

DANIEL MOREIRA DE AVELAR

**Endossimbiontes de *Ctenocephalides felis felis*
(Siphonaptera: Pulicidae) de cães vadios de
Belo Horizonte, MG – Brasil**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, MG
2006

DANIEL MOREIRA DE AVELAR

Endossimbiontes de *Ctenocephalides felis felis*
(Siphonaptera: Pulicidae) de cães vadios de Belo
Horizonte, MG – Brasil

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, MG
2006

DANIEL MOREIRA DE AVELAR

Endossimbiontes de *Ctenocephalides felis felis*
(Siphonaptera: Pulicidae) de cães vadios de Belo
Horizonte, MG – Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Pedro Marcos Linardi
Co-orientadora: Dr.^a Maria Norma Melo

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, MG
2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Ectoparasitos e no Laboratório de Biologia de *Leishmania*, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais e no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha querida e amada Denise, que com sua amizade, seu amor, seus princípios, seu incentivo e sua compreensão torna mais suave qualquer obstáculo. Te Amo!

“Great fleas have little fleas upon their backs to bite ‘em,
And little fleas have lesser fleas, and so **ad infinitum**.
And the greater fleas themselves, in turn, have greater fleas to go on;
While these again have greater still, and greater still,
and so on”.

(Augustus De Morgan. 1872: A Budget of Paradoxes)

[extraído de: Sifonápteros do Brasil]

Meus agradecimentos ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à toda minha família, que sempre acreditaram na minha capacidade. Muito Obrigado!

Ao meu Orientador Prof. Dr. Pedro Marcos Linardi, que atuando como verdadeiro “mestre” contribuiu de forma decisiva na minha formação científica. Muito Obrigado!

À Prof.^a Dr.^a Maria Norma Melo pela grande ajuda, incentivo e disponibilidade para tratar das questões referentes aos tripanosomatídeos e às gregarinas das pulgas.

Aos colegas do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, em especial a Adamastor Bussolotti e Maria do Carmo Ramos, que estavam sempre dispostos a me ajudar.

Aos amigos e colegas da Turma de Mestrado, que me proporcionaram ótimos momentos durante esta trajetória.

Ao amigo e companheiro de laboratório Michel Paiva Valim pela grande ajuda na documentação fotográfica, tratamento das imagens e conversas sobre “Parasitologia”.

À Prof.^a Maria Auxiliadora Batista Leite Magalhães que participou efetivamente da minha formação acadêmica, atuando como uma verdadeira educadora e amiga, sempre disposta a discutir questões referentes ao universo das Ciências Biológicas. Muito Obrigado!

Aos Professores do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas pela contribuição na minha formação.

À Sumara, secretária da Pós-Graduação, pelo apoio e compreensão na parte administrativa.

À equipe do laboratório de Biologia de *Leishmania*, principalmente à Soraia, que com muita paciência me ajudou nas técnicas empregadas com os tripanosomatídeos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudo recebida durante a realização deste mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. OBJETIVOS	26
1.1.1- Objetivo Geral	26
1.1.2- Objetivos Específicos	26
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1- Estudos sobre infecção natural de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por endossimbiontes	33
3.1.1- Tamanho da amostra	33
3.1.2- Captura dos sifonápteros	34
3.1.3- Identificação dos sifonápteros	35
3.1.4- Determinação da infecção natural por endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	35
3.1.5- Isolamento dos tripanosomatídeos em cultivo	37
3.1.6- Caracterização morfológica e morfométrica dos tripanosomatídeos	38

3.1.7- Avaliação do crescimento dos tripanosomatídeos em diferentes meios de cultura	40
3.1.8- Aplicação do teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos isolados de tripanosomatídeos provenientes de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	42
3.1.8.1- Obtenção do lisado	42
3.1.8.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
3.1.8.3- Análise dos produtos do material amplificado na PCR	44
3.2- Análise Estatística	44
4- RESULTADOS	46
4.1- Endossimbiontes presentes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	47
4.1.1- Caracterização morfológica e morfométrica dos tripanosomatídeos encontrados no tubo digestivo de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	56
4.1.2- Avaliação do crescimento dos tripanosomatídeos no meio NNN- α -MEM e à temperatura de 24.° C \pm 1.° C	64
4.1.3- Aplicação do teste Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos isolados de tripanosomatídeos provenientes de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	66
4.1.4- Determinação dos sítios de infecção dos endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	67
4.2- Índices e coeficientes de infecção por endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	68
4.2.1- Prevalência de endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	68
4.2.2- Associação entre endossimbiontes	70
4.2.3- Índices de abundância e intensidade média de parasitismo	71
4.3- Relação entre os índices de infecção de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e sazonalidade	71
4.4- Relação entre os índices de infecção de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por endossimbiontes	82

e o sexo e a idade aproximada dos cães	
5- DISCUSSÃO	83
5.1- Endossimbiontes presentes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	84
5.1.2- Identificação dos tripanosomatídeos isolados do intestino posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	85
5.1.3- Determinação dos sítios de infecção dos endossimbiontes <i>Ctenocephalides felis felis</i> e provável forma de transmissão	88
5.2- Índices e coeficientes de infecção por endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	90
5.2.1- Prevalência de endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i>	90
5.2.2- Associação entre endossimbiontes	94
5.2.3- Índices de abundância e intensidade média de parasitismo	95
5.3- Relação entre os índices de infecção de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e sazonalidade	96
5.4- Relação entre os índices de infecção de <i>Ctenocephalides felis felis</i> por endossimbiontes e o sexo e a idade aproximada dos cães	100
6- CONCLUSÕES	101
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	População do município de Belo Horizonte e dos outros municípios pertencentes à região metropolitana. Percentual de crescimento 1991/2000.	24
Quadro 2	Dados referentes aos endossimbiontes já encontrados em <i>Ctenocephalides felis felis</i> .	29

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Dados morfométricos (μm) dos cisticercóides de <i>Dipylidium caninum</i> encontrados em <i>Ctenocephalides felis felis</i> naturalmente infectadas, capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	49
Tabela 2	Dados morfométricos (μm) das formas de gregarinas (Actinocephalidae) encontradas em <i>Ctenocephalides felis felis</i> naturalmente infectadas, capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	50
Tabela 3	Dados morfométricos (μm) das formas de cultura de <i>Leptomonas</i> sp. encontradas em <i>Ctenocephalides felis felis</i> naturalmente infectadas, capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	58
Tabela 4	Valores do teste <i>t</i> para comparação das médias observadas nas formas promastigotas com torção corporal e sem torção corporal, isoladas do tubo digestivo de <i>Ctenocephalides felis felis</i> .	59
Tabela 5	Sítios de predileção e respectivos índices de infecção em pulgas	67

	<i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, e dissecadas entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.	
Tabela 6	Prevalências de infecção natural (simples e associadas) por grupos de endossimbiontes (protozoários e helmintos), em <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.	69
Tabela 7	Índices de afinidade e seus correspondentes “t” calculados entre endossimbiontes encontrados em <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	70
Tabela 8	Índices de infecção mensal e/ou estacionais dos endossimbiontes em <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.	73
Tabela 9	Relação entre os endossimbiontes de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e as estações climáticas na região urbana de Belo Horizonte, MG, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	74
Tabela 10	Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de fêmeas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> infectadas naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG - Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	79
Tabela 11	Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de machos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> infectadas naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturada de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período	80

	de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	
Tabela 12	Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de adultos (machos e fêmeas) de <i>Ctenocephalides felis felis</i> infectadas naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	81
Tabela 13	Relação entre as formas evolutivas de gregarinas (Actinocephalidae) em <i>Ctenocephalides felis felis</i> e as estações climáticas na região urbana de Belo Horizonte, MG, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.	82

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Tubo digestivo de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Legenda: 1- esôfago; 2- proventrículo; 3- intestino médio; 4- tubo de malpighi; 5- intestino posterior; 6- glândulas retais. (Aumento de 100X).	36
Figura 2	Forma promastigota de tripanossomatídeo. A- comprimento da célula; B- largura da célula; C- comprimento do núcleo; D – largura do núcleo; E- distância do meio do cinetoplasto à porção anterior; F- distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo; G- comprimento da porção livre do flagelo.	40
Figura 3	Cisticercóide de <i>Dipylidium caninum</i> encontrado na cavidade geral de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala = 80µm.	51
Figura 4	Cisticercóide de <i>Dipylidium caninum</i> encontrado na cavidade geral de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . A seta está indicando um dos ganchos rostelares. Escala = 10µm.	51
Figura 5	Trofozoíto de gregarina (Actinocephalidae) encontrada no intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala = 30µm.	52
Figura 6	Gametocisto de gregarina (Actinocephalidae) encontrado no intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 60µm.	52
Figura 7	Oocistos de gregarina (Actinocephalidae) liberados após ruptura do gametocisto encontrado no intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 20µm.	53

Figura 8	Gamontes de gregarina (Actinocephalidae) encontrados no intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 80µm.	54
Figura 9	Detalhe de um gamonte de gregarina (Actinocephalidae) encontrado no intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 30µm.	54
Figura 10	Vesículas “polysporophorous” de <i>Nolleria pulicis</i> (nas setas) encontradas nas células epiteliais do intestino médio de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 20µm.	55
Figura 11	Esporos de <i>Nolleria pulicis</i> (nas setas) livres no intestino posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Escala = 20µm.	55
Figura 12	Forma promastigota com torção corporal de <i>Leptomonas</i> sp. provenientes do tubo digestivo posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e cultivadas no meio NNN-α-MEM. Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	60
Figura 13	Forma promastigota sem torção corporal de <i>Leptomonas</i> sp. provenientes do tubo digestivo posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e cultivadas no meio NNN-α-MEM. Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	60
Figura 14	Forma “amastigota-like” de <i>Leptomonas</i> sp. presente no meio NNN-α-MEM, isolada do tubo digestivo posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	61
Figura 15	Forma cística de <i>Leptomonas</i> sp. presente no meio NNN-α-MEM, isolada do tubo digestivo posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	61
Figura 16	Formas promastigotas em rosáceas de <i>Leptomonas</i> sp. presentes no meio NNN-α-MEM, isoladas do tubo digestivo posterior de <i>C. felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	62
Figura 17	Forma promastigota de <i>Leptomonas</i> sp. em divisão (na seta), presente no meio NNN-α-MEM, isolada do tubo digestivo posterior de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . Coloração por Giemsa. Escala= 10µm.	62

Figura 18	Desenhos em câmara-clara das formas evolutivas dos tripanosomatídeos isolados do tubo digestivo posterior de <i>C. felis</i> e cultivadas no meio NNN- α -MEM. A, B e C – formas promastigotas com torção corporal de <i>Leptomonas</i> sp. D, E e F – formas promastigotas sem torção corporal (<i>Leptomonas</i> sp.) G e H – Fomas “amastigota-like” de <i>Leptomonas</i> sp. Escala= 10 μ m.	63
Figura 19	Crescimento de <i>Leptomonas</i> sp isolado do tubo digestivo posterior de uma fêmea de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , em NNN- α -MEM, inoculo inicial de 5,8 x 10 ⁶ células/ml, à 24.°C \pm 1.°C. Cada ponto representa a média de duas determinações e as barras verticais representam os desvios padrões.	65
Figura 20	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR obtidos para confirmação de diagnóstico de <i>Leishmania chagasi</i> – Marcador do tamanho molecular (1); isolado 01 de <i>Ctenocephalides felis felis</i> (2); isolado 02 de <i>C. felis felis</i> (3); DNA de <i>Leptomonas seymouri</i> (4); controle positivo: <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1972/BH46) (5); controle negativo – sem DNA (6)	66
Figura 21	Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por endossimbiontes (simples e associadas) em <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.	74
Figura 22	Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por grupos de endossimbiontes em pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.	75
Figura 23	Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por grupos de endossimbiontes (simples e associadas) em machos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do	76

	Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.	
Figura 24	Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções simples por grupos de endossimbiontes, em fêmeas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.	77
Figura 25	Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções associadas por grupos de endossimbiontes, em fêmeas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.	78

RESUMO

Com a finalidade de se estudar as interações entre *C. felis felis* e seus endossimbiontes (protozoários e helmintos), 1500 pulgas (1052 fêmeas e 448 machos), provenientes de 150 cães capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte – MG foram dissecadas entre dezembro de 2004 e novembro de 2005. Três espécies de protozoários, pertencentes à diferentes famílias, *Nolleria pulicis* (Chitridiopsidae), gregarinas (Actinocephalidae) e *Leptomonas* sp. (Trypanosomatidae) e uma de cestódeo, *Dipylidium caninum* (Dilepididae) foram encontradas como endossimbiontes destas pulgas. Cerca de 18% das pulgas apresentaram, pelo menos, uma espécie de simbiote, com as gregarinas evidenciando-se como as mais prevalentes. Foram verificadas infecções simples, duplas e triplas. Os tripanosomatídeos isolados de *C. felis felis* são polimórficos no meio de cultivo e com relação ao padrão de seu desenvolvimento apresentaram dois picos e ausência de fase estacionária. Entre os endossimbiontes, em relação ao sexo, as infecções por gregarinas ocorreram preferencialmente em pulgas fêmeas. Foi verificada uma tendência sazonal de infecção para *N. pulicis* e *Leptomonas* sp., sendo que as infecções por estes endossimbiontes ocorreram preferencialmente durante a estação chuvosa-quente. A abundância e a intensidade média de infecção por gregarinas são, pela primeira vez, noticiadas para pulgas. Os achados de *N. pulicis*, gregarinas actinocefalídeas e *Leptomonas* sp. em *C. felis felis*, bem como as suas respectivas prevalências e distribuição por sexo das pulgas e sazonalidade são, pela primeira vez, noticiadas para o Brasil, a América do Sul, a região Neotropical.

ABSTRACT

Aiming to study the interactions between *C. felis felis* and their endosymbionts (protozoa and helminths), 1,500 fleas (1,052 females and 448 males) from 150 dogs captured for the Control Center of Zoonoses of Belo Horizonte - MG, were dissected between December 2004 and November 2005. Three species of protozoa, belonging to the different families, *Nolleria pulicis* (Chitridiopsidae), gregarines (Actinocephalidae) and *Leptomonas* sp. (Trypanosomatidae) and one of cestode, *Dipylidium caninum* (Dilepididae) were found as endosymbionts of these fleas. About 18% of fleas were infected, at least, by one species of symbiont, being the gregarines most prevalent. Single, double and triple infections were noted among the endosymbionts studied. The isolated trypanosomatids of *C. felis felis* are polymorphics in the culture medium and with relation to the standard of its development they had presented two peaks and absence of stationary phase. In relation to the sex, infections by gregarines preferentially occurred in female fleas. It was verified a seasonal trend of infection for *N. pulicis* and *Leptomonas* sp., with these infections showing the highest prevalences in the warm-rainy season. For the first time, the abundance and average intensity of infection for gregarines are noticed for species of fleas. The findings of *N. pulicis*, gregarines actinocephalidae and *Leptomonas* sp. in *C. felis felis*, with their respective prevalences and distributions by sex of the fleas and seasonality are, also for the first time, noticed for Brazil, South America and Neotropical region.

1. INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos ápteros, holometábolos, com hematofagia restrita aos adultos que, apresentando alternância entre vida livre (nos estádios larvários) e parasitária (no estágio adulto), se habilitam a participar de diferentes elos na cadeia epidemiológica; como parasitos propriamente ditos, vetores biológicos e hospedeiros invertebrados. Como vetores ou hospedeiros no Brasil, destacam-se *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903); *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758); *Ctenocephalides canis* (Curtiss, 1826) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), todas pertencentes à família Pulicidae, além de algumas espécies incluídas no gênero *Polygenis* (Jordan, 1939), da família Rhopalopsyllidae (LINARDI & GUIMARÃES, 2000).

Ainda que as duas espécies de *Ctenocephalides* sejam cosmopolitas e, praticamente ocorrendo nos mesmos grupos de hospedeiros, *C. felis felis* é espécie prevalente, infestando representantes das ordens Carnivora, Rodentia, Lagomorpha, Edentata, Marsupialia e Primates. Os carnívoros são considerados como hospedeiros primários, sendo que nos animais domésticos como cães e gatos, *C. felis felis* é tida como o mais importante ectoparasito em todo o mundo (RUST & DRYDEN, 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000).

Assim é que em estudo realizado em Belo Horizonte e cidades vizinhas, num total de 4864 ectoparasitos recolhidos de cães, 3786 eram *C. felis felis*. Nesses mesmos municípios a prevalência desta pulga nos cães foi de 87% (LINARDI & NAGEM, 1973). Outros dados sobre prevalência em cães foram apresentados por CORRÊA (1947) em Porto Alegre, RS (79,22%). FERNANDES *et al* (1996) relataram a prevalência de 50,2% sobre

cães e 68,3% sobre gatos no Rio de Janeiro e adjacências, RJ. Além disso, *C. felis felis* tem sido encontrada livremente no interior das habitações humanas, conforme relatos, onde foram obtidas as seguintes proporções: 8,74% - Bom Conselho - Pernambuco (DOBBIN JR *et al.*, 1969), 64,72% em Belo Horizonte – Minas Gerais e uma média de 21,73% para outros municípios de MG, RJ, BA e CE (LINARDI & GUIMARÃES, 2000). A ocorrência de *C. felis felis* nas habitações e seu gradativo predomínio sobre *Pulex irritans* vem sendo constatada em todo o mundo (BEAUCOURNU, 1973; LINARDI & MIURA, 1976), fato este de significativo valor epidemiológico. VIEGAS (1996) verificou a existência de uma pronunciada tendência sazonal na ocorrência da infestação em cães de Belo Horizonte.

A compreensão deste fenômeno torna-se possível graças à evidente explosão demográfica humana nas grandes cidades brasileiras, uma vez que ela acarreta a domiciliação de carnívoros domésticos, principalmente cães (em Belo Horizonte, a população de cães é de aproximadamente 380.000 – Campanha contra a raiva canina, Prefeitura de Belo Horizonte, 2005), como animais de companhia ou de proteção às residências; neste último caso ainda mais acentuado, em virtude do aumento da criminalidade e conseqüente necessidade de vigilância. O Quadro 1 representa o aumento populacional humano ocorrido em Belo Horizonte, entre os anos de 1991 e 2000, cidade em que o presente estudo foi realizado.

Quadro 1 - População da cidade de Belo Horizonte e dos outros municípios pertencentes à região metropolitana. Percentual de crescimento 1991/2000				
Regiões metropolitanas/municípios	Total da população		Crescimento absoluto	Taxa de crescimento (%)
	1991	2000		
RM de Belo Horizonte	3.515.542	4.349.425	833.883	2,4
Belo Horizonte	2.020.161	2.238.526	218.365	1,1
Outros Municípios da RM	1.495.381	2.110.899	615.518	3,9

Fonte: Anuário Estatístico de Belo Horizonte, 2003. In: IBGE. Censo Demográfico de 1991 e 2000

Conseqüentemente, a maior possibilidade de contato entre o ser humano e *C. felis felis*, poderá favorecer a transmissão de patógenos de cão a cão, ou desses animais para o homem, ou, ainda, a disseminação deles pelo ambiente humano.

Vários trabalhos têm relatado a presença de agentes infecciosos, patógenos e/ou endoparasitos em sifonápteros (JENKINS, 1964; STRAND, 1977; CASTILLO, 1980; DAOUST, 1983), sem contudo enfocarem sua prevalência, biologia e grau de patogenicidade. Uma exceção é o de BEARD *et al.* (1990b) nos Estados Unidos, tendo como objeto, *C. felis felis*. No Brasil, estudos desta natureza somente foram realizados com pulgas da família Rhopalopsyllidae (LINARDI *et al.* 1981; BOTELHO, 1990; BOTELHO & LINARDI, 1992), a despeito de um relato, apresentado sob forma resumida, concernente a endoparasitos de *C. felis felis* (LINARDI, 2002).

Assim, considerando:

- a) a domiciliação crescente de carnívoros domésticos;
- b) o encontro de *C. felis felis* livre no interior das residências;
- c) a transmissão de certos patógenos de cão a cão, ou desses animais para o ser humano, especialmente crianças,

O estudo das interações entre *C. felis felis* que infestam cães e seus endossimbiontes abre novas perspectivas sobre a participação destas pulgas na epidemiologia das endoparasitoses em que participa como hospedeiro intermediário ou vetor, seja biológico ou mecânico!

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1.1.1 GERAL

- Estudar as interações entre *C. felis felis* que infestam cães e seus endossimbiontes (protozoários e helmintos).

1.1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar os índices de infecção natural (prevalência) dos endossimbiontes em *C. felis felis* e relacioná-los com:
 - a - sexo das pulgas;
 - b- períodos estacionais;
 - c- sexo e idade aproximada dos cães, no caso de parasitos heteroxênicos.
- Estimar as cargas parasitárias (intensidade de infecção natural) e relacioná-las com as variáveis acima mencionadas;
- Determinar os sítios de infecção dos endossimbiontes nos respectivos sifonápteros;
- Caracterizar morfológicamente os tripanosomatídeos obtidos de pulgas de cães e cultivá-los em diferentes meios de cultura avaliando a cinética de seu crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

Devido ao considerável aumento de moléstias nas últimas décadas, transmitidas por artrópodos de importância médica e veterinária, vários estudos vêm sendo realizados, tendo como foco seus endossimbiontes. Ainda que para autores mais antigos, incluindo a Sociedade Americana de Parasitologia, o termo simbiose era usado como uma interação benéfica entre seres, mais recentemente, ODUM (1967) chama a atenção para a impropriedade deste uso. Assim, a interação benéfica entre seres é atualmente definida como mutualismo, sendo simbiose a designação que se aplica a quaisquer interações (mutualismo, comensalismo, parasitismo, etc).

Entre essas moléstias, destacam-se aquelas veiculadas pelos sifonápteros. Nas décadas de 1960-80, a Organização Mundial de Saúde publicou trabalhos de revisão contendo listas dos potenciais patógenos encontrados em sifonápteros (JENKINS, 1964; STRAND, 1977; CASTILLO, 1980; DAOUST, 1983). Recentemente, vários organismos foram listados como endossimbiontes de pulgas (BEARD *et al.*, 1990b; BOTELHO & LINARDI, 1992; LINARDI & GUIMARÃES, 2000), a despeito da certificação de algumas espécies. São eles: um vírus, 12 a 15 bactérias (incluindo riquetsias e espiroquetas), três fungos, 27 protozoários, 10 a 20 nematódeos e quatro cestódeos. Deve-se ressaltar que estes organismos foram encontrados desenvolvendo ações mutualísticas, comensalísticas ou parasitárias com seus hospedeiros.

No que concerne à *C. felis felis* já foram encontrados os seguintes endossimbiontes: *Dipylidium caninum*, *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum* (JELLISON, 1959); *Hymenolepis* (= *Rodentolepis*) *nana* e *H. diminuta* (SALEM *et al.*, 1980); *Rickettsia*

burnetii, *Spirochaeta ctenocephali*, *Yersinia pestis*, *Nosema ctenocephali*, *Crithidia* sp., *Leptomonas ctenocephali* (= *Herpetomonas ctenocephali*) (WENYON, 1926; JENKINS, 1964; STRAND, 1977); *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, Hemoplasma (SHAW *et al.*, 2004); *Nolleria pulicis*, gregarinas (BEARD *et al.* 1990b); *Trypanosoma lewisi* (MOLYNEUX, 1969); *Leishmania chagasi* (COUTINHO, 2003). No quadro a seguir encontram-se dados referentes aos endossimbiontes já encontrados natural ou experimentalmente infectando *C. felis felis*.

Quadro 02- Dados referentes aos endossimbiontes já encontrados em *C. felis felis*

Endossimbionte	Moléstia	Hospedeiro Vertebrado	Prevalência	Distribuição Geográfica	Infecção Experimental ou Natural	Forma de Diagnóstico	Referência
Amebas	-	-	19,4%	EUA	Natural	Visualização de trofozoítos e cistos ao MO	BEARD <i>et al.</i> (1990b)
<i>Bartonella henselae</i>	Doença da esfoladura	Gatos	17%	Reino Unido e Irlanda	Natural	Teste PCR	SHAW <i>et al.</i> (2004)
<i>Dipetalonema reconditum</i>	Dipetalonemose	Cães	0,8%	Cosmopolita	Natural	Visualização de larvas ou microfilárias	JELLISON (1959); LINARDI (2002)
<i>Dipylidium caninum</i>	Dilepidiose	Cães, raposas e Homem	10,2%	Cosmopolita	Natural e Experimental	Visualização de Cisticercos ao MO	BEARD <i>et al.</i> (1989); MARSHALL (1967); LINARDI (2002)
<i>Dirofilaria immitis</i>	Dirofilariose	Cães	32,1%	Cosmopolita	Experimental	Visualização de larvas ou microfilárias	JELLISON (1959)
Gregarinas	-	-	19,4%	Estados Unidos da América	Natural	Visualização das formas ao MO	BEARD <i>et al.</i> (1989)
Hemoplasma	Anemia Hemolítica de gatos	Gatos	40%	Reino Unido e Irlanda	Natural	Teste: PCR	SHAW <i>et al.</i> (2004)
<i>Hymenolepis dimiuta</i>	Himenolepiase	Roedores	-	Cosmopolita	Experimental	Visualização de Cisticercos ao MO	MARSHALL (1967)
<i>Leishmania chagasi</i>	Leishmaniose Visceral	Cães, raposas e Homem	29,9%	Brasil	Natural / Experimental	Visualização das formas ao MO e Teste : PCR	COUTINHO (2003)
<i>Leptomonas ctenocephali</i>	-	-	-	Inglaterra	Natural	Visualização das formas ao MO	WENYON (1926)
<i>Nolleria pulicis</i>	-	-	1,5	Estados Unidos da América	Natural	Visualização das formas ao MO	BEARD <i>et al.</i> (1990a)
<i>Nosema ctenocephali</i>	-	-	-	Índia	Natural	Visualização das formas ao MO	JENKINS (1964)
<i>Rickettsia burnetii</i>	Febre Q-	-	17%	-	Natural	-	JENKINS (1964)
<i>Rickettsia felis</i>	Tifo Murino	Homem	21%	Reino Unido, Irlanda	Natural	Teste: PCR	SHAW <i>et al.</i> (2004)

<i>Rodentolepis nana</i>	Himenolepiase	Homem e roedores	-	Cosmopolita	Experimental	Visualização de Cisticercos ao MO	MARSHALL (1967)
<i>Spirochaeta ctenocephali</i>	-	-	-	Índia	Natural	Visualização ao MO	STRAND (1977)
<i>Trypanosoma lewisi</i>	-	Roedores	-	EUA	Natural	Visualização das formas ao MO	MOLYNEUX (1969)
<i>Yersinia pestis</i>	Peste Bubônica	Ratos / Homem	0.17%	Américas, Ásia, Europa	Natural	Cultivo e Inoculação em camundongos	BRASIL <i>et al.</i> (1989)

O desenvolvimento larvário de *D. immitis* e sua prevalência em *C. felis felis*, nos Estados Unidos, foram elucidados por STUEBEN (1954). Posteriormente, NEWTON & WRIGHT (1956) demonstraram que os trabalhos referentes ao desenvolvimento de *D. immitis* em pulgas, tinham sido, provavelmente, realizados com cães parasitados por *D. reconditum*. Apesar de não ocorrer o desenvolvimento larvário de *D. immitis* em pulgas, microfilárias podem ser encontradas nestes sifonápteros (BEARD *et al.*, 1990b). A diferenciação das microfilárias pode ser realizada segundo os parâmetros estabelecidos por LINDSEY (1962) e NELSON (1962).

Experimentalmente *Hymenolepis* (=R.) *microstoma*, *H.* (=R.) *citelli*, *H. diminuta*, *H.* (=R.) *nana* e *D. caninum* completaram o seu desenvolvimento em *C. felis felis* (MARSHALL, 1967). Além disso, foram analisadas correlações entre hospedeiro e desenvolvimento do parasito e efeitos do parasitismo sobre o hospedeiro. PUGH & MOORHOUSE (1985) e PUGH (1987) analisaram os fatores que afetam o desenvolvimento de *D. caninum* em *C. felis felis*, quando submetida a diferentes condições ambientais, concluindo ser a temperatura, o principal deles. A diferenciação dos cisticercóides de *Dipylidium* e *Hymenolepis* (=Rodentolepis) pode ser realizada segundo os trabalhos de SCHILLER (1959) e MARSHALL (1967).

Dados relativos à prevalência de *D. reconditum* e de *D. caninum* em cães têm sido noticiados em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*,

2002; LABARTHE *et al.*, 2004; REIFUR *et al.*, 2004). Excetuando-se uma breve comunicação apresentada por LINARDI (2002), trabalhos referentes à prevalência destes helmintos em sifonápteros (hospedeiros intermediários), infestantes de cães, não foram ainda publicados no Brasil.

A existência de tripanosomatídeos em *C. felis felis* é conhecida desde 1908, através dos estudos de Patton sobre o calazar na Índia. Entretanto, a descrição de *Leptomonas ctenocephali* só ocorreu em 1912, por Fantham. Estudos sobre o ciclo biológico deste tripanosomatídeo foram realizados no início do século (WENYON, 1914 *apud* WENYON, 1926) e mais recentemente por outros pesquisadores (MOLYNEUX *et al.*, 1981). Ainda no início do século XX, foram realizados trabalhos sobre a presença de *Leishmania* em *C. felis felis* (WENYON, 1926). Recentemente, foi demonstrada a competência vetorial de *C. felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão de *L. chagasi* (COUTINHO, 2003). Outra espécie de tripanosomatídeo presente nesta pulga é *Trypanosoma lewisi* (MOLYNEUX, 1969).

