para assegurar o sucesso do repasto mesmo diante de uma atividade anticoagulante limitada.

Surpreendentemente, não foi observado aumento do tempo de coagulação nos ensaios *in vitro* utilizando EI. Pouco se sabe sobre a biologia digestiva das pulgas, e ainda são escassos os estudos voltados ao esclarecimento desses processos. No

entanto, é sabido que diversas moléculas digestivas, como proteases, estão presentes no intestino médio de artrópodos hematófagos (Ribeiro *et al.*, 2014; Pereira-Filho *et al.*, 2020; O'Donoghue *et al.*, 2025). Uma das hipóteses levantadas seria que essas enzimas possam ter degradado ou inativado os fatores anticoagulantes presentes nos extratos intestinais, impedindo a detecção de atividade inibitória nos ensaios realizados. Entretanto, essa hipótese é pouco fundamentada, pois a ação das proteases intestinais também degradaria componentes da própria cascata de coagulação, resultando em inibição da coagulação plasmática, o que não foi observado. Além disso, a não detecção de atividade anticoagulante intestinal, mediada por moléculas de origem salivar, pode ter sido comprometida pela baixa concentração, agravada pelo efeito de diluição dos extratos intestinais.

Em contraste, a hipótese mais consistente é que *C. felis felis* não dependa de mecanismos anticoagulantes em nível intestinal. Estudos comparativos conduzidos por Silverman e Appel (1994), que analisaram a quantificação proteica do sangue de gatos domésticos e das fezes de pulgas adultas alimentadas nesses mesmos hospedeiros, observaram pouca divergência nos valores proteicos. Esses resultados indicam que o sangue ingerido é rapidamente processado e eliminado em um curto intervalo de tempo, havendo pouca digestão. Tal característica representa uma adaptação evolutiva dos indivíduos adultos, que priorizam o aproveitamento dos nutrientes pelas larvas, as quais se alimentam das fezes das pulgas adultas, especialmente em locais onde há sobreposição de ovos e excretas (Kern *et al.*, 1992). Além disso, larvas bem nutridas tendem a apresentar menor incidência de canibalismo, reforçando o papel das fezes de indivíduos adultos como importante fonte de nutrientes e perpetuação da prole (Hsu *et al.*, 2002). Esse padrão, contudo, não é observado em outros artrópodes hematófagos, a exemplo de *Cimex lectularius* e *A. aegypti*, cujos estágios imaturos não consomem fezes dos indivíduos adultos ou onde não há sobreposição entre ovos e excretas (Silverman e Appel, 1994). Em contrapartida, estudos de Araújo *et al.* (2007), utilizando triatomíneos, correlacionaram a presença de anticoagulantes intestinais com a maior fluidez da ingesta ao longo do trato gastrointestinal. No entanto, a ausência de estudos transcriptômicos do intestino em pulgas *C. felis felis* limitam a compreensão sobre a participação de outros componentes anti-hemostáticos na facilitação da passagem da ingesta, visto a ausência de atividade anticoagulante aqui detectada.

Até onde sabemos, apenas um estudo investigou a presença de inibidores do sistema complemento de *C. felis* (Cavalcante *et al.*, 2003). Nesse estudo, os autores não detectaram efeito inibitório na via clássica do sistema complemento humano, sendo essa a única via avaliada. Além disso, foram utilizados apenas EGS, o que levou os autores a sugerirem que a inibição poderia ocorrer em outras vias ou por moléculas intestinais. Os resultados do presente estudo corroboram, complementam e confirmam essa hipótese. De fato, os EGS de *C. felis felis* não apresentaram atividade inibitória na via clássica, em concordância com Cavalcante *et al.* (2003). Além disso, no presente estudo, a ausência de inibição também foi observada na via alternativa, mas o EI se mostrou efetivo na inibição da via clássica, compensando a falta de inibidores salivares, embora tal efeito não tenha sido observado na via alternativa.

Sabe-se que a presença de mecanismos capazes de neutralizar o complemento é essencial à sobrevivência de artrópodes hematófagos, prevenindo lesões no epitélio intestinal decorrentes da ativação desse sistema (Barros *et al.*, 2009; Khattab *et al.*, 2015). Acredita-se que uma das particularidades das pulgas, em comparação a outros artrópodes hematófagos, seja a ausência de produção de matriz peritrófica pelas células epiteliais do intestino médio (Vaughan e Azad, 1993). Essa matriz atua como uma barreira semipermeável que protege o epitélio intestinal contra danos mecânicos, patógenos e toxinas, além de regular a digestão e a passagem de moléculas no intestino médio (Lehane, 1997). Estudos transcriptômicos realizados com *C. felis* (Gaines *et al.*, 2003) e *X. cheopis* (Bland *et al.*, 2020) identificaram a expressão de genes codificadores de peritrofinas (proteínas associadas à matriz peritrófica) contudo, em ambas as espécies, não foram encontradas evidências morfológicas da formação de uma matriz funcional. A ausência dessa estrutura torna o epitélio intestinal das pulgas diretamente exposto ao sangue ingerido, elevando a importância de mecanismos complementares de proteção (Vaughan e Azad, 1993; Barros *et al.*, 2009), como a inibição do sistema complemento aqui observado.

Embora *C. brachyurus* apresente manifestações clínicas mais intensas frente ao parasitismo pulgas *C. felis felis* (Maia e Gouveia, 2003; Cubas *et al.*, 2007), os resultados do presente estudo indicaram um perfil de atividade semelhante entre os hospedeiros avaliados. Estudos anteriores, como o de Mendes-Sousa *et al.* (2013), investigaram a ação dos inibidores salivares e intestinais sobre o soro de diferentes espécies e observaram que a saliva de *L. longipalpis* foi capaz de inibir a via clássica

do sistema complemento em cães, porquinhos-da-índia e ratos, mas não exerceu efeito significativo sobre o complemento de galinhas. Assim, a ausência de diferenças entre lobo-guará, cão e gato observado neste estudo pode estar atrelado à semelhança estrutural e funcional dos componentes do sistema complemento entre mamíferos, o que possivelmente limita variações significativas na ação dos inibidores salivares e intestinais dentro de um mesmo grupo.

Uma das hipóteses que talvez justifique a maior suscetibilidade de animais cativos às infestações por *C. felis felis*, incluindo o lobo-guará, pode estar relacionada a fatores ambientais e de manejo (Cubas *et al.*, 2007). A presença de substratos nos recintos, por exemplo, pode favorecer a permanência e o desenvolvimento dos estágios imaturos do ectoparasito. Além disso, o uso repetido e restrito das mesmas áreas de descanso pelos animais, decorrente da limitação espacial dos recintos, contribui para o acúmulo de formas livres no ambiente (Cubas *et al.*, 2007; Dahm *et al.*, 2021). Essa sobreposição entre áreas de descanso e locais de oviposição das pulgas aumenta o contato dos hospedeiros com as formas ambientais e fornece maior disponibilidade de nutrientes (fezes e outros detritos orgânicos) para o desenvolvimento larval, favorecendo a manutenção e o fechamento do ciclo parasitário (Kern *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 2002).

Clark *et al.* (2018) demonstraram que o uso de habitats antropogênicos por animais silvestres eleva em até 256% o risco de infestação por *C. felis*, em comparação com espécies que não utilizam esses ambientes, evidenciando a importância da sobreposição de habitats na dinâmica das infestações. Nesse contexto, a FPMZB de Belo Horizonte está inserida em uma área urbana cercada por domicílios e, apesar da proibição, é comum a circulação de cães e gatos domésticos errantes nas dependências do parque, o que aumenta a probabilidade de contato indireto entre animais domésticos e silvestres. Além disso, o contato com a fauna sinantrópica local, somado à intensa visitação pública, ambos potenciais carreadores de ectoparasitos, sobretudo em estágios imaturos, favorece a introdução e a manutenção de populações no ambiente. Assim, a proximidade com fontes recorrentes de ectoparasitos, aliada às limitações de espaço e ao confinamento dos animais, pode explicar a maior intensidade das manifestações clínicas observadas em lobos-guará mantidos sob condições de cativeiro.

Em adição, a gravidade do parasitismo pode ser decorrente de processos inflamatórios locais associados a espoliação sanguínea, combinado a processos

sistêmicos generalizados, os quais podem ou não estar relacionados ao grau de infestação. Nesse contexto, a hipersensibilização aos componentes salivares de *C. felis felis* desempenha papel central, desencadeando dermatite alérgica caracterizada por prurido intenso, automutilação e imunomodulação, podendo agravar comorbidades preexistentes e predispor ao desenvolvimento de infecções bacterianas oportunistas. Em cães domésticos, por exemplo, a resposta sistêmica ao parasitismo se manifesta primariamente a partir da resposta cutânea (Gross e Halliwell, 1985; Wilkerson *et al.*, 2004), no entanto, são necessários estudos que investiguem como os lobos-guará respondem as manifestações sistêmicas decorrente do parasitismo, como respostas medulares. Assim, é provável que exista um impacto sanitário subestimado na espécie, decorrente de uma resposta sistêmica exacerbada, hipótese que necessita ser investigada em estudos futuros voltados à imunopatogênese da infestação.

Em contrapartida, até onde sabemos, não há registros de óbito de lobos-guará de vida livre por infestações de pulgas. Uma das características que pode justificar esse fato está relacionada ao seu comportamento *in situ*. Em ambiente natural, *C. brachyurus* apresenta atividade predominante crepuscular e noturna, permanecendo em repouso durante o período diurno, geralmente abrigado em tocas temporárias sob arbustos densos ou em áreas com gramíneas altas, evitando o calor extremo (Dietz, 1984; Coelho *et al.*, 2008). Ao anoitecer, se deslocam por dezenas de quilômetros em um único dia, em busca de recursos alimentares (Paula *et al.*, 2013). Sua maior atividade noturna contrasta com o maior período reprodutivo das pulgas, quando as fêmeas realizam a ovoposição (Dryden, 1989). Esse padrão mantém a dispersão das formas ambientais do pulicídeo, quando os indivíduos estão parasitados, em vez de sua concentração em locais de repouso, o que limita a reinfestação e reduz a probabilidade de manter altas infestações.

Todos os ensaios anti-complemento realizados neste estudo foram conduzidos em pH 7,4, que corresponde ao pH fisiológico do sangue e dos tecidos de hospedeiros mamíferos, condição na qual o sistema complemento apresenta melhor atividade. No entanto, após o repasto sanguíneo, o pH do sangue ingerido pode sofrer alterações significativas no interior do trato digestivo dos artrópodes hematófagos. Em *A. sculptum* e *L. longipalpis*, por exemplo, foi observado que o sangue ingerido sofre leve alcalinização dentro do intestino médio, atingindo valores médios de pH $8,04 \pm 0,08$ e $8,15$, respectivamente (Mendes-Sousa *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2016). Em

contraste, estudos realizados com triatomíneos demonstram uma tendência oposta, caracterizada pela acidificação do conteúdo intestinal após a ingestão de sangue, atingindo valores de pH de $7,02 \pm 0,05$ (Barros *et al.*, 2009).

Essas variações refletem adaptações fisiológicas específicas de cada artrópode e podem influenciar diretamente a estabilidade e a atividade dos componentes do sistema complemento, bem como a eficácia dos inibidores produzidos por eles. De modo geral, os estudos indicam que flutuações no pH intestinal têm potencial para modular a ação do sistema complemento, favorecendo a atividade de inibidores em ambientes mais alcalinos (como observado em *A. sculptum*) (Franco *et al.*, 2016), enquanto pHs fora da faixa fisiológica (acima de 7,5 ou abaixo de 7,0) tendem a reduzir a eficiência da via alternativa, conforme relatado para *L. longipalpis* e triatomíneos (Barros *et al.*, 2009; Mendes-Sousa *et al.*, 2013).

Até o momento, não há informações disponíveis sobre o pH intestinal de *C. felis*, o que representa uma lacuna importante para o entendimento de sua biologia digestiva e das interações com o sistema imune do hospedeiro. Se os inibidores são realmente necessários para a proteção do epitélio intestinal, entende-se que o complemento estará ativo neste novo ambiente (Sant'Anna *et al.*, 2024). A determinação desse parâmetro, aliada à realização de ensaios anti-complemento em diferentes condições de pH, é essencial para aprofundar o conhecimento sobre o papel funcional das moléculas salivares e intestinais na evasão imune e na proteção do epitélio digestivo.

A coleta das pulgas por conveniência representou uma das principais limitações do estudo. Além da dificuldade em encontrar indivíduos naturalmente parasitados, foi necessário mantê-los vivos até o momento da dissecação, o que se mostrou um desafio, visto que *C. felis felis* apresenta baixa sobrevivência fora do hospedeiro após o início da hematofagia. Em nossa experiência, considerando o processo de dissecação, não recomendamos o congelamento das pulgas por períodos superiores a 10 minutos, pois esse procedimento pode provocar a ruptura das glândulas salivares, inviabilizando sua obtenção. Além disso, como insetos já possuem um tegumento naturalmente rígido em função da elevada quantidade de quitina (Hahn *et al.*, 2018), o ressecamento em decorrência do congelamento torna seu exoesqueleto quebradiço, dificultando a dissecação e aquisição do material.

A ausência de controle sobre o período de alimentação dos artrópodes pode ter influenciado as quantificações proteicas obtidas dos EGS e EI. O processo de

hematofagia, associada à não exclusão de amostras intestinais contendo sangue, possivelmente contribuiu para o aumento nos valores proteicos detectados nos EI. Danchenko e Makaluso (2024) apontam que as glândulas salivares das pulgas sofrem alterações estruturais ao longo do ciclo de vida, apresentando hiperplasia em fases alimentares mais avançadas. Tais modificações estão associadas a processos fisiológicos mais amplos, uma vez que a maturação das gônadas e a oviposição resultam em alterações tanto nas glândulas salivares quanto no epitélio do intestino médio. Além disso, particularmente nas fêmeas, a maturação do oócito leva a um aumento expressivo do tamanho das células salivares, refletindo a estreita relação entre estado nutricional e reprodutivo na atividade secretora desses órgãos. No entanto, as pulgas são insetos hematófagos que se alimentam várias vezes ao dia, mantendo uma atividade alimentar frequente (Silverman e Appel, 1994). Isso contrasta com outros insetos hematófagos, como triatomíneos, mosquitos e flebotomíneos, que tipicamente apresentam longos intervalos entre as refeições de sangue (Otálora-Luna *et al.*, 2015; Brackney *et al.*, 2021). Nesses insetos, a atividade das glândulas salivares segue ciclos mais definidos de depleção durante a alimentação e reposição relativamente lenta posteriormente. Nas pulgas, o padrão de alimentação mais contínuo provavelmente sustenta uma atividade metabólica mais constante nas glândulas salivares, potencialmente reduzindo a variabilidade intra-amostra associada ao estágio de alimentação.

Neste estudo, não foi objetivo identificar a molécula salivar responsável pela atividade anticoagulante, nem a molécula intestinal associada à inibição da via clássica do sistema complemento, tampouco determinar em qual etapa dessa cascata ocorre a atividade observada. Apesar dessas limitações, os resultados obtidos são consistentes e fornecem evidências importantes sobre o potencial modulador de *C. felis felis* nas respostas hemostáticas e imunológicas dos hospedeiros, contribuindo de forma inédita para a compreensão da interação parasito-hospedeiro.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a hipótese inicial de que as pulgas apresentariam maior eficiência alimentar sobre o sangue do lobo-guará em comparação aos mamíferos domésticos não tenha sido confirmada, este estudo fornece a primeira evidência científica de que a modulação do sistema complemento ocorre predominantemente pela via clássica nos hospedeiros mamíferos avaliados e ensaios realizados, e é desencadeada

predominantemente pelo intestino, enquanto as glândulas salivares atuam em respostas imunofisiológicas locais, com destaque para o efeito anticoagulante.

Esses achados representam um avanço no entendimento dos mecanismos fisiológicos dessa espécie, contribuindo para preencher lacunas importantes sobre a biologia das pulgas e aprofundar o conhecimento acerca das complexas interações entre ectoparasitos e hospedeiros silvestres, especialmente em contextos de cativeiro e proximidade com ambientes urbanos. Os resultados também oferecem subsídios relevantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação e de controle de ectoparasitos, além de embasar processos de tomada de decisão por gestores de saúde e conservação da fauna silvestre.

As limitações levantadas reforçam a necessidade de que estudos futuros adotem estratégias de coleta mais criteriosa, como a manutenção das pulgas em insetário e principalmente o controle do período de hematofagia, a fim de minimizar viés experimental e aumentar a robustez dos achados.

Além disso, sugerimos que futuras investigações preencham lacunas sobre a biologia intestinal das pulgas, além de explorar a realização dos ensaios sob diferentes condições de pH, além de caracterizar as moléculas anticoagulantes e imunomodulatórias envolvidas nos processos. Outras estratégias de modulação e evasão imunológica, como a interação com a via da lectina, a captação do fator H e a presença de atividades antiagregante plaquetária e vasodilatadora, também se tornam necessárias. Adicionalmente, estudos direcionados às respostas orgânicas do lobo-guará, como alterações hematológicas, bioquímicas, imunológicas e medulares frente a pulicose, podem ampliar a compreensão sobre a maior sensibilidade dessa espécie às picadas de *C. felis felis*.

8. CONCLUSÕES

- Nas condições experimentais empregadas, *C. felis felis* apresentou baixa sobrevivência quando estão fora do hospedeiro, principalmente após o início do processo de hematofagia, exigindo sua manutenção em condições controladas de insetário.
- Os processamentos realizados indicam que a saliva está associada principalmente à interferência na coagulação sanguínea, enquanto moléculas da origem intestinal estiveram relacionadas a modulações do sistema complemento, exclusivamente na via clássica.

- As interações observadas entre o extrato intestinal e a via clássica do sistema complemento, bem como entre o extrato de glândulas salivares e a cascata de coagulação, ocorreram de maneira semelhante entre as espécies avaliadas, sendo compatíveis com a utilização desses carnívoros como hospedeiros habituais de *C. felis felis* nas condições analisadas.