WALLACE (1966) e MOLYNEUX *et al.* (1981) deixam claro que, com relação aos tripanosomatídeos monoxênicos presentes em pulgas, existe uma grande incerteza quanto à sua posição taxonômica. Muitas das descrições são antigas e geralmente, consideradas inválidas. Dentre as 69 espécies do gênero *Leptomonas*, somente 15 podem ser, de fato, consideradas válidas (PODLIPAEV, 2000; MOMEN, 2001). Entre os tripanosomatídeos monoxênicos de pulgas, apenas a espécie *Leptomonas pulexsimulantis* (BEARD *et al.*, 1989), encontrada em *Pulex simulans* (Baker, 1895), foi descrita segundo as normas propostas por WALLACE *et al.* (1983). Com relação a *L. ctenocephali*, WALLACE (1966) ressalta a necessidade de se reestudar este tripanosomatídeo presente em *C. felis felis*, a partir de clones obtidos de cultura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Estudos sobre infecção natural de *C. felis felis* por endossimbiontes

3.1.1- Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado segundo a fórmula de Camel (1974) ratificada por Schwartz (1981) (SERRA-FREIRE, 2002). Para realizar este cálculo, foram utilizados os dados referentes ao projeto-piloto desenvolvido entre setembro e novembro de 2004. Neste período, foram dissecadas 110 pulgas, capturadas aleatoriamente, das quais 39 continham endossimbiontes.

$$\text{Fórmula: } N = (Z^2) (p) (q) \div i^2$$

onde, Z = valor conhecido na curva normal do número de desvios-padrão correspondente ao risco arbitrado pelo pesquisador

p = percentagem de indivíduos parasitados na amostra considerada

q = percentagem de indivíduos não-parasitados na amostra considerada

i = erro tolerado pelo pesquisador

$$N = [(2,17)^2 (0,3545) (0,6455)] \div (0,03)^2$$

$$N = [(4,7089) (0,2288)] \div (0,0009)$$

$$N = 1,0774 \div (0,0009)$$

$$N = 1.197,107$$

Onde, arredonda-se para 1200 o tamanho da amostra.

3.1.2- Captura dos sifonápteros

As pulgas *C. felis felis* foram obtidas a partir dos cães vadios (sem raça definida) capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Dados referentes aos cães, tais como sexo, idade aproximada e época de apreensão, foram obtidos a partir das fichas presentes neste local. Foram coletadas 2250 pulgas provenientes de 150 cães. Para cada cão examinado, foram coletadas 15 pulgas, sendo que destas apenas 10 foram dissecadas, totalizando assim 1500 pulgas durante o período de um ano (de dezembro de 2004 a novembro de 2005).

A coleta destes ectoparasitos era realizada por toda a extensão do corpo dos cães, com o auxílio de pinças. As pulgas capturadas eram colocadas em potes de plástico, devidamente identificados, e levadas para o Laboratório de Ectoparasitos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram identificadas e dissecadas.

Os cães foram divididos em classes de acordo com suas idades aproximadas (de acordo com o Manual Merck de AIELLO (2001) em:

- 0 – 1 ano: filhote
- 1,1 – 4 anos: adulto
- acima de 4 anos: velho

3.1.3- Identificação dos Sifonápteros

Todos os sifonápteros foram identificados no momento de sua dissecação, baseando-se em LINARDI & GUIMARÃES (2000). Apenas foi encontrada a pulga *C. felis felis*. Durante este procedimento anotava-se também o sexo das pulgas.

3.1.4- Determinação da infecção natural por endossimbiontes em *C. felis felis*

Para a dissecação, as pulgas eram imobilizadas utilizando-se gelo. Este procedimento foi realizado segundo a metodologia descrita por LINARDI & GUIMARÃES (2000). Com a exposição dos órgãos internos, estes eram analisados, a fresco, quanto à presença de endossimbiontes sob lupa estereoscópica e microscópio óptico. Este procedimento visou determinar a localização anatômica dos endossimbiontes nas pulgas (Figura 01).

Posteriormente os órgãos eram rompidos, o material espalhado sobre lâmina de vidro, fixados com álcool metílico e, após secagem, corado pelo método de Giemsa (20-25 minutos), para posterior exame em microscópio óptico com objetiva de imersão, objetivando-se a confirmação de diagnóstico e localização dos endossimbiontes, bem como sua quantificação. Para os tripanosomatídeos o procedimento de coloração somente foi realizado após o seu isolamento em meio de cultivo.

Para cada espécime de sifonáptero dissecado foi utilizado um par de estiletos que, após o uso, eram lavados em solução a 10% de hipoclorito de sódio, enxaguados com água corrente e flambados, visando à desinfecção do material.

A identificação dos cestódeos foi realizada conforme os parâmetros estabelecidos por SCHILLER (1959) E MARSHALL (1967); as gregarinas, segundo CLOPTON (2000) e os microsporídios de acordo com BEARD *et al.* (1990a) e SPRAGUE *et al.* (1992).

Uma vez que quatro diferentes gêneros de tripanosomatídeos (*Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma*) podem infectar pulgas (WALLACE, 1966; BEARD *et al.*, 1989; COUTINHO, 2003), as etapas que se seguem foram realizadas no sentido de se tentar diagnosticar corretamente os táxons de flagelados infectantes.

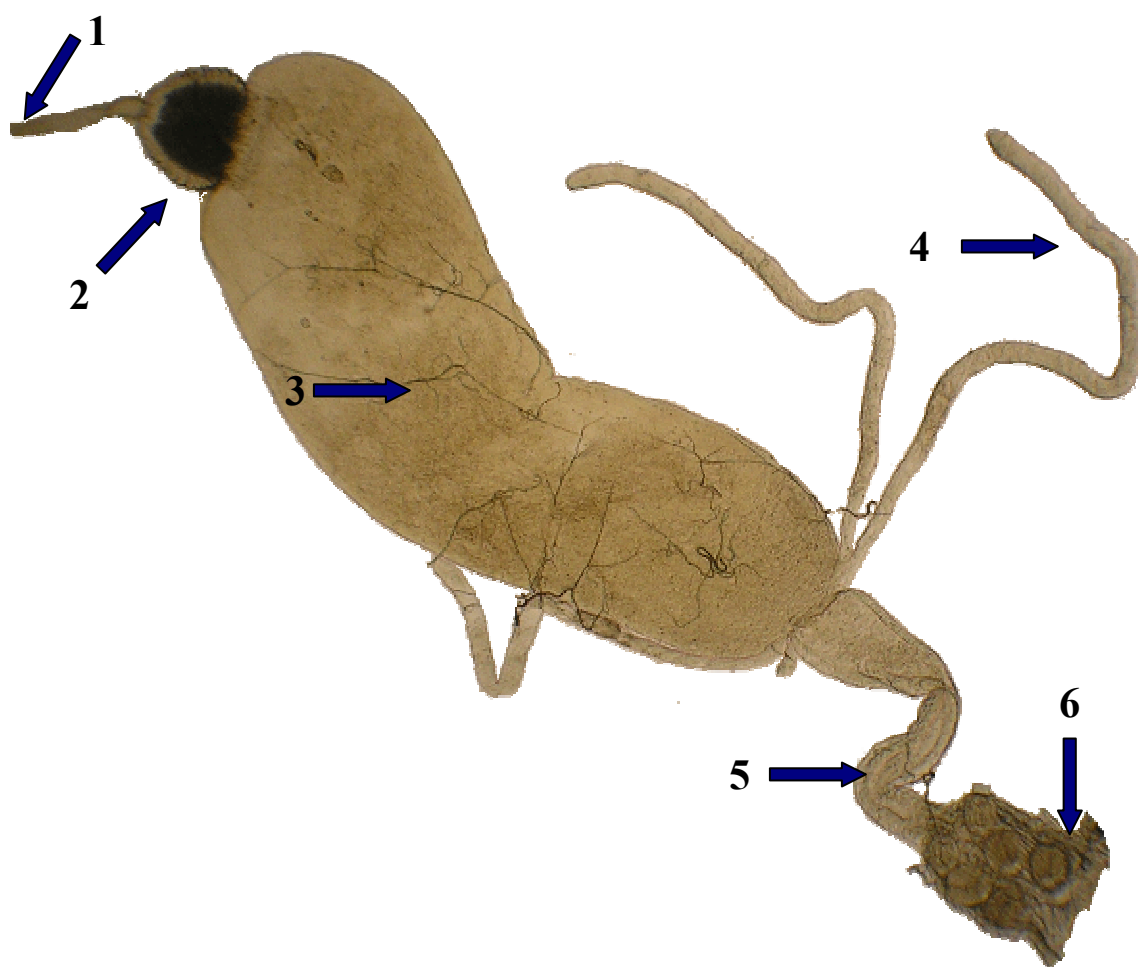


Figura 01- Tubo digestivo de *C. felis felis*. **Legenda:** 1- esôfago; 2- proventriculo; 3- intestino médio; 4- tubo de malpighi; 5- intestino posterior; 6- glândulas retais. (Aumento de 100X).

3.1.5- Isolamento dos tripanosomatídeos em cultivo

Entre os meses de abril a novembro de 2005, 910 pulgas foram dissecadas objetivando-se isolar os tripanosomatídeos presentes no tubo digestivo de *C. felis felis*, além de verificar os endossimbiontes presentes nestas pulgas. Para o isolamento, foi realizada uma alteração de procedimentos, a qual encontra-se explicada logo a seguir.

As pulgas eram pinceladas com uma suspensão de fungicida - Micostatin (Squibb), a 100.000 U/ml e deixadas em placa de Petri forrada com papel de filtro por quatro horas. Após este período elas eram sacrificadas e colocadas em tubos de ensaio contendo solução aquosa a 1:1000 de cloreto de benzalcônio (Zephiran, Winthrop), agitadas vigorosamente durante 15 minutos e lavadas em água destilada estéril. Todos os instrumentos, vidrarias e soluções a serem utilizados para a dissecação eram, previamente, esterilizados. Após exposição, os órgãos eram dissociados em salina com 50 U/mL de sulfato de amicacina e analisados ao microscópio óptico (objetiva de 40X), visando o reconhecimento daqueles positivos para a presença de tripanosomatídeos.

Os tubos digestivos positivos eram transferidos (inteiros ou estourados) para tubos de microcentrífugas individuais contendo solução salina de Locke com 50 U/mL de sulfato de amicacina. Em seguida, centrifugava-se a 500G (microcentrífuga Eppendorf 5415C) por cinco minutos e descartava-se o sobrenadante. Os tripanosomatídeos eram ressuspensos no tubo eppendorf com aproximadamente 1mL de meio NNN- α -MEM (Meio de Novy, McNeal e Nicolle suplementado com Minimum Medium – Alpha Medium) com 10% de soro fetal bovino e suplementado com sulfato de amicacina na mesma concentração acima referida. Centrifugava-se novamente a 500G por cinco minutos e descartava-se o

sobrenadante. Na última etapa, o material era ressuspensão em 500 µL de α -MEM com 10% de soro fetal bovino que eram adicionados a um tubo com 500µL de meio NNN- α -MEM, suplementado com sulfato de amicacina (CARVALHO, 1973).

Para o isolamento foi utilizado o meio de cultura NNN - α -MEM com 10% de soro fetal bovino. Para a manutenção e cultivo dos tripanosomatídeos foram utilizados além deste, o α -MEM e o Meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (MELO *et al.*, 1985). Os tubos contendo o material eram mantidos, em repouso, em estufa de incubação B.O.D, modelo 347, com as temperaturas padrão para avaliação ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), durante um período de seis a oito dias, quando eram examinados e repicados para novo meio, independente de estarem positivos ou não. Este procedimento era repetido por mais duas vezes, no caso da cultura se apresentar negativa.

Uma vez obtida a cultura positiva, os parasitos eram repicados pela transferência de um pequeno inóculo (em torno de 200µL) para tubos 16X160, contendo os meios de cultura já mencionados e, após a terceira passagem, os que haviam se desenvolvido adequadamente, eram transferidos para erlenmeyers contendo o meio de cultura NNN- α -MEM com 10% de soro fetal bovino, com o objetivo de avaliar o crescimento.

3.1.6 – Caracterização morfológica e morfométrica dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos foram identificados em relação às suas formas; desenhados em câmara clara; medidos e fotografados a partir das preparações obtidas do cultivo. As preparações eram realizadas da seguinte forma: os flagelados eram misturados na própria lâmina com uma gota da solução fixadora de Errecart, estendidos em esfregaço fino,

deixado a secar frente a um ventilador e coberto com álcool metílico absoluto por cinco minutos. Depois de fixadas, as preparações eram submetidas à hidrólise ácida. Esta era feita em HCl a 5N por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas em água de torneira antes da coloração pelo Giemsa. Na coloração, eram usadas duas gotas de Giemsa para cada ml de tampão fosfato com pH 7,2 e, após 20 minutos lavava-se a preparação em água corrente (CARVALHO, 1973; PESSÔA & MARTINS, 1988).

Os desenhos foram realizados com a utilização de câmara-clara (Leitz Wetzlar Germany). Os tripanosomatídeos foram medidos de acordo com as recomendações de WALLACE *et al* (1983), utilizando-se 50 espécimes de cada forma. Os parâmetros para as medidas foram (Figura 02): a) comprimento e largura da célula (sem a porção livre do flagelo), b) comprimento e largura do núcleo, c) distância do meio do cinetoplasto à porção anterior, d) distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo, e) comprimento da porção livre do flagelo. Estas medidas foram obtidas com o uso de ocular milimetrada em aumento total de 1000X. Para as formas promastigotas com torção corporal, as medidas foram realizadas com o auxílio de curvímetro (Rum –MateTM) a partir dos desenhos feitos com o auxílio de câmara-clara.

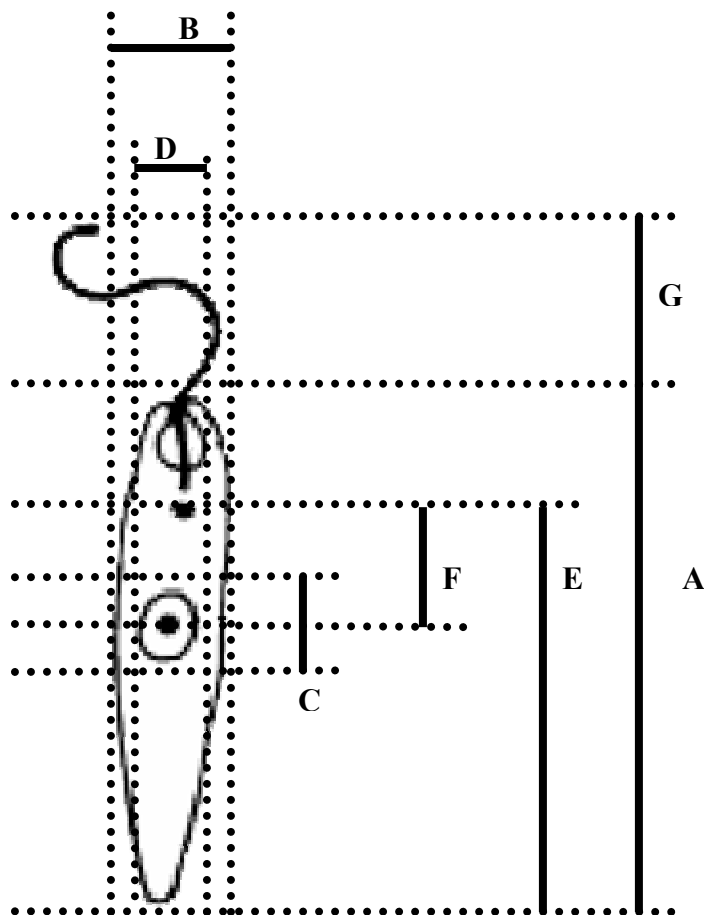


Figura 2- Forma promastigota de tripanosomatídeo. **A-** comprimento da célula; **B-** largura da célula; **C-** comprimento do núcleo; **D** – largura do núcleo; **E-** distância do meio do cinetoplasto à porção anterior; **F-** distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo; **G-** comprimento da porção livre do flagelo.