9. REFERÊNCIAS

- Ahn, K. S., Huh, S. E., Seol, S. W., Kim, H. J., Suh, K. H., & Shin, S. (2018). *Ctenocephalides canis* is the dominant flea species of dogs in the Republic of Korea. *Parasites & vectors*, 11(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2769-9>
- Amini Rarani, S., Azami, M., Kiani, F., & Kazeroni, T. B. (2023). First case report of hospital staff infestation with cat flea (*Ctenocephalides felis*) in Iran. *GMS hygiene and infection control*, 18, Doc06. <https://doi.org/10.3205/dgkh000432>
- Araújo, F. R., Silva, M. P., Lopes, A. A., Ribeiro, O. C., Pires, P. P., Carvalho, C. M., Balbuena, C. B., Villas, A. A., & Ramos, J. K. (1998). Severe cat flea infestation of dairy calves in Brazil. *Veterinary parasitology*, 80(1), 83–86. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00181-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00181-2)
- Araujo, R. N., Campos, I. T., Tanaka, A. S., Santos, A., Gontijo, N. F., Lehane, M. J., & Pereira, M. H. (2007). Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *International journal for parasitology*, 37(12), 1351–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.017>
- Arcà, B., e Ribeiro, J. M. (2018). Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. *Current opinion in insect science*, 29, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.07.012>
- Arrais, R. C., Paula, R. C., Martins, T. F., Nieri-Bastos, F. A., Marcili, A., e Labruna, M. B. (2021). Survey of ticks and tick-borne agents in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from a natural landscape in Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101639. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101639>
- Azarm, A., Dalimi, A., Pirestani, M., Mohammadiha, A., Zahraei-Ramazani, A., Marvi-Moghaddam, N., e Amiri, E. (2022). *Pulex irritans* on Dogs and Cats: Morphological and Molecular Approach. *Journal of arthropod-borne diseases*, 16(3), 196–205. <https://doi.org/10.18502/jad.v16i3.12035>
- Bagoly, Z., Koncz, Z., Hársfalvi, J., & Muszbek, L. (2012). Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thrombosis research*, 129(3), 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.040>
- Barbieri, R., Signoli, M., Chev e, D., Costedoat, C., Tzortzis, S., Aboudharam, G., Raoult, D., e Drancourt, M. (2020). *Yersinia pestis*: the Natural History of

Plague. *Clinical microbiology reviews*, 34(1), e00044-19.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00044-19>

Barros, V. C., Assumpção, J. G., Cadete, A. M., Santos, V. C., Cavalcante, R. R., Araújo, R. N., Pereira, M. H., e Gontijo, N. F. (2009). The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS one*, 4(6), e6047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006047>

Bastos, M. C. C., Pestana, M. C. A., e Oliveira, R. F. (2023). Legislative inertia fails Brazil's Cerrado. *Science (New York, N.Y.)*, 382(6674), 1008.
<https://doi.org/10.1126/science.adm7683>

Bastos, T. S. A., Madrid, D. M. de C., Faria, A. M., Freitas, T. M. S., e Linhares, G. F. C.. (2016). Carrapatos em animais silvestres do bioma cerrado triados pelo CETAS, Ibama-goiás. *Ciência Animal Brasileira*, 17(2), 296–302.
<https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i236239>.

Begon, M., Bennett, M., Bowers, R. G., French, N. P., Hazel, S. M., & Turner, J. (2002). A clarification of transmission terms in host-microparasite models: numbers, densities and areas. *Epidemiology and infection*, 129(1), 147–153.
<https://doi.org/10.1017/s0950268802007148>

Beugnet, F., Labuschagne, M., Fourie, J., Jacques, G., Farkas, R., Cozma, V., Halos, L., Hellmann, K., Knaus, M., & Rehbein, S. (2014). Occurrence of *Dipylidium caninum* in fleas from client-owned cats and dogs in Europe using a new PCR detection assay. *Veterinary parasitology*, 205(1-2), 300–306.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.008>

Beugnet, F., Porphyre, T., Sabatier, P., & Chalvet-Monfray, K. (2004). Use of a mathematical model to study the dynamics of *Ctenocephalides felis* populations in the home environment and the impact of various control measures. *Parasite (Paris, France)*, 11(4), 387–399. <https://doi.org/10.1051/parasite/2004114387>

Billingsley P. F. (1990). Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 15(3), 149–163.
<https://doi.org/10.1002/arch.940150304>

Bland, D. M., e Hinnebusch, B. J. (2016). Feeding Behavior Modulates Biofilm-Mediated Transmission of *Yersinia pestis* by the Cat Flea, *Ctenocephalides felis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004413.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004413>

Bland, D. M., Martens, C. A., Virtaneva, K., Kanakabandi, K., Long, D., Rosenke, R., Saturday, G. A., Hoyt, F. H., Bruno, D. P., Ribeiro, J. M., & Hinnebusch, B. J. (2020). Transcriptomic profiling of the digestive tract of the rat flea, *Xenopsylla cheopis*, following blood feeding and infection with *Yersinia pestis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(9), e0008688. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008688>

Boyer, S., Gillespie, T. R., e Miarinjara, A. (2022). *Xenopsylla cheopis* (rat flea). *Trends in parasitology*, 38(7), 607–608. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.03.006>

Brackney, D. E., LaReau, J. C., & Smith, R. C. (2021). Frequency matters: How successive feeding episodes by blood-feeding insect vectors influences disease transmission. *PLoS pathogens*, 17(6), e1009590. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009590>

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Brasil (2024). Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. *Release conjunto ABINPET IPB – Fechamento 2023: 39ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial de Animais de Estimação*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/animais-e-estimacao/2024/39a-ro-30-04-2024/release_conjunto_abinpet_ipb_fechamento23.pdf Acessado em 24 de julho de 2025.

Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*, 25(4), 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>

Bueno, A. A., e Motta-Junior, J. C. (2004). Food habits of two syntopic canids, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), in southeastern Brazil. *Revista Chilena de História Natural*, 77, 5-14. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100002>

Cadiergues, M. C., Hourcq, P., Cantaloube, B., & Franc, M. (2000). First bloodmeal of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) on cats: time to initiation and duration of feeding. *Journal of medical entomology*, 37(4), 634–636. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.4.634>

Caravedo Martinez, M. A., Ramírez-Hernández, A., e Blanton, L. S. (2021). Manifestations and Management of Flea-Borne Rickettsioses. *Research and reports in tropical medicine*, 12, 1–14. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S274724>

Carlotti, D. N., e Jacobs, D. E. (2000). Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. *Veterinary dermatology*, 11(2), 83–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2000.00204.x>

Carneiro-Filho, A., e Costa, K. (2016). *The expansion of soybean production in the Cerrado*. Agroícone/INPUT.

Caron, B., Patin, E., Rotival, M., Charbit, B., Albert, M. L., Quintana-Murci, L., Duffy, D., Rausell, A., & Milieu Intérieur Consortium (2022). Integrative genetic and immune cell analysis of plasma proteins in healthy donors identifies novel associations

involving primary immune deficiency genes. *Genome medicine*, 14(1), 28.
<https://doi.org/10.1186/s13073-022-01032-y>

Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., e Gontijo, N. F. (2003). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, 127 (Pt 1), 87–93. <https://doi.org/10.1017/s0031182003003329>

Cermolacce, A., Lacoste, R., Moulin, V., Briand, A., e Bakker, J. (2023). Successful Treatment of Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) Infested with Common Cat Fleas (*Ctenocephalides felis*) by Using Topical Imidacloprid and Environmental Control Measures. *Veterinary sciences*, 10(9), 580.
<https://doi.org/10.3390/vetsci10090580>

Champagne D. E. (2004). Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders, 4(4), 375–396.
<https://doi.org/10.2174/1568006043335862>

Champagne D. E. (2005). Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 34(4-5), 221–227.
<https://doi.org/10.1159/000092428>

Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood reviews*, 29(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>

Chaudhry, R., Killeen, R. B., & Babiker, H. M. (2025). Physiology, Coagulation Pathways. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Clark, N. J., Seddon, J. M., Šlapeta, J., e Wells, K. (2018). Parasite spread at the domestic animal - wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides* spp.) infestation in wild mammals. *Parasites e vectors*, 11(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2564-z>

Coban, A., Bornberg-Bauer, E., & Kemena, C. (2022). Domain Evolution of Vertebrate Blood Coagulation Cascade Proteins. *Journal of molecular evolution*, 90(6), 418–428. <https://doi.org/10.1007/s00239-022-10071-3>

Coelho, C. M., de Melo, L. F. B., Sábato, M. A. L., Vaz Magni, E. M., Hirsch, A., & Young, R. J. (2008). Habitat use by wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in a transition zone environment. *Journal of Mammalogy*, 89(1), 97–104.
<https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A-383.1>

Coles, T. B., & Dryden, M. W. (2014). Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites & vectors*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-8>

Collin, N., Assumpção, T. C., Mizurini, D. M., Gilmore, D. C., Dutra-Oliveira, A., Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Teixeira, C., Ribeiro, J. M., Monteiro, R. Q., Valenzuela, J. G., & Francischetti, I. M. (2012). Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 32(9), 2185–2198.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.253906>

Comizzoli, P., Crosier, A. E., Songsasen, N., Gunther, M. S., Howard, J. G., & Wildt, D. E. (2009). Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, 47–52.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01373.x>

Contreras, M., Villar, M., Artigas-Jerónimo, S., Kornieieva, L., Mytrofanov, S., e de la Fuente, J. (2018). A reverse vaccinology approach to the identification and characterization of *Ctenocephalides felis* candidate protective antigens for the control of cat flea infestations. *Parasites e vectors*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2618-x>

Costa, A. L. M., Teixeira, R. H. F., Paschoalotti, M. H., Gomes, R. P., Felippi, D. A., & Franco, P. N. (2019). Controle de pulgas em cervo-do-pantanal (*Blastocercus dichotomus*) de cativeiro com uso de coleira com imidacloprida e flumetrina. *Veterinária e Zootecnia*, 26, 1–7.

Costa, G. C. A., Ribeiro, I. C. T., Melo-Junior, O., Gontijo, N. F., Sant'Anna, M. R. V., Pereira, M. H., Pessoa, G. C. D., Koerich, L. B., Oliveira, F., Valenzuela, J. G., Giunchetti, R. C., Fujiwara, R. T., Bartholomeu, D. C., & Araujo, R. N. (2021). *Amblyomma sculptum* Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines. *Frontiers in immunology*, 11, 611104.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611104>

Cubas, Z. S., Catão-Dias, J. L., & Silva, J. C. R. (Eds.). (2007). *Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária*. São Paulo, SP: Roca.

Curi, N. H.A., Coelho, C. M., de Campos Cordeiro Malta, M., Magni, E. M., Sábato, M. A., Araújo, A. S., Lobato, Z. I., Santos, J. L., Santos, H. A., Ragozo, A. A., e de Souza, S. L. (2012). Pathogens of wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 48(4), 1052–1056. <https://doi.org/10.7589/2011-10-304>

Curi, N.H.A.; Araújo, A.S.; Campos, F.S.; Lobato, Z.I.P.; Gennari, S.M.; Marvulo, M.F.V.; Silva, J.C.R.; Talamoni, S.A. (2010). Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: Disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation*, 19: 3513-3524. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9911-0>

Dahm, J. R., Bailey, J. B., Kelly, R. F., Chikungwa, P., Chulu, J., Junior, L. C., Freeman, E. J., Mayer, D., Mazeri, S., & Sargison, N. D. (2021). Risk factors associated with *Ctenocephalides felis* flea infestation of peri-urban goats: a neglected parasite in an under-appreciated host. *Tropical animal health and production*, 53(1), 181. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02620-7>

Danchenko, M., e Macaluso, K. R. (2024). Salivary glands of the cat flea, *Ctenocephalides felis*: Dissection and microscopy guide. *Current research in insect science*, 5, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2024.100080>

- Dantas-Torres, F., Melo, M. F., Figueredo, L. A., & Brandão-Filho, S. P. (2009). Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 18(3), 75–77. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01803014>
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science (New York, N. Y.)*, 287(5452), 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
- de Avelar, D. M., Bussolotti, A. S., do Carmo A Ramos, M., e Linardi, P. M. (2007). Endosymbionts of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) obtained from dogs captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Journal of invertebrate pathology*, 94(2), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.10.001>
- De Avelar, D. M., e Linardi, P. M. (2008). Seasonality and prevalence rates of *Steinina* sp. (Eugregarinorida: Actinocephalidae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) from dogs captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Journal of medical entomology*, 45(6), 1139–1142. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[1139:sapros\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[1139:sapros]2.0.co;2)
- De Smet, W. H. (1978). O conteúdo total de proteínas no soro sanguíneo de vertebrados. *Acta zoologica et pathologica Antverpiensia*, (70), 35–56.
- de Witt, S. M., Verdoold, R., Cosemans, J. M., & Heemskerk, J. W. (2014). Insights into platelet-based control of coagulation. *Thrombosis research*, 133 Suppl 2, S139–S148. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(14\)50024-2](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50024-2)
- Dietz, J. M. (1984). *Ecologia e organização social do lobo-guará (Chrysocyon brachyurus)* (Contribuições Smithsonian para Zoologia, nº 392). Washington: Smithsonian Institution Press. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.392>
- Dietz, J. M. (1985). Espécie de mamífero *Chrysocyon brachyurus*. 234(234), 1–4. <https://doi.org/10.2307/3503796>
- Diniz, L. S. M., Lazzarini, S. M., & Angelo, M. J. (1999). Problemas médico-veterinários de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em cativeiro. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP / Continuous Education Journal of CRMV-SP*, 2(2), 34–42.
- Dobler, G., & Pfeffer, M. (2011). Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasites & vectors*, 4, 139. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-139>
- Dobó, J., Pál, G., Cervenak, L., & Gál, P. (2016). The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. *Immunological reviews*, 274(1), 98–111. <https://doi.org/10.1111/imr.12460>

Doolittle R. F. (2009). Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 74, 35–40.

<https://doi.org/10.1101/sqb.2009.74.001>

Dryden M. W. (1989). Host association, on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*. *Veterinary parasitology*, 34(1-2), 117–122.

[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90171-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90171-4)

Dryden M. W. (2009). Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Veterinary dermatology*, 20(5-6), 435–440.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00838.x>

Dryden, M. W., & Gaafar, S. M. (1991). Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of medical entomology*, 28(3), 394–400. <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.3.394>

Dryden, M. W., & Rust, M. K. (1994). The cat flea: biology, ecology and control. *Veterinary parasitology*, 52(1-2), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90031-0)

Dryden, M. W., & Smith, V. (1994). Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) cocoon formation and development of naked flea pupae. *Journal of medical entomology*, 31(2), 272–277. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.2.272>

Dryden, M. W., Denenberg, T. M., & Bunch, S. (2000). Control of fleas on naturally infested dogs and cats and in private residences with topical spot applications of fipronil or imidacloprid. *Veterinary parasitology*, 93(1), 69–75.

[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00318-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00318-6)

Duarte, F. R. S. C., Ledo, G., de Lima, F. R., Nunes, M. L. C., Pereira, J. M. S., Brasil, H. C. A., Sebolt, A. P. R., Américo, L., de Aquino, L. P. C. T., de Moura, A. B., & Chryssafidis, A. L. (2025). Prevalence and risk factors for *Acanthocheilonema reconditum* infection in dogs in the municipality of Lages, Santa Catarina, Brazil. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 65, 101352.

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2025.101352>

Dunkelberger, J. R., e Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20(1), 34–50.

<https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>

Durden L.A., Hinkle N.C. (2018). In: *Medical and Veterinary Entomology*. Mullen G.R., Durden L.A., editors. Academic Press; Cambridge. Fleas (Siphonaptera) pp. 145–169.

Eisen, R. J., & Gage, K. L. (2012). Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual review of entomology*, 57, 61–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100717>

Elston, D. M., e Do, H. (2010). What's eating you? Cat flea (*Ctenocephalides felis*), Part 1: Clinical features and role as a disease vector. *Cutis*, 85(5), 231–236.

Emmons, L. H. (2012). Os lobos-guará do Parque Nacional Noel Kempff Mercado. *Contribuições Smithsonian para Zoologia*, 639, 1–135.

Erkunt Alak, S., Köseoğlu, A. E., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Demir, S., Döşkaya, M., Ün, C., & Can, H. (2020). High frequency of knockdown resistance mutations in the para gene of cat flea (*Ctenocephalides felis*) samples collected from goats. *Parasitology research*, 119(7), 2067–2073. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06714-3>

Farries, T. C., e Atkinson, J. P. (1991). Evolution of the complement system. *Immunology today*, 12(9), 295–300. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90002-B](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90002-B)

Favero, L. P., e Belfiore, P. (2017). *Manual de análise de dados: Estatística e modelagem multivariada com Excel, SPSS e Stata* (2ª ed.). Elsevier.

Ferreira, V. P., Fazito Vale, V., Pangburn, M. K., Abdeladhim, M., Mendes-Sousa, A. F., Coutinho-Abreu, I. V., Rasouli, M., Brandt, E. A., Meneses, C., Lima, K. F., Nascimento Araújo, R., Pereira, M. H., Kotsyfakis, M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M., Gontijo, N. F., Collin, N., & Valenzuela, J. G. (2016). SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific reports*, 6, 19300. <https://doi.org/10.1038/srep19300>

Fiori, F., de Paula, R. C., Boulhosa, R. L. P., & Dias, R. A. (2025). Clinical evaluation of sarcoptic mange (*Sarcoptes scabiei*) in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Veterinary research communications*, 49(4), 202. <https://doi.org/10.1007/s11259-025-10774-0>

Fiori, F., de Paula, R. C., Navas-Suárez, P. E., Boulhosa, R. L. P., & Dias, R. A. (2023). The Sarcoptic Mange in Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*): Mapping an Emerging Disease in the Largest South American Canid. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 12(6), 830. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060830>

Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier, C., e Almeras, L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites e vectors*, 4, 187. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-187>

Franc, M., Bouhsira, É., & Beugnet, F. (2013). Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour. *Parasite (Paris, France)*, 20, 49. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013050>

Franco, P. F., Silva, N. C., Fazito do Vale, V., Abreu, J. F., Santos, V. C., Gontijo, N. F., Valenzuela, J. G., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R., Gomes, A. P., e Araujo, R. N. (2016). Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental parasitology*, 164, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.002>

Furie B. (2009). Pathogenesis of thrombosis. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 255–258. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.255>

Gage K.L. (2004). In: *Biologia dos Vetores de Doenças*. Marquardt W.C., editor. Imprensa Acadêmica Elsevier; Burlington e San Diego. Pulgas, o Siphonaptera; pág. 77-92.