3.1.7- Avaliação do crescimento dos tripanosomatídeo em diferentes meios de cultura.

No período entre abril e novembro de 2005, foram feitas 19 tentativas de isolamento a partir de 19 pulgas encontradas com tripanosomatídeos. Apenas duas cepas

foram isoladas com sucesso. Destas, apenas uma pôde ser utilizada na avaliação do crescimento, já que a outra não se desenvolveu o suficiente para realização da curva. Inicialmente foram utilizados dois meios (NNN- α -MEM e LIT) para a manutenção e cultivo das cepas isoladas. Entretanto, o desenvolvimento dos tripanosomatídeos somente ocorreu no meio NNN- α -MEM. Os tripanosomatídeos, primeiramente, foram mantidos em duas temperaturas de incubação: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A partir da observação de rotina, foi verificada uma evaporação excessiva do meio de cultura, nos tubos mantidos à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Pela observação diária ao microscópio óptico, verificou-se que o desenvolvimento dos tripanosomatídeos ocorreu de forma semelhante nas duas temperaturas. Desta forma a avaliação do crescimento foi realizada no meio NNN- α -MEM e na temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

A curva de crescimento foi iniciada com inóculo de $5,88 \times 10^6$ parasitos por ml de meio de cultura em erlenmeyers de 50 mL contendo NNN- α -MEM com 10% de soro fetal bovino, sendo 3 mL de base sólida e 5 mL de α -MEM, em duplicatas, utilizando parasitos do 5º dia de cultivo em meio de NNN- α -MEM (CARVALHO, 1973; BEARD *et al.*, 1989).

As culturas eram mantidas apenas no meio NNN- α -MEM com 10% de soro fetal bovino suplementado com sulfato de amicacina e na temperatura de $24^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$. Estas eram examinadas a cada dia ao microscópio antes de se proceder à contagem do número de parasitos para avaliar a ausência de contaminação. O número de parasitos por mL de meio de cultura era verificado a cada 24 horas, em microscópio óptico com objetiva de 40X, utilizando-se a câmara de Neubauer para as contagens. Levando em consideração a quantidade de parasitos observada a cada dia ao microscópio, eram preparadas diluições adequadas com o meio de cultura e solução de Paul (PAUL, 1972). Em cada dia de

contagem eram retirados volumes iguais a 20 μ L de cultura. Este procedimento visou eliminar erros na interpretação dos resultados ao se trabalhar com diluições altas contendo volume pequeno de parasitos.

Os parasitos diluídos eram homogeneizados no agitador Vortex por alguns segundos e, em seguida 20 μ L da solução eram utilizados para contagem na câmara de Neubauer. Duas contagens eram realizadas a cada tempo de avaliação do crescimento. Na ocorrência de grumos de parasitos, novas diluições eram preparadas.

O número final de parasitos por mL de cultura foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Número de parasitos/ ml} = \text{média aritmética de duas contagens} \times 10^4 \text{ (fator de correção da câmara de Neubauer)} \times \text{diluição utilizada.}$$

Estes números obtidos a cada 24 horas foram utilizados para construção da curva de crescimento, que forneceu o perfil de desenvolvimento para a cepa estudada.

3.1.8- Aplicação do teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos isolados de tripanosomatídeos provenientes de *C. felis felis*

3.1.8.1- Obtenção do lisado

A obtenção do lisado dos tripanosomatídeos foi feita a partir das culturas mantidas no meio NNN- α -MEM com 10% de soro fetal bovino suplementado com sulfato de amicacina e na temperatura de 24. $^{\circ}$ C (\pm 1. $^{\circ}$ C).

Após 10 a 12 dias do repique, foram coletados 10⁴ parasitos com o uso de pipetas, os quais foram centrifugados a 500G por 10 minutos em microtubos estéreis (centrífuga

Eppendorf). Em seguida todo o sobrenadante foi retirado e os parasitos foram suspensos em 20 μ L de água mili-Q estéril. Posteriormente foram estocados a 20°C até a realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FIGUEIREDO, 1997).

3.1.8.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para verificar se os tripanosomatídeos isolados de *C. felis felis* pertenciam ao complexo *donovani*, foi utilizado um par de oligonucleotídeos para amplificar um fragmento de 805pb do kDNA, cujas seqüências são: D1: [5'–CGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAATAATAG- 3'] e D2: [5' –GCCCCGCCCTTTGACCCCCAACCACATTTTATC- 3'] (SMYTH *et al.*, 1992).

O DNA extraído de promastigotas de cultura de *Leishmania chagasi* e *Leptomonas seymouri* e as amostras de 2 μ L de lisado osmótico de 10⁴ parasitos obtidos de meio de cultura das duas cepas isoladas (lavada três vezes com tampão-fosfato, pH 7,2) foram amplificadas em 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1.5mM MgCl₂ e 0.01% de gelatina em presença de 0.2mM de cada desoxiribonucleotídeo, 100pmol de cada primer e 2,5 unidades de Taq polimerase (Promega). As amostras foram inicialmente desnaturadas a 93°C por 6 minutos. Os ciclos de anelamento ocorreram a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 93°C por 0,5 minuto. O tempo de extensão aumentou em 3% após cada ciclo, num total de 35 ciclos. Esta reação foi realizada em termociclador (PTC 100, MJ Research, Inc.).

Como controle positivo utilizou-se 10ng de DNA de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) e 10ng de *L. seymouri*. Como controle negativo, utilizou-se um

tubo contendo todos os componentes, exceto o DNA a ser testado. Todas as cepas foram provenientes do criobanco do Laboratório de Biologia de *Leishmania* – Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG).

3.1.8.3- Análise dos produtos do material amplificado na PCR

Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese, aplicando-se 5 μ L do material amplificado em gel de poliacrilamida a 5%, corados pela prata (SANTOS *et al.*, 1993). Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (GIBCO BRL ®). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda de 805 pares de bases (pb).

Para garantir a qualidade da PCR, evitando a ocorrência de falsos positivos, foram utilizados diferentes ambientes para a extração do DNA, Pré-mix, amplificação e análise dos produtos da PCR, além dos processos de descontaminação rotineiras das áreas de trabalho.

3.2- Análise Estatística

O Coeficiente de Prevalência foi utilizado nas seguintes situações:

- a) prevalência de infecção geral;
- b) prevalência de infecção pelo sexo das pulgas;
- c) prevalência de infecções simples e associadas por endossimbiontes distribuídas pelo total e pelo sexo das pulgas

Os índices de Abundância (número médio de parasitos encontrados para o total de hospedeiros examinados) e de Intensidade Média de Parasitismo (quantidade média de parasitismo apenas entre os hospedeiros parasitados) foram empregados para gregarinas e cisticercóides de *Dypilidium caninum*, já que foi possível contar o número de endossimbiontes em cada hospedeiro (*C. felis felis*).

O Índice de Afinidade de Fager (SERRA-FREIRE, 2002) foi utilizado para verificar se houve associação real interespecífica entre os endossimbiontes encontrados em *C. felis felis*.

Todos os dados relativos aos objetivos foram analisados estatisticamente, empregando-se o teste do X^2 . Quando as frequências esperadas eram muito pequenas (10 em cada casela), aplicou-se a respectiva correção de Yates (LEVIN, 1978; SAMPAIO, 1998)

Os dados morfométricos dos tripanosomatídeos foram analisados estatisticamente com a utilização do Teste *t* para significância entre duas médias de amostras observadas.

4. RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1- Endossimbiontes presentes em *C. felis felis*.

Nas pulgas dissecadas foram encontrados os seguintes endossimbiontes: cisticercóides de *Dipylidium caninum*, trofozoítos, gamontes, gametocistos e oocistos de gregarinas da família Actinocephalidae, tripanosomatídeos do gênero *Leptomonas* e microsporídios da espécie *Nolleria pulicis*.

Os cisticercóides imaturos foram identificados como de *D. caninum* (cestódeo comum em cães) e não de *R. nana* através dos parâmetros estabelecidos por (SCHILLER, 1959; MARSHALL, 1967). Nenhum cisticercóide de *Dipylidium caninum* completamente maduro (presença de escólex invaginado, sistema excretor formado e sem cercômero) foi encontrado. Os cisticercóides imaturos observados apresentaram as seguintes características: presença de cercômero posterior retrátil ou não; primórdio das ventosas; invaginação dos ganchos rostelares e formato subsférico (Figuras 3 e 4). Os cisticercóides imaturos de *D. caninum* apresentam comprimento e largura média do corpo de 330 x 150 μ m; comprimento e largura média do cercômero 400 x 50 μ m; ausência de uma cápsula localizada próximo a extremidade anterior do corpo (presente nos cisticercóides de *R. nana*) e formato do corpo subsférico. Dados morfométricos destes cisticercóides (obtidos antes da coloração) são apresentados na Tabela 1. Todas as fêmeas de *C. felis felis* encontradas com este cestódeo, apresentaram ovários degenerados. Nos machos nenhuma alteração estrutural foi observada no sistema reprodutor.

As gregarinas foram identificadas como pertencentes à ordem Eugregarinorida; subordem Septatorina; superfamília Stenophoricae; família Actinocephalidae. Quatro formas foram reconhecidas entre as gregarinas: trofozoítos, gamontes, gametocistos e oocistos. Os trofozoítos são caracterizados por apresentarem protomerito separado do deutomerito por um septo; epimerito com apêndices e presença de um núcleo (Figura 5). Os gametocistos (Figura 6) não possuem esporodutos, sendo que a liberação dos oocistos ocorre pela simples ruptura do gametocisto. Os oocistos são bicônicos (ou em “forma de limão”) (Figura 7). Dados morfométricos dessas formas são apresentados na Tabela 02. Os gamontes foram observados aos pares, ligados ao longo do eixo central (Figuras 8 e 9). Dados morfométricos referentes a esta forma não estão na Tabela 2, já que não são utilizados na identificação destas gregarinas.

Os espécimes do filo Microspora encontrados, foram identificados como pertencentes à família Chytridiopsidae - espécie *Nolleria pulicis*, devido aos seguintes critérios: presença de vesícula “polysporophorous” nas células epiteliais do intestino médio (Figura 10); esporo esférico uninucleado – 2,0 - 2,5 μ m (Figura 11) e hospedeiro de origem sendo *C. felis felis*.

Tabela 1 – Dados morfométricos (μm) dos cisticercóides de *D. caninum** encontrados em *C. felis felis* naturalmente infectadas, capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Cisticercóides		Medições	
Corpo	Amplitude	Média	Desvio Padrão
Comprimento	302 – 330	312,1	9,5
Largura	100 – 170	137,4	17,5
Cercômero			
Comprimento	370 – 410	387,7	10,1
Largura	35 – 50	43,6	3,4

* Medidas de 25 espécimes

Tabela 2 – Dados morfométricos (μm) das formas de gregarinas (Actinocephalidae)* encontradas em *C. felis felis* naturalmente infectadas, capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Parâmetros [†]	Trofozoito (Protomerito e Deutomerito)			Trofozoito (Epimerito)			Gametocisto			Oocistos		
	Amplitude	Média	DP [‡]	Amplitude	Média	DP [‡]	Amplitude	Média	DP [‡]	Amplitude	Média	DP [‡]
C	90-150	121,6	15,2	10 – 30	12	16	170 - 220	193	11	10-13	10	↓
L	-	-	-	10 – 50	35	9	170 – 200	189	10	9-11	9	↓
CCA	50 – 90	73,2	9,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCP	40 – 60	48,9	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CALM	10-100	15,2	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPLM	10 – 120	91,2	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM	40 – 80	67,6	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LE	30 - 60	46,8	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC	20 - 40	31,2	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Medidas de 25 espécimes de cada forma.

† Desvio Padrão

‡ C- Comprimento / L- Largura / CCA – comprimento da constricção a porção anterior / CCP – comprimento da constricção a porção posterior / CALM- distância da porção anterior até a largura máxima / CPLM- distância da porção posterior até a largura máxima / LM- largura máxima / LE- largura na região equatorial / LC- largura da região da constricção

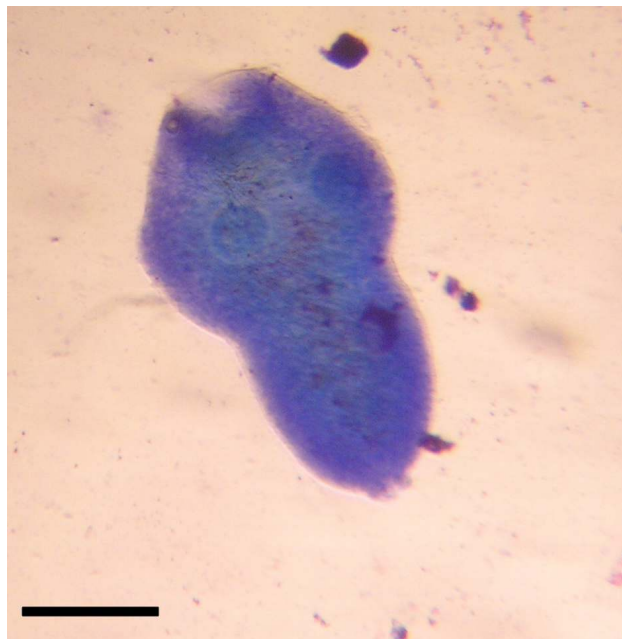


Figura 3- Cisticercóide de *Dipylidium caninum* encontrado na cavidade geral de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala = 80 μ m.



Figura 4- Cisticercóide de *Dipylidium caninum* encontrado na cavidade geral de *Ctenocephalides felis felis*. A seta está indicando um dos ganchos rostellares. Escala = 10 μ m.