Gaines, P. J., Walmsley, S. J., & Wisnewski, N. (2003). Cloning and characterization of five cDNAs encoding peritrophin-A domains from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(11), 1061–1073. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00096-1)

Garcia, B. L., Zwarthoff, S. A., Rooijackers, S. H., & Geisbrecht, B. V. (2016). Novel Evasion Mechanisms of the Classical Complement Pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 197(6), 2051–2060. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600863>

García-Sánchez, A. M., Zurita, A., & Cutillas, C. (2022). Morphometrics as a Complementary Tool in the Differentiation of Two Cosmopolitan Flea Species: *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*. *Insects*, 13(8), 707. <https://doi.org/10.3390/insects13080707>

Gilioli, R., & Silva, F. A. (2000). Frequency of parasites and Salmonella infection in captive maned-wolf, *Chrysocyon brachyurus*, kept in Zoos at the State of São Paulo, Brazil. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 52(4), 337–341. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352000000400008>

Gomes, P. D., Hirano, L. Q. L., e de Paula, R. C. (2024). Epidemiological survey of infectious agents in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Northeastern Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 55(1), 933–941. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01231-8>

Gompper, M.E., (2014). *Free-ranging Dogs & Wildlife Conservation*, first ed., Oxford University Press, Oxford.

Gross, T. L., & Halliwell, R. E. (1985). Lesions of experimental flea bite hypersensitivity in the dog. *Veterinary pathology*, 22(1), 78–81. <https://doi.org/10.1177/030098588502200112>

Grover, S. P., & Mackman, N. (2019). Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(3), 331–338. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312130>

Hahn, T., Roth, A., Febel, E., Fijalkowska, M., Schmitt, E., Arsiwalla, T., & Zibek, S. (2018). New methods for high-accuracy insect chitin measurement. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(13), 5069–5073. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9044>

Halos, L., Beugnet, F., Cardoso, L., Farkas, R., Franc, M., Guillot, J., Pfister, K., & Wall, R. (2014). Flea control failure? Myths and realities. *Trends in parasitology*, 30(5), 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.007>

Harvey, T. V., Linardi, P. M., Carlos, R. S. A., e Heukelbach, J. (2021). Tungiasis in domestic, wild, and synanthropic animals in Brazil. *Acta tropica*, 222, 106068. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106068>

Hinnebusch, B. J., Jarrett, C. O., & Bland, D. M. (2021). Molecular and Genetic Mechanisms That Mediate Transmission of *Yersinia pestis* by Fleas. *Biomolecules*, 11(2), 210. <https://doi.org/10.3390/biom11020210>

Hsu, M. H., Hsu, Y. C., & Wu, W. J. (2002). Consumption of flea faeces and eggs by larvae of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Medical and veterinary entomology*, 16(4), 445–447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00388.x>

ICMBio (2025). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 22 de Jun. de 2025.

ICMBio. (2020). Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Canídeos (PAN Canídeos). Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-canideos>. Acesso em 17 de junho de 2025.

IUCN. Red List of Threatened Species. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em 01 de setembro de 2024.

Jacomo ATA, Kashivakura CK, Ferro C, Furtado MM, Astete SP, Torres NM, Sollmann R, Silveira L (2009) Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. *J Mammal* 90(1):150–157

Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th ed.). Garland Science.

Jin, J., Ding, Z., Meng, F., Liu, Q., Ng, T., Hu, Y., Zhao, G., Zhai, B., Chu, H. J., & Wang, B. (2010). An immunotherapeutic treatment against flea allergy dermatitis in cats by co-immunization of DNA and protein vaccines. *Vaccine*, 28(8), 1997–2004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.092>

Kamhawi S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and infection*, 2(14), 1765–1773. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01331-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01331-9)

Kern, W. H., Jr, Koehler, P. G., & Patterson, R. S. (1992). Diel patterns of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) egg and fecal deposition. *Journal of medical entomology*, 29(2), 203–206. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.2.203>

Khattab, A., Barroso, M., Miettinen, T., & Meri, S. (2015). *Anopheles* midgut epithelium evades human complement activity by capturing factor H from the blood

meal. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2), e0003513.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003513>

Klimpel, S., Heukelbach, J., Pothmann, D., & Rückert, S. (2010). Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans?. *Parasitology research*, 107(3), 713–719. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1926-7>

Klos, A., Tenner, A. J., Johswich, K. O., Ager, R. R., Reis, E. S., & Köhl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular immunology*, 46(14), 2753–2766. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.027>

Koh, C. Y., & Kini, R. M. (2009). Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thrombosis and haemostasis*, 102(3), 437–453. <https://doi.org/10.1160/TH09-04-0221>

Labruna, M. B., Jorge, R. S., Sana, D. A., Jácomo, A. T., Kashivakura, C. K., Furtado, M. M., Ferro, C., Perez, S. A., Silveira, L., Santos, T. S., Jr, Marques, S. R., Morato, R. G., Nava, A., Adania, C. H., Teixeira, R. H., Gomes, A. A., Conforti, V. A., Azevedo, F. C., Prada, C. S., Silva, J. C., ... Barros-Battesti, D. M. (2005). Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental e applied acarology*, 36 (1-2), 149–163. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-2563-1>

Lam, A., & Yu, A. (2009). Overview of flea allergy dermatitis. *Compendium (Yardley, PA)*, 31(5), E1–E10.

Lawrie, C. H., Randolph, S. E., & Nuttall, P. A. (1999). Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental parasitology*, 93(4), 207–214. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4456>

Lebon, W., Franc, M., Bouhsira, É., Lienard, E., Murray, M., Carithers, D., & Beugnet, F. (2018). *Prevention of flea egg development in a simulated home environment by Frontline® Gold (fipronil, (S)-methoprene, pyriproxyfen) applied topically to cats. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 16(1), 67

Lehane M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual review of entomology*, 42, 525–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>

Lewis R. E. (1993). Checklist of the valid genus-group names in the Siphonaptera, 1758-1991. *Journal of medical entomology*, 30(1), 64–79. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.1.64>

Linardi, P. M. (2006). Os ectoparasitos de marsupiais brasileiros. In N. C. Cáceres e E. L. A. Monteiro Filho (Orgs.), *Os marsupiais do Brasil: Biologia, ecologia e evolução* (pp. 37–52). Campo Grande, MS: Editora UFMS.

Linardi, P. M., e Guimarães, L. R. (2000). *Sifonáptera do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 291pp.

Linardi, P. M., e Santos, J. L. (2012). *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 21(4), 345–354. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000400002>

Lu, S., Danchenko, M., Macaluso, K. R., e Ribeiro, J. M. C. (2023). Revisiting the sialome of the cat flea *Ctenocephalides felis*. *PloS one*, 18(1), e0279070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279070>

Lu, S., Tirloni, L., Oliveira, M. B., Bosio, C. F., Nardone, G. A., Zhang, Y., Hinnebusch, B. J., Ribeiro, J. M., & Andersen, J. F. (2021). Identification of a substrate-like cleavage-resistant thrombin inhibitor from the saliva of the flea *Xenopsylla cheopis*. *The Journal of biological chemistry*, 297(5), 101322. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101322>

Macaluso, K. R., Pornwiroon, W., Popov, V. L., e Foil, L. D. (2008). Identification of *Rickettsia felis* in the salivary glands of cat fleas. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N. Y.)*, 8(3), 391–396. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0218>

Machado, M. A., Campos, D. R., Lopes, N. L., Bastos, I. P. B., Alves, M. S. R., Correia, T. R., Scott, F. B., & Fernandes, J. I. (2019). Efficacy of afoxolaner in the flea control in experimentally infested cats. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 28(4), 760–763. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019064>

Maia, O. B., & Gouveia, A. M. (2002). Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62(1), 25–32. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000100004>

McTier, T. L., Chubb, N., Curtis, M. P., Hedges, L., Inskeep, G. A., Knauer, C. S., Menon, S., Mills, B., Pullins, A., Zinser, E., Woods, D. J., & Meeus, P. (2016). Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Veterinary parasitology*, 222, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.019>

Mendes-Sousa, A. F., do Vale, V. F., Silva, N. C. S., Guimaraes-Costa, A. B., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R. V., Oliveira, F., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M. C., Andersen, J. F., Valenzuela, J. G., & Araujo, R. N. (2017). The Sand Fly Salivary Protein Lufaxin Inhibits the Early Steps of the Alternative Pathway of Complement by Direct Binding to the Proconvertase C3b-B. *Frontiers in immunology*, 8, 1065. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01065>

Mendes-Sousa, A. F., Nascimento, A. A., Queiroz, D. C., Vale, V. F., Fujiwara, R. T., Araújo, R. N., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2013). Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PloS one*, 8(11), e79787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079787>.

- Mendes-Sousa, A. F., Queiroz, D. C., Vale, V. F., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Gontijo, N. F., & Andersen, J. F. (2016). An Inhibitor of the Alternative Pathway of Complement in Saliva of New World Anopheline Mosquitoes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 197(2), 599–610. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600020>
- Mendes-Sousa, A. F., Vale, V. F., Queiroz, D. C., Pereira-Filho, A. A., da Silva, N. C. S., Koerich, L. B., Moreira, L. A., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R., Araújo, R. N., Andersen, J., Valenzuela, J. G., & Gontijo, N. F. (2018). Inhibition of the complement system by saliva of *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 92, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.11.004>
- Meniz, I. L., Dias, B. C. P., Araújo, V. C., Fragoso, C. E., Alencar-Silva, T. P., & Pôncio, M. C. (2025). First record of a maned wolf preying on greater rhea. *Canid Biology & Conservation*, 28(2), 6–9. http://www.canids.org/CBC/28/Maned_wolf_predation_rhea.pdf
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015a). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in immunology*, 6, 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015b). Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology*, 6, 257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Mika, A., Reynolds, S. L., Mohlin, F. C., Willis, C., Swe, P. M., Pickering, D. A., Halilovic, V., Wijeyewickrema, L. C., Pike, R. N., Blom, A. M., Kemp, D. J., & Fischer, K. (2012). Novel scabies mite serpins inhibit the three pathways of the human complement system. *PloS one*, 7(7), e40489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040489>
- Moore, C. O., André, M. R., Šlapeta, J., e Breitschwerdt, E. B. (2024). Vector biology of the cat flea *Ctenocephalides felis*. *Trends in parasitology*, 40(4), 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.02.006>
- Motta-Júnior, J. C. (1997). Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae). In C. Ades (Ed.), *Anais do XV Encontro Anual de Etologia* (pp. 197–209). Brasil.
- Motta-Junior, J. C., e Martins, K. (2002). The frugivorous diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in Brazil: Ecology and conservation. In D. J. Levey, W. R. Silva, e M. Galetti (Eds.), *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation* (pp. 291–303). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851995250.0291>
- Motta-Júnior, J. C., Queirolo, D., e Bueno, A. B. (2014). Feeding ecology – A review. In A. G. Consorte-McCrea e E. F. Santos (Eds.), *Ecology and conservation of the maned wolf: Multidisciplinary perspectives* (pp. 87–98). CRC Press.

Motta-Júnior, J. C., Talamoni, S. A., Lombardi, J. A., e Simokomaki, K. (1996). Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) in central Brazil. *Journal of Zoology* (London), 240, 277–284.

Munguía, M., Trejo, I., González-Salazar, C., e Pérez-Maqueo, O. (2016). Human impact gradient on mammalian biodiversity. *Global Ecology and Conservation*, 6, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.01.004>

Nisbet, A. J., & Huntley, J. F. (2006). Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. *Parasite immunology*, 28(4), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00803.x>

Nonaka, M., & Yoshizaki, F. (2004). Primitive complement system of invertebrates. *Immunological reviews*, 198, 203–215. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00118.x>

O'Donoghue, A. J., Liu, C., Simington, C. J., Monterroso, S., Moreno-Galvez, E., Serafim, M. S. M., Burata, O. E., Lucero, R. M., Nguyen, J. T., Fong, D., Tran, K., Millan, N., Gallimore, J. M., Parungao, K., Fong, J., Suzuki, B. M., Jiang, Z., Isoe, J., & Rascón, A. A., Jr (2025). Comprehensive proteolytic profiling of *Aedes aegypti* mosquito midgut extracts: Unraveling the blood meal protein digestion system. *PLoS neglected tropical diseases*, 19(2), e0012555. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012555>

Ooi, C. P., Haines, L. R., Southern, D. M., Lehane, M. J., & Acosta-Serrano, A. (2015). Tsetse GmmSRPN10 has anti-complement activity and is important for successful establishment of trypanosome infections in the fly midgut. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e3448. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003448>

Osbrink, W. L. A., & Rust, M. K. (1985). Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae): Factors influencing host-finding behavior in the laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 78(1), 29–34. <https://doi.org/10.1093/aesa/78.1.29>

Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A. J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 88(1). <https://doi.org/10.1186/s40693-014-0032-0>

Paarlberg, T., Karadzovska, D., & Helbig, R. (2021). Efficacy of lotilaner (Credelio™) against experimentally induced infestations of the adult cat flea, *Ctenocephalides felis*, and flea eggs following oral administration to cats. *Parasites & vectors*, 14(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04660-2>

Paim, R. M., Araújo, R. N., Soares, A. C., Lemos, L. C., Tanaka, A. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J., e Pereira, M. H. (2011). Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *International journal for parasitology*, 41(7), 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.014>

Pant, A., Kopec, A. K., & Luyendyk, J. P. (2018). Role of the blood coagulation cascade in hepatic fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 315(2), G171–G176. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00402.2017>

Paula, R. C., Medici, P., e Morato, R. G. (2008). Plano de Ação para a Conservação do Lobo-Guará – Análise de Viabilidade Populacional e de Habitat. Brasília: Centro Nacional de Pesquisas para Conservação dos Predadores Naturais – CENAP/ICMBio.

Paula, R. C., Rodrigues, F. H. G., Queirolo, D., Jorge, R. P. S., Lemos, F. G., e Rodrigues, L. A. (2013). Avaliação do estado de conservação do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3, 146–159.

Paula, R.C. e DeMatteo, K.; (2015). *Chrysocyon brachyurus* (versão errata publicada em 2016). Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2015. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>. Acesso em 20 de junho de 2025.

Paz, G. F., Avelar, D. M., Reis, I. A., & Linardi, P. M. (2015). Dynamics of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) Infestations on Urban Dogs in Southeastern Brazil. *Journal of medical entomology*, 52(5), 1159–1164. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv071>

Paz, K. C. R. D. C., Severino-Neto, A. C., Germano, G. L., Nogueira, I. G., Vieira, G. F. A., Palhares, A. C. C., Braga, Í. A., Saturnino, K. C., Pacheco, R. C., e Ramos, D. G. S. (2022). Parasitism of Nelore (*Bos indicus*) calf from northern Brazil by *Ctenocephalides felis*. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 34, 100770. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100770>

Pereira-Filho, A. A., Mateus Pereira, R. H., da Silva, N. C. S., Ferreira Malta, L. G., Serravite, A. M., Carvalho de Almeida, C. G., Fujiwara, R. T., Bartholomeu, D. C., Giunchetti, R. C., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Araujo, R. N., Gontijo, N. F., & Viana Sant'Anna, M. R. (2020). The gut anti-complement activity of *Aedes aegypti*: Investigating new ways to control the major human arboviruses vector in the Americas. *Insect biochemistry and molecular biology*, 120, 103338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103338>

Pesenato, I. P., de Oliveira Jorge Costa, J., de Castro Jacinavicius, F., Bassini-Silva, R., Soares, H. S., Fakelmann, T., Castelli, G. N., Maia, G. B., Onofrio, V. C., Nieri-Bastos, F. A., & Marcili, A. (2025). Brazilian fleas (Hexapoda: Siphonaptera): diversity, host associations, and new records on small mammals from the Atlantic Rainforest, including *Rickettsia* screening. *Parasites & vectors*, 18(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06755-6>

Pirone, L., Ripoll-Rozada, J., Leone, M., Ronca, R., Lombardo, F., Fiorentino, G., Andersen, J. F., Pereira, P. J. B., Arcà, B., & Pedone, E. (2017). Functional analyses yield detailed insight into the mechanism of thrombin inhibition by the antihemostatic salivary protein cE5 from *Anopheles gambiae*. *The Journal of biological chemistry*, 292(30), 12632–12642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788042>

- Pittarate, S., Thungrabeab, M., Mekchay, S., & Krutmuang, P. (2018). Virulence of Aerial Conidia of *Beauveria bassiana* Produced under LED Light to *Ctenocephalides felis* (Cat Flea). *Journal of pathogens*, 2018, 1806830. <https://doi.org/10.1155/2018/1806830>
- Portokalidou, S., Gkentzi, D., Stamouli, V., Varvarigou, A., Marangos, M., Spiliopoulou, I., e Dimitriou, G. (2019). *Dipylidium caninum* Infection in Children: Clinical Presentation and Therapeutic Challenges. *The Pediatric infectious disease journal*, 38(7), e157–e159. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002235>
- Queirolo, D., Moreira, J. R., Soler, L., Emmons, L. H., Rodrigues, F. H. G., Pautasso, A. A., Cartes, J. L., e Salvatori, V. (2011). Historical and current range of the near threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. *Oryx*, 45(2), 296–303. <https://doi.org/10.1017/S0030605310000372>
- Quintela, F. M., DA Rosa, C. A., e FeijÓ, A. (2020). Updated and annotated checklist of recent mammals from Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92 Suppl 2, e20191004. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191004>
- Rajamannar, V., Govindarajan, R., Kumar, A., e Samuel, P. P. (2022). A review of public health important fleas (Insecta, Siphonaptera) and flea-borne diseases in India. *Journal of vector borne diseases*, 59(1), 12–21. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.328977>
- Ranjan, S., Young, D., & Sun, F. (2018). A single topical fluralaner application to cats and to dogs controls fleas for 12 weeks in a simulated home environment. *Parasites & vectors*, 11(1), 385. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2927-0>
- Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., e Lima, I. P. (2006). Mamíferos do Brasil (437 p.). Londrina.
- Ribeiro J. M. (1987a). *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental parasitology*, 64(3), 347–353. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90046-4)
- Ribeiro J. M. (1987b). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual review of entomology*, 32, 463–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.002335>
- Ribeiro J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. *Infectious agents and disease*, 4(3), 143–152.
- Ribeiro J. M. (2000). Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical and veterinary entomology*, 14(2), 142–148. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00227.x>
- Ribeiro, J. M., & Spielman, A. (1986). *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental parasitology*, 62(2), 292–297. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90034-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90034-2)