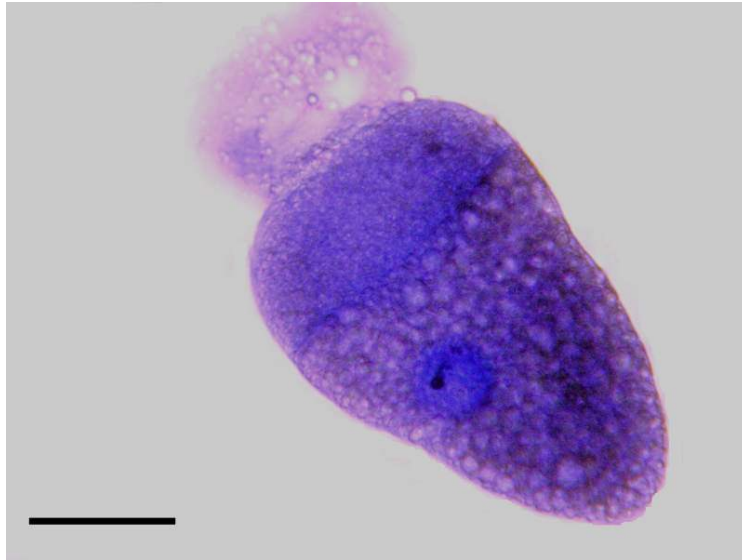


Figura 5- Trofozoíto de gregarina (Actinocephalidae) encontrada no intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala = 30 μ m.



Figura 6- Gametocisto de gregarina (Actinocephalidae) encontrado no intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 60 μ m.

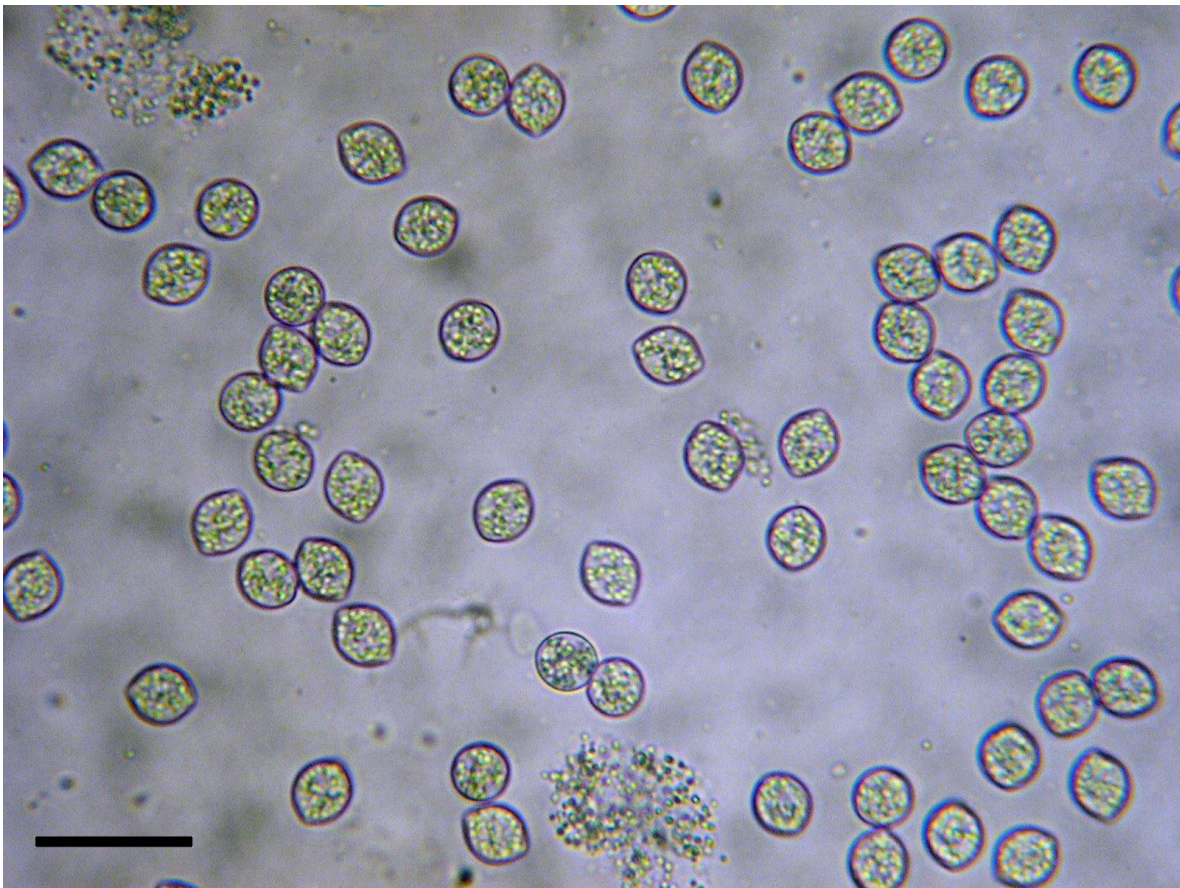


Figura 7- Oocistos de gregarina (Actinocephalidae) liberados após ruptura do gametocisto encontrado no intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 20 μ m.



Figura 8- Gamontes de gregarina (Actinocephalidae) encontrados no intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 80 μ m.

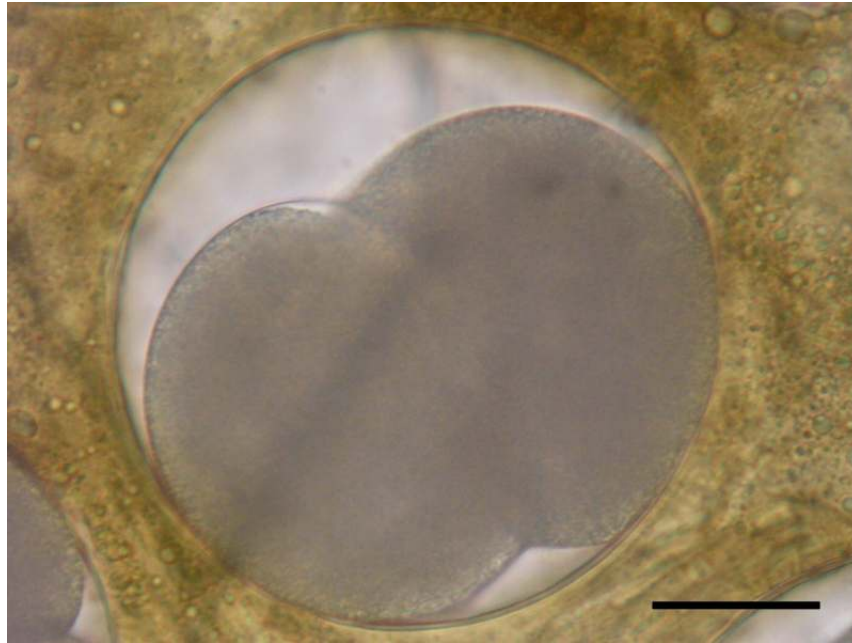


Figura 9- Detalhe de um gamonte de gregarina (Actinocephalidae) encontrado no intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 30 μ m.

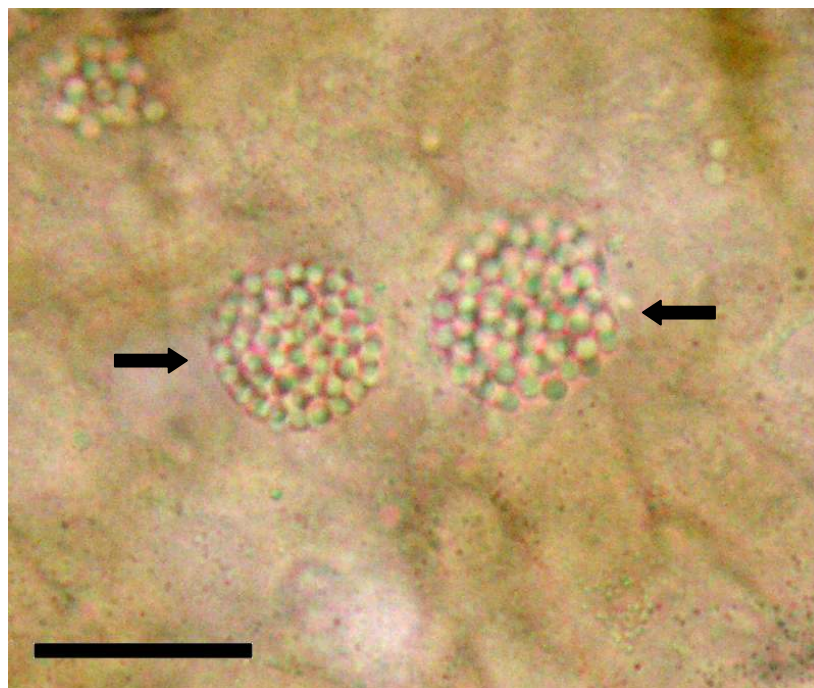


Figura 10- Vesículas “polysporophorous” de *Nolleria pulicis* (nas setas) encontradas nas células epiteliais do intestino médio de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 20 μ m.

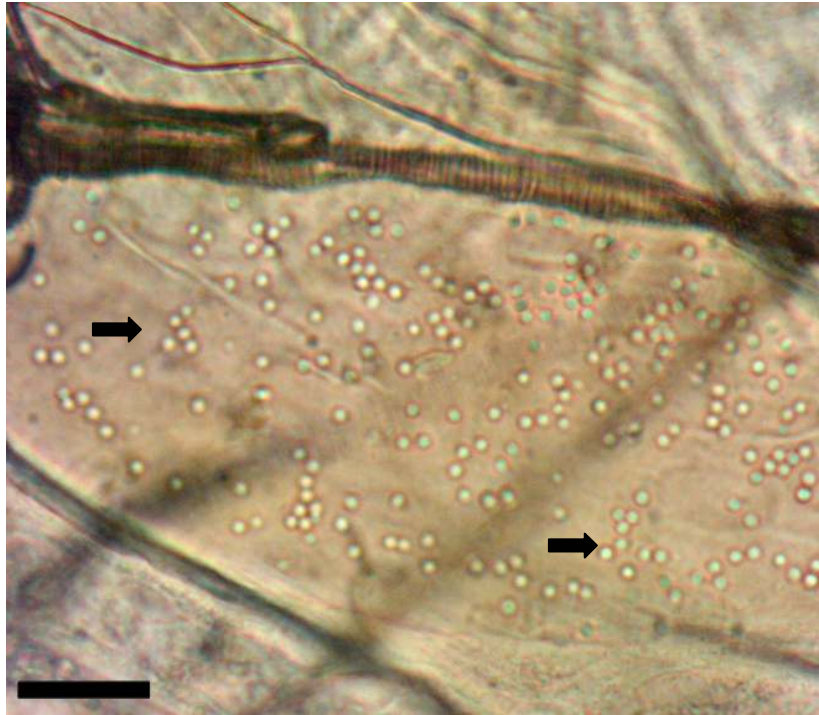


Figura 11- Esporos de *Nolleria pulicis* (nas setas) livres no intestino posterior de *Ctenocephalides felis felis*. Escala = 20 μ m.

4.1.1- Caracterização morfológica e morfométrica dos tripanosomatídeos encontrados no tubo digestivo de *C. felis felis*.

Não foi possível utilizar o material obtido diretamente do tubo digestivo das pulgas para a realização da caracterização morfológica e morfométrica. Desta forma foi utilizado o material obtido do cultivo.

Os tripanosomatídeos apresentaram quatro formas em cultivo: promastigotas sem torção corporal, promastigotas com torção corporal, “amastigotas-like” e cistos. Os dados morfométricos são apresentados na Tabela 03.

Na Tabela 04 são apresentados os valores do teste *t* aplicados na comparação das médias apresentadas pelas formas promastigotas com torção corporal e sem torção corporal. Os resultados obtidos pela aplicação deste teste indicaram que as seguintes variáveis são

discriminatórias: comprimento da célula (CC), largura da célula (LC), comprimento do núcleo (CN), distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo (KN) e comprimento da porção livre do flagelo (CF).

As formas promastigotas encontradas estiveram presentes durante todo o período do cultivo, sendo que as que apresentaram torção corporal tiveram uma maior presença a partir do 3.º dia. Frequentemente as formas promastigotas eram encontradas formando rosáceas. As formas encontradas em divisão foram predominantemente promastigotas em rosáceas e promastigotas sem torção corporal. Poucas formas promastigotas com torção corporal foram encontradas neste estado. As formas amastigotas foram encontradas do 1.º ao 7.º dia de cultivo. Já as formas císticas somente foram encontradas nos últimos dias de cultivo (do 16.º ao 19.º dia). Estas formas císticas apresentaram formato esférico ou ovóide e coraram-se densamente pelo Giemsa.

As formas encontradas encontram-se representadas nas Figuras 12-17 e nos desenhos em câmara clara (Figura 18).

Tabela 3 - Dados morfológicos (μm) das formas de cultivo de *Leptomonas* sp. ^a encontradas em *C. felis felis* naturalmente infectadas, capturadas de cães advindos do Centro de Controle de Zoonozes de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de abril de 2005 a novembro de 2005.

Parâmetro	Forma 01 ^a			Forma 02 ^b			Forma 03 ^c		
	Amplitude	Média	DP	Amplitude	Média	DP	Amplitude	Média	DP
Comprimento Célula (sem flagelo)	10-30	19,3	4,6	6,8-18,8	12,7	2,8	3-7,5	4,1	1,1
Largura da Célula	1,5-6,2	2,8	1,1	0,8-6	2,1	1	1,5-4,5	3,1	0,8
Comprimento do Núcleo	1,6-5,4	3,2	1,1	1,5-3,8	2	0,7	0,8-3	1,7	0,6
Largura do Núcleo	0,8-3,1	1,7	0,4	0,8-3	1,7	0,5	0,8-3	1,4	0,6
Distância do cinetoplasto a porção anterior	0,8-4,6	2,3	1,1	0,8-3,8	2,0	0,7	-	-	-
Distância do cinetoplasto ao núcleo	0,8-3,9	1,7	1,1	0-3,8	1,1	0,6	0-0,8	0,4	0,3
Comprimento da porção livre do flagelo	6,9-24,6	14,4	4,3	3-17,3	8,2	3,5	-	-	-
Número de torções ao longo do corpo	1-4	2	0,84	-	-	-	-	-	-

^a Medidas de 50 espécimes de cada forma.

^a promastigotas com torção corporal

^b promastigotas sem torção corporal

^c amastigotas-like

Tabela 4- Valores do teste t para comparação das médias observadas nas formas promastigotas com torção corporal e sem torção corporal, isoladas do tubo digestivo de *C. felis felis* e cultivadas em meio NNN- α -MEM.

Promastigota com torção corporal X Promastigota sem torção corporal			
Variáveis	Tcalc^a	GL	T1%
CC	9,04	98	*
LC	2,89	98	*
CN	6,69	98	*
LN	0,57	98	-
KA	1,49	98	-
KN	3,42	98	*
CF	7,81	98	*

^a Valor do teste t calculado

* = Significativo a 1% (Ttab = 2,575)

GL – Grau de Liberdade

T1% - 1% de probabilidade de erro

CC – comprimento da célula

LC – largura da célula

CN – Comprimento do núcleo

LN – largura do núcleo

KA – distância do meio do cinetoplasto até a porção anterior

KN – distância do meio do cinetoplasto até o meio do núcleo

CF - comprimento da porção livre do flagelo



Figura 12- Forma promastigota com torção corporal de *Leptomonas* sp. proveniente do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis* e cultivadas no meio NNN- α -MEM. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.

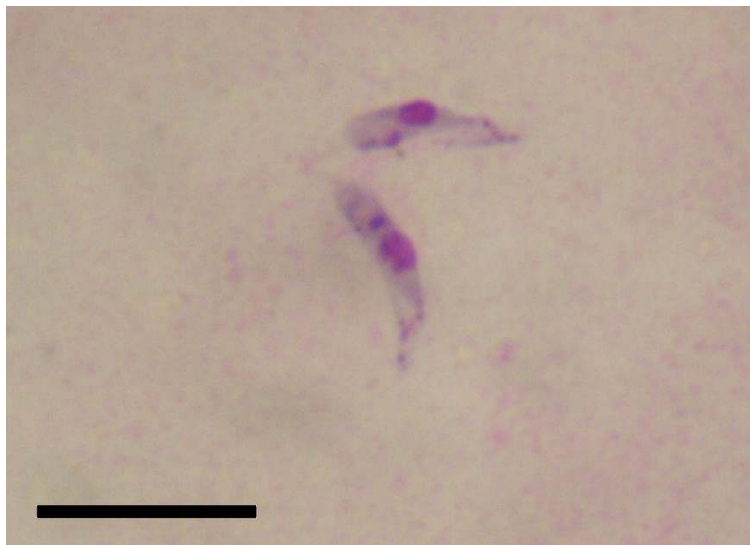


Figura 13- Forma promastigota sem torção corporal de *Leptomonas* sp. provenientes do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis* e cultivadas no meio NNN- α -MEM. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.



Figura 14- Forma “amastigota-like” de *Leptomonas* sp. presente no meio NNN- α -MEM, isolada do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.

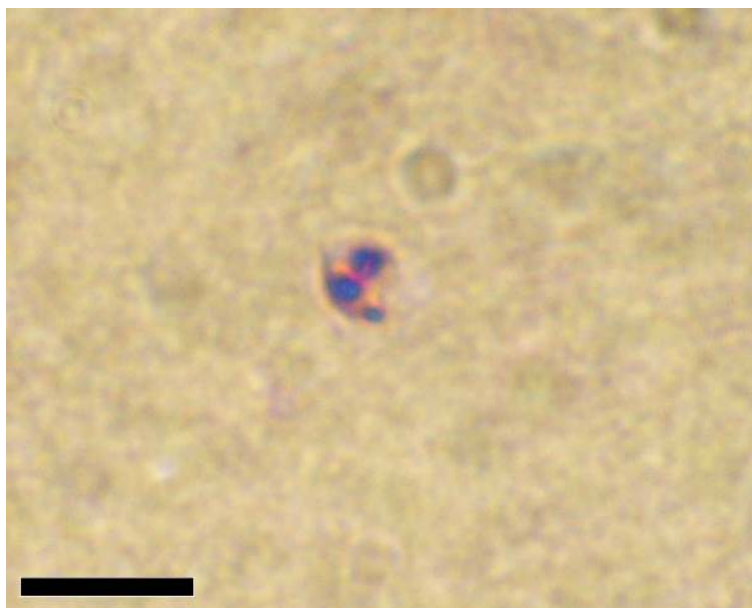


Figura 15- Forma cística de *Leptomonas* sp. presente no meio NNN- α -MEM, isolada do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.

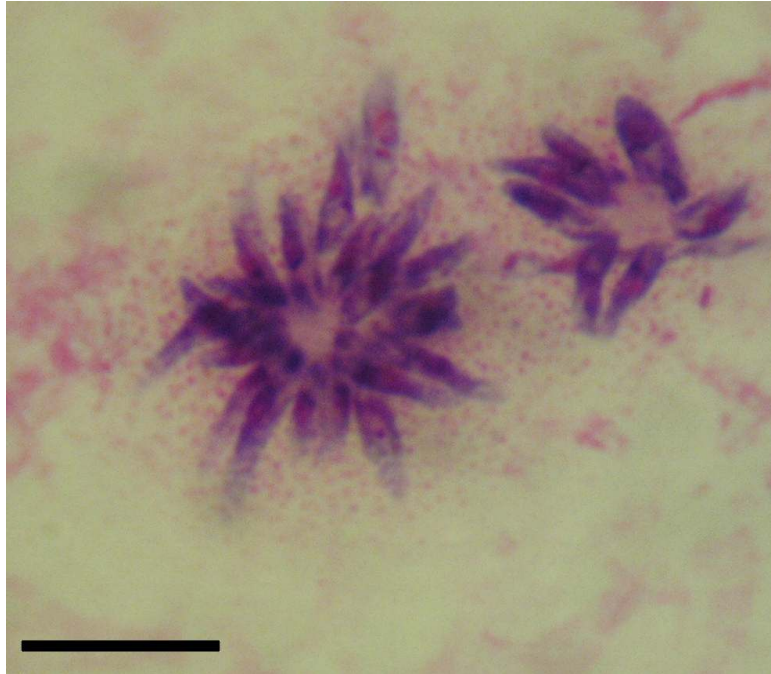


Figura 16- Formas promastigotas em rosáceas de *Leptomonas* sp. presentes no meio NNN- α -MEM, isoladas do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.



Figura 17- Forma promastigota de *Leptomonas* sp. em divisão (na seta), presente no meio NNN- α -MEM, isolada do tubo digestivo posterior de *Ctenocephalides felis felis*. Coloração por Giemsa. Escala= 10 μ m.

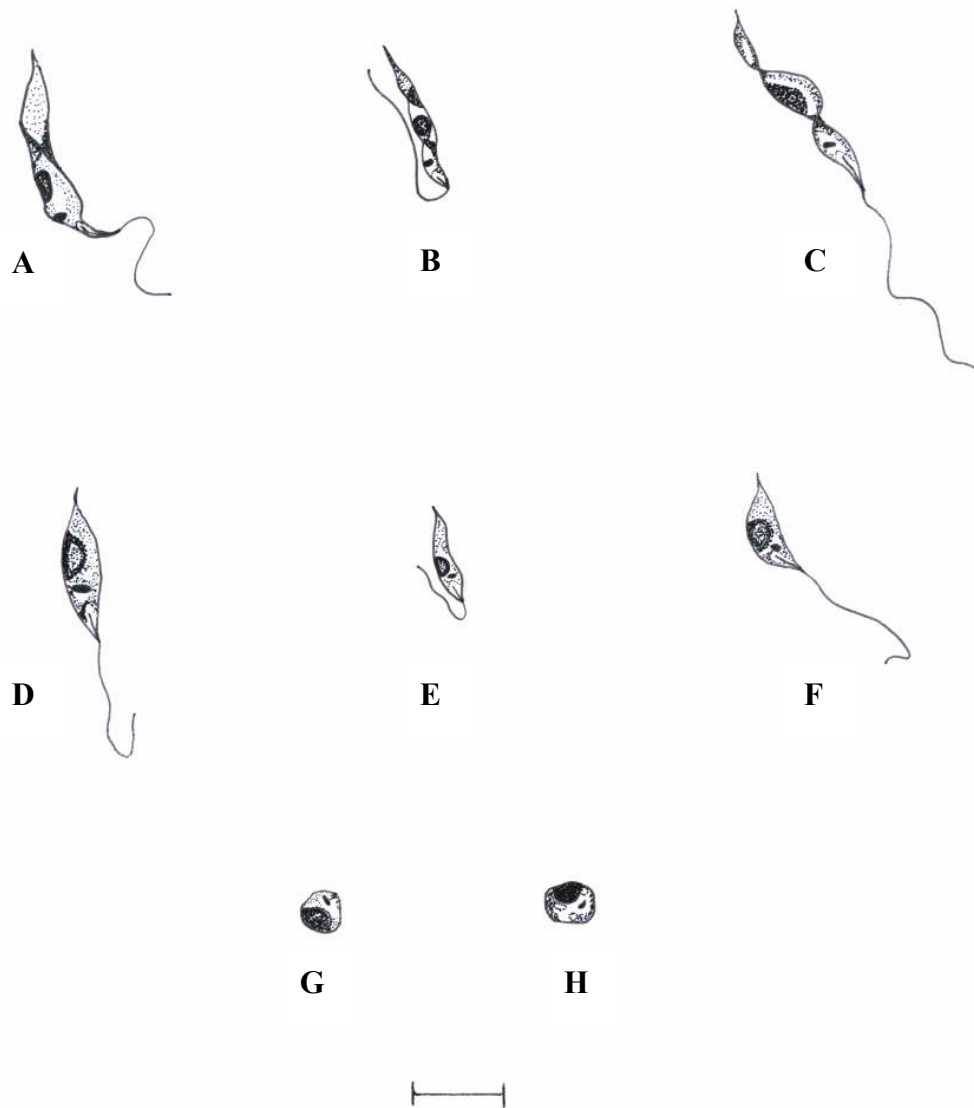


Figura 18- Desenhos em câmara-clara das formas evolutivas dos tripanosomatídeos isolados do tubo digestivo posterior de *C. felis felis* e cultivadas no meio NNN- α -MEM. A, B e C – formas promastigotas com torção corporal de *Leptomonas* sp. D, E e F – formas promastigotas sem torção corporal de *Leptomonas* sp. G e H – Fomas “amastigotas-like” de *Leptomonas* sp. Escala = 10 μ m.

4.1.2- Avaliação do crescimento dos tripanosomatídeos no meio NNN- α -MEM e à temperatura de 24.°C \pm 1.°C.

O perfil de desenvolvimento da cepa isolada encontra-se representado na Figura 18.

A avaliação do crescimento desta cepa mostrou que inicialmente houve um decréscimo do número de tripanosomatídeos, já que o inóculo inicial foi de $5,88 \times 10^6$ células/ml. Houve uma fase lag de crescimento do primeiro ao nono dia. A fase logarítmica ou exponencial ocorreu do nono ao 16.º dia, sendo que ocorreram dois picos de crescimento (o primeiro no 14.º dia e o segundo no 16.º dia). É importante destacar que não houve fase estacionária, já que a partir do 16.º dia, a cultura entrou em declínio (Figura 19).

As outras tentativas de isolamento fracassaram devido à contaminação fúngica (cinco casos), contaminação bacteriana (um caso) e a não-adaptação ao meio (11 casos). Foi verificado que os tripanosomatídeos que se adaptaram ao meio eram provenientes de tubos digestivos de *C. felis felis* que não foram rompidos para a realização da técnica de isolamento.

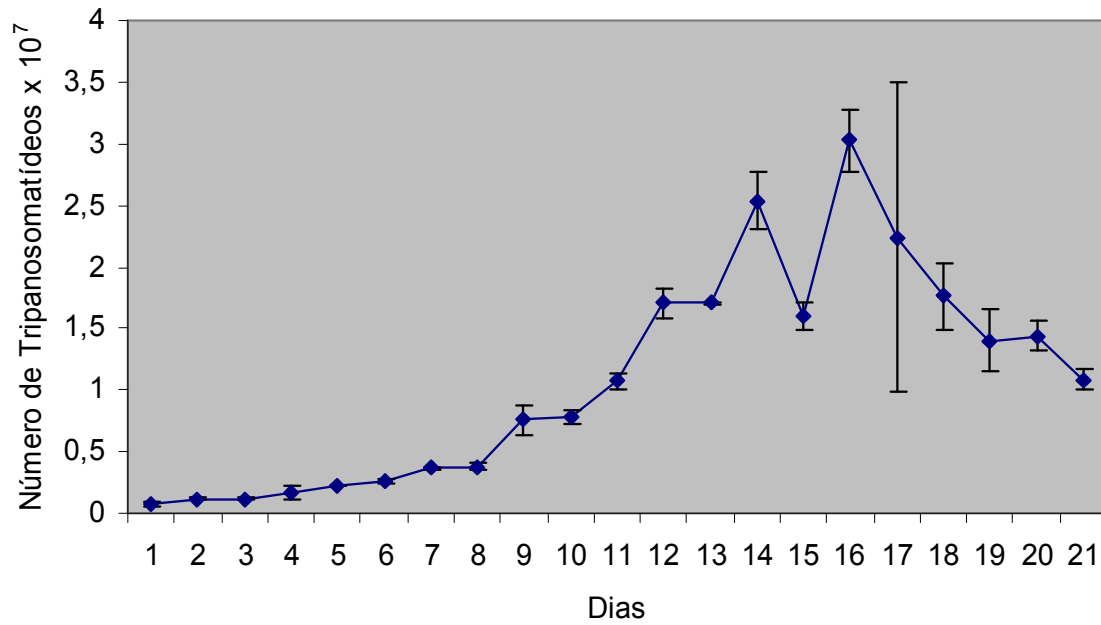


Figura 19- Crescimento de *Leptomonas* sp. isolado do tubo digestivo posterior de uma fêmea de *C. felis felis*, em NNN- α -MEM, inoculo inicial de $5,8 \times 10^6$ células/ml, à $24.^\circ\text{C} \pm 1.^\circ\text{C}$. Cada ponto representa a média de duas determinações e as barras verticais representam os desvios padrões.

4.1.3- Aplicação do teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos isolados de tripanosomatídeos provenientes de *C. felis felis*.

Os dados relativos à PCR realizada a partir dos dois isolados de tripanosomatídeos obtidos do tubo digestivo posterior de *C. felis felis* encontram-se representados na Figura 20. A análise do material quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstrou que apenas na canaleta cinco (controle positivo – *Leishmania chagasi*) foi amplificado um segmento de DNA contendo 805pb. Portanto, o material isolado de *C. felis felis* não continha *Leishmania chagasi*.

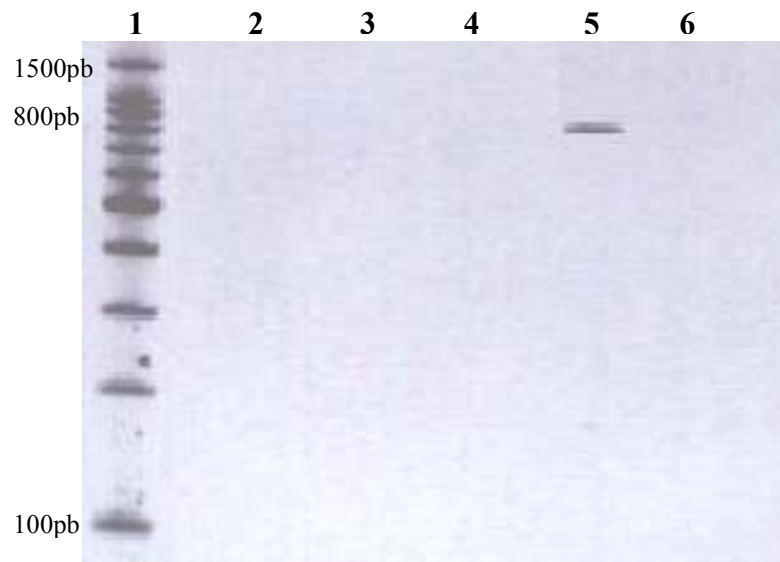


Figura 20- Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR obtidos para confirmação de diagnóstico específico para *Leishmania chagasi* – Marcador do tamanho molecular (1); isolado 01 de *Ctenocephalides felis felis* (2); isolado 02 de *C. felis felis* (3); DNA de *Leptomonas seymouri* (4); controle positivo: *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) (5); controle negativo – sem DNA(6)

4.1.4- Determinação dos sítios de infecção dos endossimbiontes em *C. felis felis*.