Ribeiro, J. M., e Francischetti, I. M. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual review of entomology*, 48, 73–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.060402.102812>

Ribeiro, J. M., Genta, F. A., Sorgine, M. H., Logullo, R., Mesquita, R. D., Paiva-Silva, G. O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W. R., Ferreira, C., Pimentel, A. C., Bisch, P. M., Leite, D. C., Diniz, M. M., da S G V Junior, J. L., Da Silva, M. L., Araujo, R. N., Gandara, A. C., Brosson, S., ... Oliveira, P. L. (2014). An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2594. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>

Richards A. G. (1975). The ultrastructure of the midgut of hematophagous insects. *Acta tropica*, 32(2), 83–95.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>

Rija, A. A., Critchlow, R., Thomas, C. D., e Beale, C. M. (2020). Global extent and drivers of mammal population declines in protected areas under illegal hunting pressure. *PloS one*, 15(8), e0227163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227163>

Riner, A. J., Rudd, J. L., Clifford, D. L., Cypher, B. L., Foley, J. E., e Foley, P. (2018). Comparison of Flea (Siphonaptera) Burdens on the Endangered San Joaquin Kit Fox (*Vulpes macrotis mutica* (Carnivora, Canidae)) Inhabiting Urban and Nonurban Environments in Central Valley, California. *Journal of medical entomology*, 55(4), 995–1001. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy031>

Rodden, M., Rodrigues, F., e Bestelmeyer, S. (2008). *Chrysocyon brachyurus*. In IUCN (2012), The IUCN Red List of Threatened Species.

Rodrigues, D. F., Daemon, E., & Rodrigues, A. F. (2008). Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil [Characterization of ectoparasites on dogs in the nucleus of urban expansion of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil]. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 17(4), 185–188. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000400003>

Rodrigues, F. H. G. (2002). Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF (Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 105 p.). Repositório Institucional da Unicamp. <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/227350> (Acessado em 22 de junho de 2025)

Rodríguez-Rodríguez, M., Barroso, F. G., Fabrikov, D., & Sánchez-Muros, M. J. (2022). In Vitro Crude Protein Digestibility of Insects: A Review. *Insects*, 13(8), 682. <https://doi.org/10.3390/insects13080682>

- Roversi, P., Lissina, O., Johnson, S., Ahmat, N., Paesen, G. C., Ploss, K., Boland, W., Nunn, M. A., & Lea, S. M. (2007). The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *Journal of molecular biology*, 369(3), 784–793. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.064>
- Rumiz, D., e Sainz, L. A. (2002). Estimación del hábitat útil y la abundancia potencial del lobo de crin o borochoi (*Chrysocyon brachyurus*) en Huanchaca, Santa Cruz – Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental*, 11, 3–16.
- Rust M. K. (1992). Influence of photoperiod on egg production of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) infesting cats. *Journal of medical entomology*, 29(2), 242–245. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.2.242>
- Rust M. K. (1994). Interhost movement of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of medical entomology*, 31(3), 486–489. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.3.486>
- Rust M. K. (2016). Insecticide Resistance in Fleas. *Insects*, 7(1), 10. <https://doi.org/10.3390/insects7010010>
- Rust M. K. (2017). The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. *Insects*, 8(4), 118. <https://doi.org/10.3390/insects8040118>
- Rust M. K. (2020). Recent Advancements in the Control of Cat Fleas. *Insects*, 11(10), 668. <https://doi.org/10.3390/insects11100668>
- Rust, M. K., & Dryden, M. W. (1997). The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annual review of entomology*, 42, 451–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.451>
- Saab, N. A. A., Nascimento, A. A. S., Queiroz, D. C., da Cunha, I. G. M., Filho, A. A. P., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R. V., Araújo, R. N., e Gontijo, N. F. (2020). How *Lutzomyia longipalpis* deals with the complement system present in the ingested blood: The role of soluble inhibitors and the adsorption of factor H by midgut. *Journal of insect physiology*, 120, 103992. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103992>
- Sant'Anna, M. R. V., Pereira-Filho, A. A., Mendes-Sousa, A. F., Silva, N. C. S., Gontijo, N. F., Pereira, M. H., Koerich, L. B., D'Avila Pessoa, G. C., Andersen, J., e Araujo, R. N. (2024). Inhibition of vertebrate complement system by hematophagous arthropods: inhibitory molecules, mechanisms, physiological roles, and applications. *Insect science*, 10.1111/1744-7917.13317. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13317>
- Santos, E. F. (1999). Ecologia alimentar e dispersão de sementes pelo lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) em uma área rural no sudeste do Brasil (Carnivora: Canidae) [Dissertação de mestrado, UNESP].

Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2012). The complement system. *NIH Public Access Author Manuscript*, 343, 227–235.

Schenone, M., Furie, B. C., & Furie, B. (2004). The blood coagulation cascade. *Current opinion in hematology*, 11(4), 272–277.

<https://doi.org/10.1097/01.moh.0000130308.37353.d4>

Schroeder, H., Skelly, P. J., Zipfel, P. F., Losson, B., e Vanderplasschen, A. (2009). Subversion of complement by hematophagous parasites. *Developmental and comparative immunology*, 33(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.010>

Sepúlveda-García, P., Alabi, A., Álvarez, K., Rojas, L., Mella, A., Gonçalves, L. R., André, M. R., Machado, R. Z., Müller, A., e Monti, G. (2023). *Bartonella* spp. in households with cats: Risk factors for infection in cats and human exposure. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 16, 100545.

<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100545>

Shrivastava, G., Valenzuela-Leon, P. C., Chagas, A. C., Kern, O., Botello, K., Zhang, Y., Martin-Martin, I., Oliveira, M. B., Tirloni, L., & Calvo, E. (2022). Albo-serpin, the Main Salivary Anticoagulant from the Disease Vector *Aedes albopictus*, Displays Anti-FXa-PAR Signaling In Vitro and In Vivo. *ImmunoHorizons*, 6(6), 373–383.

<https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2200045>

Shultz, L., López-Pérez, A. M., Jasuja, R., Helman, S., Prager, K., Tokuyama, A., Quinn, N., Bucklin, D., Rudd, J., Clifford, D., Brown, J., Riley, S., e Foley, J. (2023). Vector-Borne Disease in Wild Mammals Impacted by Urban Expansion and Climate Change. *EcoHealth*, 20(3), 286–299. <https://doi.org/10.1007/s10393-023-01650-x>

Sidhoum, N. R., Boucheikhchoukh, M., Mechouk, N., e Deak, G. (2023). An overview of fleas (Siphonaptera) in wild and domestic mammals from Algeria with new data from the central north and south of the country. *Acta tropica*, 247, 107004.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107004>

Silva, N. C., Vale, V. F., Franco, P. F., Gontijo, N. F., Valenzuela, J. G., Pereira, M. H., Sant'Anna, M. R., Rodrigues, D. S., Lima, W. S., Fux, B., e Araujo, R. N. (2016). Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasites e vectors*, 9(1), 445.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1726-8>

Silva-Diogo, O., Goebel, L. G. A., Sousa, M. R. de, Gusmão, A. C., Costa, T. M., Jesus, A. de S., & Cavalcante, T. (2020). Expansão da área de ocorrência do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Carnivora, Canidae) no bioma Amazônico. *Oecologia Australis*, 24(4), 15. <https://doi.org/10.4257/oeco.2020.2404.15>

Silveira L, Furtado MM, Torres NM, Sollmann R, Uhl G, Jacomo ATA (2009) Maned wolf density in a central Brazilian grassland reserve. *J Wildl Manag* 73(1):68–71

Silveira, J. A., Passos, L. M., & Ribeiro, M. F. (2009). Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state,

Brazil. *Veterinary parasitology*, 161(3-4), 270–275.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.028>

Silverman, J., & Appel, A. G. (1994). Adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) excretion of host blood proteins in relation to larval nutrition. *Journal of medical entomology*, 31(2), 265–271. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.2.265>

Silverman, J., Rust, M. K., & Reiersen, D. A. (1981). Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of medical entomology*, 18(1), 78–83.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/18.1.78>

Sim, R. B., & Dodds, A. W. (1997). The complement system: An introduction. In A. W. Dodds & R. B. Sim (Eds.), *Complement: A practical approach* (Cap. 1, pp. 1–18). Oxford University Press.