Na Tabela 5 são observados para cada endossimbionte os seus sítios de infecção e suas respectivas porcentagens.

Tabela 5- Sítios de predileção e respectivos índices de infecção em pulgas *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, e dissecadas entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.

Endossimbiontes	Nº de pulgas infectadas	Sítio de Infecção	Índices em pulgas infectadas (%)
Gregarina (Actinocephalidae)	190	Intestino Médio/ Intestino Posterior	99,2% (IM) / 0,8% (IP) ^{1,a}
<i>Leptomonas</i> sp.	47	Intestino Posterior / Túbulos de Malpighi	100% (IP) / 4,25% (TM) ^a
<i>N. pulicis</i>	50	Intestino Médio / Intestino Posterior	94% (IM) / 6% (IP) ^{a/2} 80% (IP) ³
<i>D. caninum</i>	08	Cavidade Geral	100% ⁴

1- Refere-se às formas de trofozoítos, gametocistos, gamontes e oocistos

2- Refere-se às vesículas “polysporophorus”.

3- Refere-se aos esporos

4- Refere-se aos cisticercóides

^a IM – Intestino Médio; IP – Intestino Posterior; TM – Túbulos de Malpighi

Os microsporídios da espécie *N. pulicis* foram encontrados em vesículas do tipo “polysporophorus”, no intestino médio. No intestino posterior foram observados esporos, frequentemente livres (em 80%). Os tripanosomatídeos (*Leptomonas* sp.) foram encontrados aderidos à parede do intestino posterior, ou livres em seu lúmem. Em várias ocasiões foram observados aglomerados de tripanosomatídeos próximos à válvula pilórica (entre o intestino médio e o posterior). Em duas pulgas (4,25%), os tripanosomatídeos foram encontrados também nos túbulos de Malpighi. Para as gregarinas foi observada a

seguinte distribuição: gametocistos, trofozoítos e gamontes (intestino médio - 99,2% e intestino posterior – 0,8%) oocistos (nos intestinos médio e posterior – 2,1%).

Não foram encontrados endossimbiontes (protozoários e helmintos) nas glândulas salivares, nos ovários e testículos.

4.2- Índices e coeficientes de infecção por endossimbiontes em *C. felis felis*.

4.2.1- Prevalência de endossimbiontes em *C. felis felis*.

A partir das 1500 pulgas *C. felis felis* dissecadas, foram obtidos os seguintes dados: a) prevalência de infecção geral; b) prevalência de infecção pelo sexo das pulgas; c) prevalência de infecções simples e associadas por endossimbiontes distribuídas pelo total e pelo sexo das pulgas. Os dados representados na Tabela 6 mostram que 18% das pulgas dissecadas continham endossimbiontes, seja em infecções simples ou associadas. Entre os endossimbiontes observados para infecções simples, as gregarinas (Actinocephalidae) foram as mais prevalentes (11%), seguidas por *N. pulicis* (3,2%), *Leptomonas* sp. (1,7%) e *D. caninum* (0,4%).

O teste de significância aplicado para verificar a relação entre os coeficientes de prevalência obtidos e o sexo das pulgas, foi o do Qui-Quadrado (X^2). Os resultados obtidos foram os seguintes: gregarinas e sexo das pulgas ($X^2= 3,97$); cisticercóides de *D. caninum* e sexo das pulgas ($X^2= 0,007$ / Yates); *Leptomonas* sp. e sexo das pulgas ($X^2= 1,85$); *N. pulicis* e sexo das pulgas ($X^2=2,4$).

Tabela 6- Prevalências de infecção natural (simples e associadas) por grupos de endossimbiontes (protozoários e helmintos), em *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.

<i>C. felis felis</i>						
Grupo de Endossimbiontes	Machos (448)		Fêmeas (1052)		Total (1500)	
	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
Infecções Simples (244)						
Actinocephalidae	40	(8.9)	125	(11.9)*	165	(11)
<i>D. caninum</i>	02	(0.5)	04	(0.4)	06	(0.4)
<i>Leptomonas</i> sp	05	(1.1)	20	(1.9)	25	(1.7)
<i>N. pulicis</i>	10	(2.2)	38	(3.6)	48	(3.2)
Total	57	(12.7)	187	(17.8)	244	(16.3)
Infecção Dupla (24)						
Actinocephalidae / <i>Leptomonas</i> sp	05	(1.1)	16	(1.5)*	21	(1.4)
Actinocephalidae / <i>D. caninum</i>	—	—	02	(0.2)	02	(<0.1)
Actinocephalidae / <i>N. pulicis</i>	—	—	01	(0.1)	01	(<0.1)
Total	05	(1.1)	19	(1.8)	24	(1.6)
Infecção Tripla (01)						
Actinocephalidae / <i>Leptomonas</i> sp / <i>N. pulicis</i>	—	—	01	(0.1)*	01	(<0.1)
Total (269)	62	(13.8)	207	(19.7)	269	(18)

* $\chi^2 = 3,97$ (p<0,05)

4.2.2- Associação entre endossimbiontes

Ainda que dois ou mais endossimbiontes tenham sido encontrados em *C. felis felis*, o cálculo do Índice de Afinidade de Fager leva em consideração apenas a associação de dois endossimbiontes. Os resultados referentes a este índice encontram-se na Tabela 7. Pelos resultados encontrados, ficou evidenciado que existe uma associação real altamente significativa ($p < 0.01$) entre gregarina (Actinocephalidae) e *Leptomonas* sp.; gregarina (Actinocephalidae) e *N. pulicis*; gregarina (Actinocephalidae) e *D. caninum*; *Leptomonas* sp. e *N. pulicis*.

Tabela 7 – Índices de afinidade e seus correspondentes “t” calculados para endossimbiontes encontrados em *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Endossimbiontes	Iab ^a	Tcalc ^b	T1%
Gregarina x <i>Leptomonas</i> sp.	0,18	-6,6	*
Gregarina x <i>N. pulicis</i>	0,02	-11,3	*
Gregarina x <i>D. caninum</i>	0,02	-14,9	*
<i>Leptomonas</i> sp. x <i>N. pulicis</i>	0,02	-9,6	*

* = Significativo a 1% (Ttab = 2,575)

^a = Índice de Afinidade de Fager / ^b = valor calculado de “t”.

4.2.3- Índices de abundância e intensidade média de parasitismo

O Índice de Abundância (IA) corresponde ao número médio de parasitos encontrados para o total de hospedeiros examinados. Já o índice de Intensidade Média de Parasitismo (IMP) corresponde à quantidade média de parasitismo só entre os hospedeiros parasitados.

Os resultados referentes a estes índices para gregarinas – Actinocephalidae e cisticercóides de *D. caninum* foram:

- gregarinas (Actinocephalidae):

$$IA = 1$$

$$IMP = 5.6$$

- cisticercóides de *D. caninum*:

$$IA = 0,13$$

$$IMP = 0,72$$

4.3- Relação entre os índices de infecção de *C. felis felis* e sazonalidade

De 1500 pulgas *C. felis felis*, 269 se apresentaram com endossimbiontes (protozoários e helmintos). Na Tabela 8 estão indicados esses totais, bem como os respectivos índices para cada um dos endossimbiontes, discriminados mensalmente e arranjos segundo os períodos estacionais. Na Tabela 9, estes valores estão rearranjados, de modo a permitir a avaliação da correlação entre a infecção e as estações climáticas

(seca-fria e chuvosa-quente), através do teste de significância do X^2 (qui-quadrado). Os coeficientes de prevalência de infecção por endossimbiontes (geral e por sexo de *C. felis felis*) distribuídos de acordo com os meses do estudo, encontram-se representados na Figura 21. As Figuras 22 - 25 representam as distribuições das prevalências de infecções simples e associadas por endossimbiontes (para o total, para fêmeas e para machos), entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.

Conforme apresentado na Tabela 08 e nas Figuras 21 a 25, a infecção das pulgas é variável ao nível mensal ou estacional. A estação chuvosa-quente apresentou o maior número de pulgas infectadas (159) e também o maior índice de infecção (20,1%). Excetuando-se *D. caninum* com pequeno número de indivíduos encontrados, para os demais endossimbiontes a infecção nas pulgas foi maior na estação chuvosa-quente, chegando quase a duas ou três vezes naquelas ocasionadas por *Leptomonas* e *N. pulicis* (Tabela 09). As gregarinas (Actinocephalidae) não se apresentaram tão afetadas pelas mudanças estacionais (Tabelas 08 e 09). Já para *Leptomonas* foram verificadas diferenças significativas nos índices de infecção estacional ($X^2= 4,53$; $p< 0,05$) e para *N. pulicis* ($X^2=13,37$) ao nível de 1%. Considerando os endossimbiontes em conjunto, a distribuição da infecção através dos períodos estacionais não se realiza ao acaso: $X^2= 5,43$; $p<0,05$ (Tabela 09).

As taxas de infecção sazonal e o número (média / desvio-padrão) de trofozoítos, gamontes e gametocistos de gregarinas (Actinocephalidae) encontram-se representados nas Tabelas 10 (para fêmeas), 11 (para machos) e 12 (total = fêmeas + machos).

A Tabela 13 apresenta os dados referentes à relação entre as formas evolutivas de gregarinas (Actinocephalidae) de *C. felis felis* e as estações climáticas (seca-fria e chuvosa-

quente) e a avaliação desta correlação através do teste de significância do X^2 (quadrado).

Tabela 8: Índices de infecção mensal e/ou estacionais dos endossimbiontes em *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, entre dezembro de 2004 e novembro de 2005.

Época	Pulgas N.º	<i>C. felis felis</i> parasitadas com										
		Gregarinas		<i>D. caninum</i>		<i>N. pulicis</i>		<i>Leptomonas</i>		Endossimbiontes		
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
abr 05	110	17	15,4	0	0	6	5,4	0	0	23	21	
Seca-fria	mai 05	120	10	8,3	0	0	0	0	4	3,3	14	11,7
	jun 05	90	9	10	1	1,1	0	0	1	1,1	11	12,2
	jul 05	130	6	4,6	1	0,8	0	0	1	0,8	8	6,1
	ago 05	130	22	16,9	0	0	2	1,5	8	6,1	29	22,3
	set 05	130	20	15,4	5	3,8	3	2,3	1	0,8	25	19,2
Total	710	84	11,8	7	1	11	1,5	15	2,1	110	15,5	
Chuvosa- quente	out 05	140	20	14,3	0	0	6	4,3	2	1,4	27	19,3
	nov 05	140	7	5	0	0	0	0	0	0	7	5
	dez 04	130	43	33,1	0	0	1	0,8	28	21,5	54	41,5
	jan 05	130	14	10,8	0	0	2	1,5	2	1,5	18	13,8
	fev 05	130	9	6,9	0	0	17	13,1	0	0	26	20
	mar 05	120	13	10,8	1	0,8	13	10,8	0	0	27	22,5
Total	790	106	13,4	1	0,1	39	4,9	32	4	159	20,1	

Tabela 9: Relação entre os endossimbiontes de *C. felis felis* e as estações climáticas na região urbana de Belo Horizonte, MG, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Pulgas examinadas e endossimbiontes	Estação				Total		X ²
	Seca-fria		Chuvosa-quente				
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
<i>C. felis felis</i> examinadas	710	-	790	-	1500	-	
Infetadas com:							
Gregarina	84	11,8	106	13,4	190	12,7	0,85
Leptomonas	15	2,1	32	4	47	3,1	4,53
<i>N. pulicis</i>	11	1,5	39	4,9	50	3,3	13,37
<i>D. caninum</i>	7	1	1	0,1	8	0,5	3,67*
endossimbiontes	110	15,5	159	20,1	269	17,9	5,43