Singh, N. K., Haque, M., Jyoti, Rath, S. S., e Ghosh, S. (2011). First report of *Ctenocephalides felis felis* infestation of buffalo calves in Punjab, India. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 35(2), 235–236. <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0038-3>

Smith, S. A., Travers, R. J., & Morrissey, J. H. (2015). How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 50(4), 326–336. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1050550>

Sojka, P. A. (2018). *Isoxazolines*. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 27(2), 118–122.
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.02.038>

Soterroni, A. C., Ramos, F. M., Mosnier, A., Fargione, J., Andrade, P. R., Baumgarten, L., Pirker, J., Obersteiner, M., Kraxner, F., Câmara, G., Carvalho, A. X. Y., e Polasky, S. (2019). Expanding the Soy Moratorium to Brazil's Cerrado. *Science advances*, 5(7), eaav7336. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav7336>

Sperciski, K. M., Morais, R. N., Morato, R. G., de Paula, R. C., Azevedo, F. C., May-Júnior, J. A., Santos, J. P., Reghelin, A. L., Wildt, D. E., & Songsasen, N. (2012). Adrenal activity in maned wolves is higher on farmlands and park boundaries than within protected areas. *General and comparative endocrinology*, 179(2), 232–240.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.002>

Strassburg, B. B. N., Brooks, T., Feltran-Barbieri, R., Iribarrem, A., Crouzeilles, R., Loyola, R., Latawiec, A. E., Oliveira Filho, F. J. B., Scaramuzza, C. A. M., Scarano, F. R., Soares-Filho, B., e Balmford, A. (2017). Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature ecology e evolution*, 1(4), 99. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

Szabó, M. P., Matushima, E. R., Pereira, M. D., Werther, K., & Duarte, J. M. (2000). Cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestation in quarantined marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) populations. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 31(4), 576–577.
[https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0576:CFCFII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0576:CFCFII]2.0.CO;2)

Teixeira, R. H. F., da Costa, A. L. M., Gonzaga, C. R. R., Matos, F. N., de Medeiros, M. A., Leandro, S. F. S., Von Matheus, R., Bellotti, M. A., Lima, B. F., Sakamoto, C. A. M., e Barros, L. A. (2023). Flea parasitism in wild mammals in the metropolitan region of Sorocaba, São Paulo, Brazil. *Brazilian journal of veterinary medicine*, 45, e003523. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm003523>

Terborgh, J., Nuñez-Iturri, G., Pitman, N. C., Valverde, F. H., Alvarez, P., Swamy, V., Pringle, E. G., e Paine, C. E. (2008). Tree recruitment in an empty forest. *Ecology*, 89(6), 1757–1768. <https://doi.org/10.1890/07-0479.1>

Theodoro, T. G. W., Lima, P. A., Stehling, P. C., Oliveira Junior, I. M., Varaschin, M. S., Wouters, F., & Wouters, A. T. B. (2018). Sarcoptic mange (*Sarcoptes scabiei*) in wild canids (*Cerdocyon thous*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(7), 1444–1448. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5700>

Thurman, J. M., & Nester, C. M. (2016). All Things Complement. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 11(10), 1856–1866. <https://doi.org/10.2215/CJN.01710216>

Titus, R. G., Bishop, J. V., e Mejia, J. S. (2006). The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite immunology*, 28(4), 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00807.x>

Trolle, M., Noss, A. J., Lima, E. D., e Dalponte, J. C. (2007). Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 16(4), 1197–1204. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9105-y>

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, 275(25), 18717–18723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001486200>

Vaughan, J. A., & Azad, A. F. (1993). Patterns of erythrocyte digestion by bloodsucking insects: constraints on vector competence. *Journal of medical entomology*, 30(1), 214–216. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.1.214>

Vynne, C. (2014). Agricultural expansion and the future of the maned wolf. In A. G. Consorte-McCrea e E. F. Santos (Eds.), *Ecology and conservation of the maned wolf: Multidisciplinary perspectives* (pp. 165–176). CRC Press.

Vynne, C., Keim, J. L., Machado, R. B., Marinho-Filho, J., Silveira, L., Groom, M. J., e Wasser, S. K. (2011). Resource selection and its implications for wide-ranging mammals of the Brazilian cerrado. *PloS one*, 6(12), e28939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028939>

Whaley K, North J. (1997). Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: Dodds AW, Sim RB, editors. *Complement: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press Inc. pp. 19–47.

White, W. H., Riggs, K. L., Totten, M. L., Snyder, D. E., McCoy, C. M., & Young, D. R. (2017). Initial evaluations of the effectiveness of spinetoram as a long-acting, oral systemic pulicide for controlling cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations on dogs. *Veterinary parasitology*, 233, 25–31.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.018>

Whiting M.F., Whiting A.S., Hastriter M.W., Dittmar K. A molecular phylogeny of fleas (Insecta: siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*. 2008;24(5):677–707 <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00211.x>

Wilkerson, M. J., Bagladi-Swanson, M., Wheeler, D. W., Floyd-Hawkins, K., Craig, C., Lee, K. W., & Dryden, M. (2004). The immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs, an experimental study. *Veterinary immunology and immunopathology*, 99(3-4), 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.02.006>

Yeruham, I., Rosen, S., e Hadani, A. (1989). Mortality in calves, lambs and kids caused by severe infestation with the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) in Israel. *Veterinary parasitology*, 30(4), 351–356.

[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90105-2)

Youssefi, M. R., Ebrahimpour, S., Rezaei, M., Ahmadpour, E., Rakhshanpour, A., e Rahimi, M. T. (2014). Dermatitis caused by *Ctenocephalides felis* (cat flea) in human. *Caspian journal of internal medicine*, 5(4), 248–250.

Zhao, C., Yang, X., Zhang, H., Zhang, J., Chen, L., Sha, W., e Liu, G. (2016). The complete mitochondrial genome sequence of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis, 27(1), 539–540. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.905847>

ANEXOS

ANEXO I – Declaração aprovação em Comitê de Ética no uso de animais (UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 206/2025

Título do projeto: Interações entre o Sistema Complemento do Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a saliva de *Ctenocephalides felis felis*: influência no desempenho alimentar do artrópode

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Julia Angelica Goncalves da Silveira

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 07/07/2025. Validade: 07/07/2025 à 06/07/2030.

Belo Horizonte, 08/07/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (questionário)

Universidade Federal de Minas Gerais

Interações entre o Sistema Complemento do Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a saliva de *Ctenocephalides felis felis*: influência no desempenho alimentar do artrópode

Pesquisador: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

CIAEP/CEUA: -

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Objetivos do estudo: Investigar a interação da saliva da pulga *Ctenocephalides felis felis* na modulação do sistema complemento do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e determinar a influência dessas interações no desempenho alimentar do artrópode.

Procedimentos a serem realizados com os animais: As atividades serão realizadas em propriedades que possuem cães e gatos naturalmente parasitados por pulgas, previamente autorizadas pelos responsáveis. Para a coleta dos ectoparasitos, os animais serão contidos manualmente de forma cuidadosa, apenas durante o período necessário para a inspeção e coleta. A inspeção consistirá na avaliação minuciosa de toda a extensão do corpo, com ênfase nas regiões de maior predileção dos ectoparasitos. As pulgas eventualmente presentes serão coletadas manualmente e acondicionadas em microtubos estéreis. Não haverá coleta de fluidos orgânicos.

Potenciais riscos para os animais: O procedimento envolve apenas contenção física manual e inspeção do pelame, sendo considerado minimamente invasivo. No entanto, é possível que alguns animais apresentem reações como leve estresse, desconforto, inquietação ou irritabilidade durante a manipulação, especialmente se não estiverem acostumados a serem contidos. Ressalta-se que não haverá qualquer tipo de intervenção dolorosa, aplicação de medicamentos ou coleta de material biológico que gere dor ou risco à integridade física dos animais. **Cronograma:** A estimativa para o resultado do presente estudo é de 1 (um) ano a partir do início das coletas, que serão iniciadas após a aprovação pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA). **Benefícios:** Os tutores dos animais participantes receberão, ao final da inspeção, orientações individualizadas sobre o controle de ectoparasitos, incluindo informações sobre os riscos que o parasitismo por pulgas pode representar para a saúde dos animais e das pessoas do convívio, como transmissão de patógenos, desconforto e reações alérgicas. Além disso, serão fornecidas recomendações sobre medidas eficazes de prevenção, controle e tratamento antiparasitário, contribuindo para a melhoria da saúde e do bem-estar dos animais, bem como para a redução do risco de infestação ambiental e de zoonoses no domicílio.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto:

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso

cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, inscrito (a) no CRMV sob o nº 8185. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal: Pedro Henrique Cotrin Rodrigues (EV-UFMG), Adalberto Alves Pereira Filho (ICB-UFMG), João Paulo Soares Alves (EV-UFMG) e Ricardo Nascimento Araújo (ICB-UFMG), também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: Pedro Henrique Cotrin Rodrigues (31) 992297834
Email: pedro.cotrinr@gmail.com

Profa Júlia Angélica Gonçalves da Silveira (31) 99932-9236 (31) 3409-2082.

Email: jangelicags@gmail.com

Endereço: Escola de Veterinária da UFMG - Campus Pampulha da UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - São Luiz, Belo Horizonte - MG, 31270-901

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

_____, ____ de _____ de _____

Assinatura do Responsável: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Nome: _____

Documento de Identidade (quando aplicável): _____