$\alpha_{0,05} = 3,84$ $\alpha_{0,01} = 6,63$

* X² Yates

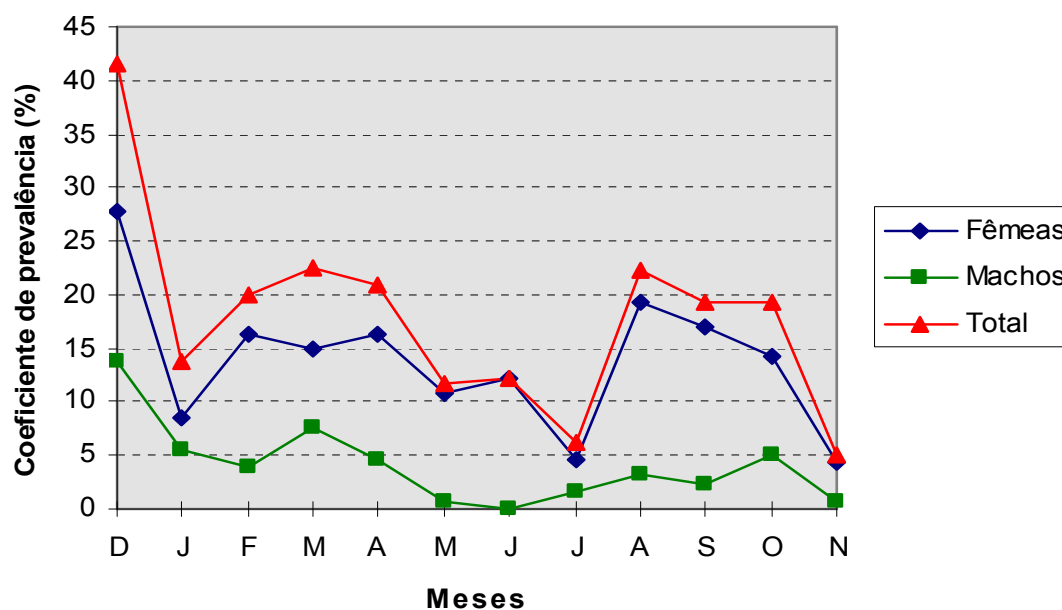
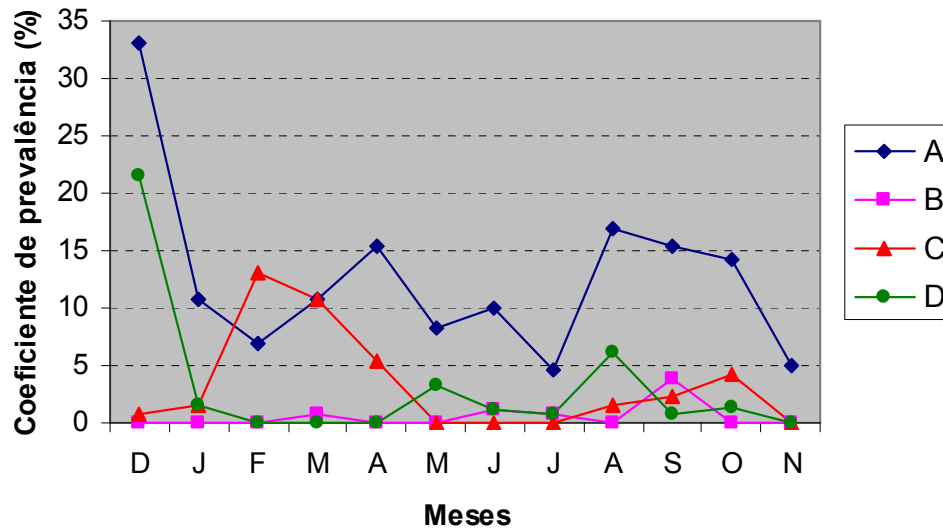
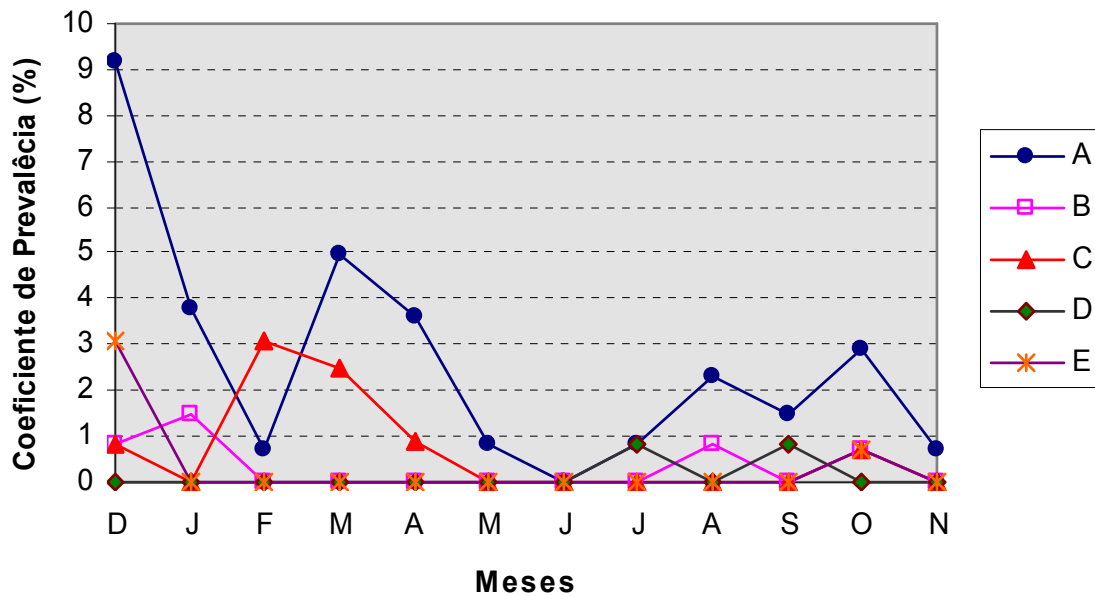


Figura 21 - Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por endossimbiontes (simples e associadas) em *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.



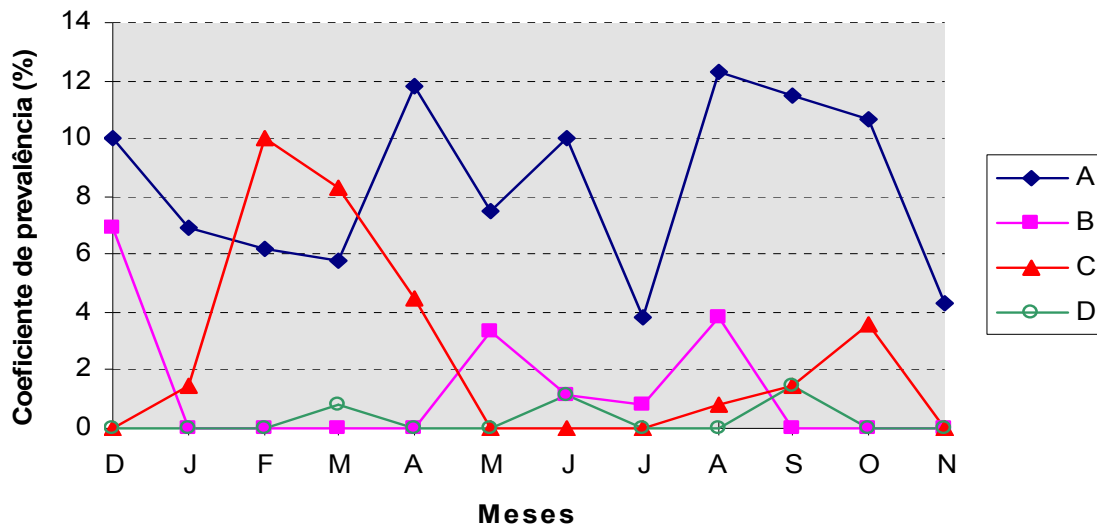
Legenda: A- Actinocephalidae; B- *D. caninum*; C- *N. pulicis*; D- *Leptomonas* sp.

Figura 22- Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por grupos de endossimbiontes em pulgas *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.



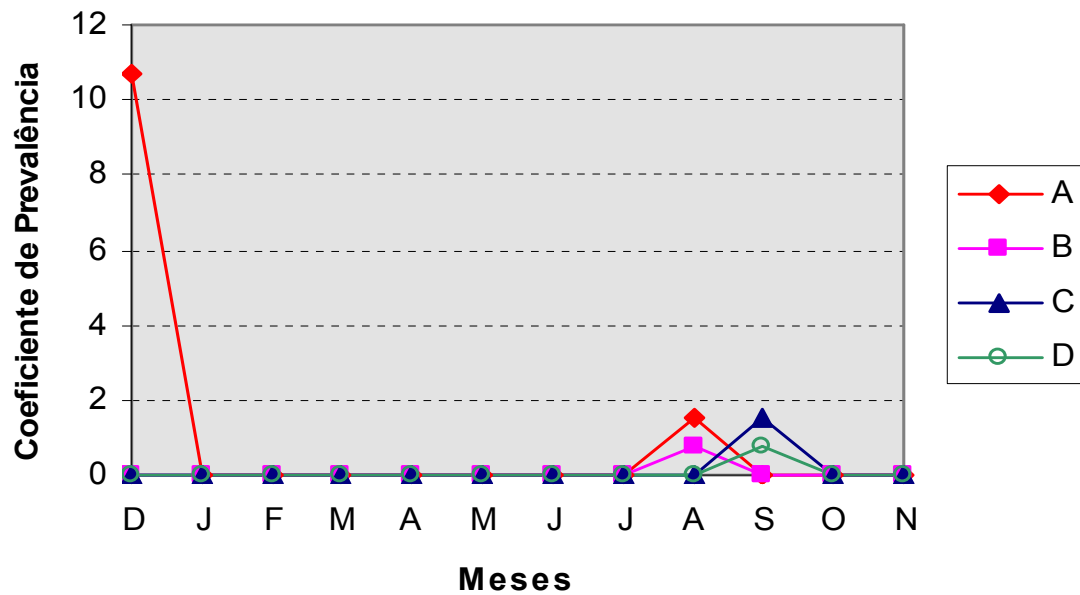
Legenda: A – Actinocephalidae; B- *Leptomonas* sp.; C- *N. pulicis*; D- *D. caninum*; E- Actinocephalidae + *Leptomonas* sp.

Figura 23- Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções por grupos de endossimbiontes (simples e associadas) em machos de *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.



Legenda: **A** – Actinocephalidae; **B**- *Leptomonas* sp.; **C**- *N. pulicis*; **D**- *D. caninum*

Figura 24- Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções simples por grupos de endossimbiontes, em fêmeas de *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.



Legenda: A- Actinocephalidae + *Leptomonas*; B- Actinocephalidae + *N. pulicis*; C- Actinocephalidae + *D. caninum*; D- Actinocephalidae + *N. pulicis* + *Leptomonas*

Figura 25- Coeficiente de prevalência mensal relativo ao período de dezembro de 2004 a novembro de 2005, sobre infecções associadas por grupos de endossimbiontes, em fêmeas de *C. felis felis* capturadas sobre cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil.

Tabela 10 - Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de fêmeas de *C. felis felis* infectada naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturada de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG - Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Meses	N.º de pulgas fêmeas com gregarinas	N.º Trofozoítos ^a	Taxa de infecção (%)	N.º Gamontes ^a	Taxa de infecção (%)	N.º Gametocistos ^a	Taxa de infecção (%)
Dez/04	27	11 ± 3,6	11,1	0 ± 0	-	8,9 ± 5,4	88,9
Jan/05	9	27 ± 0	11,1	0 ± 0	-	9,4 ± 5,6	88,9
Fev/05	8	0 ± 0	-	0 ± 0	-	7,1 ± 10,4	100
Mar/05	7	12,5 ± 0,71	28,6	0 ± 0	-	2 ± 2,2	71,4
Abr/05	13	10 ± 0	7,7	0 ± 0	-	9,7 ± 7,6	100
Mai/05	9	0 ± 0	-	23 ± 0	11,1	4,7 ± 4	100
Jun/05	9	2 ± 0	11,1	4 ± 2,6	44,4	7,8 ± 6,1	55,6
Jul/05	5	9 ± 0	20	0 ± 0	-	2,7 ± 0,96	80
Ago/05	19	1,33 ± 0,58	15,8	17,3 ± 13	31,6	6,2 ± 3,6	52,6
Set/05	18	11,2 ± 10,5	27,8	9,2 ± 7,7	27,8	5,1 ± 2,8	55,5
Out/05	15	19 ± 0	6,7	1 ± 0	6,7	9,9 ± 11,3	93,3
Nov/05	6	16 ± 0	16,7	5,5 ± 4,9	33,3	13,3 ± 11	50

^a Média ± Desvio-padrão

Tabela 11 - Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de machos de *C. felis felis* infectada naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturada de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Meses	N.º de pulgas macho com gregarina	N.º trofozoítos ^a	Taxa de infecção (%)	N.º gamontes ^a	Taxa de infecção (%)	N.º gametocistos ^a	Taxa de infecção (%)
Dez04	16	7 ± 0	6,25	0 ± 0	-	7,7 ± 4	93,75
Jan05	5	15 ± 0	20	0 ± 0	-	6 ± 4,6	80
Fev05	1	0 ± 0	-	0 ± 0	-	3 ± 0	100
Mar05	6	0 ± 0	-	0 ± 0	-	5,7 ± 7,5	100
Abr05	5	0 ± 0	-	0 ± 0	-	1,7 ± 1	100
Mai05	1	13 ± 0	100	8 ± 0	100	0 ± 0	-
Jun05	0	0 ± 0	-	0 ± 0	-	0 ± 0	-
Jul05	1	0 ± 0	-	0 ± 0	-	2 ± 0	100
Ago05	3	0 ± 0	-	10 ± 0	33,3	1 ± 0	66,7
Set05	2	0 ± 0	-	1 ± 0	50	4 ± 0	50
Out05	5	0 ± 0	-	2 ± 0	20	2,7 ± 2,1	80
Nov05	1	2 ± 0	100	0 ± 0	-	0 ± 0	-

^a média ± desvio-padrão

Tabela 12- Taxa de infecção sazonal e número de trofozoítos, gamontes e gametocistos em uma população de adultos (machos e fêmeas) de *C. felis felis* infectada naturalmente com gregarinas da família Actinocephalidae e capturada de cães advindos do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG – Brasil, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Meses	N.º de pulgas com gregarinas	N.º Trofozoítos ^a	Taxa de infecção (%)	N.º Gamontes ^a	Taxa de infecção (%)	N.º Gametocistos ^a	Taxa de infecção (%)
Dez/04	43	10 ± 3,56	9,3	0 ± 0	-	8,4 ± 4,9	90,7
Jan/05	14	21 ± 8,49	14,3	0 ± 0	-	8,4 ± 5,4	85,7
Fev/05	9	0 ± 0	-	0 ± 0	-	6,7 ± 9,8	100
Mar/05	13	12,5 ± 0,71	15,4	0 ± 0	-	4 ± 5,8	84,6
Abr/05	17	10 ± 0	5,9	0 ± 0	-	7,8 ± 7,5	100
Mai/05	10	13 ± 0	10	15,5 ± 10,6	20	4,7 ± 4	90
Jun/05	9	2 ± 0	11,1	4 ± 2,6	44,4	7,8 ± 6,1	55,5
Jul/05	6	9 ± 0	16,7	0 ± 0	-	2,6 ± 0,9	100
Ago/05	22	1,33 ± 0,58	13,6	16,3 ± 12,2	31,8	5,3 ± 3,8	54,6
Set/05	20	11,2 ± 10,5	25	7,8 ± 7,6	30	5 ± 2,7	55
Out/05	20	19 ± 0	5	1,5 ± 0,7	10	8,3 ± 10,4	90
Nov/05	7	9 ± 9,9	28,6	5,5 ± 4,9	28,6	13,3 ± 11	42,8

^amédia ± desvio-padrão

Tabela 13: Relação entre as formas evolutivas de gregarinas (Actinocephalidae) em *C. felis felis* e as estações climáticas na região urbana de Belo Horizonte, MG, no período de dezembro de 2004 a novembro de 2005.

Pulgas examinadas e endossimbiontes	Estação				Total		X ²
	Seca-fria		Chuvosa-quente				
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
N.º de gregarinas	84	-	106	-	190	-	
Estágio evolutivo:							
Trofozoíto	12	14,3	11	10,4	23	12,1	0,65
Gamonte	19	22,6	4	3,8	23	12,1	15,53
Gametocisto	60	71,4	92	86,8	152	80	6,9
	$\alpha_{0,05} = 3,84$		$\alpha_{0,01} = 6,63$				

4.4- Relação entre os índices de infecção de *C. felis felis* por cisticercóides de *D. caninum* e o sexo e a idade aproximada dos cães.

O teste de significância aplicado para verificar a relação entre os cisticercóides de *D. caninum* encontrados no tubo digestivo de *C. felis felis* e o sexo ou a idade aproximada dos cães (hospedeiros destas pulgas), foi o do Qui-Quadrado (X²). Os resultados obtidos foram os seguintes: cisticercóides de *D. caninum* e sexo dos cães (X²= 0,007 / Yates/ p>0,05); cisticercóides de *D. caninum* e idade aproximada dos cães: (X²= 0,4 / Yates/ p>0,05). Portanto, não foi verificada diferença estatística significativa entre os índices de infecção de *C. felis felis* por cisticercóides de *D. caninum* e o sexo ou a idade aproximada dos cães sobre os quais as pulgas foram capturadas.

5. DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

5.1- Endossimbiontes presentes em *C. felis felis*

Neste estudo foram encontrados em *C. felis felis*: *D. caninum*, gregarinas da família Actinocephalidae, *Leptomonas* sp. e *Nolleria pulicis*.

Relativamente a *D. caninum* os dados morfométricos dos cercômeros apresentados na Tabela 01 estão próximos daqueles apresentados por MARSHALL (1967) e divergem consideravelmente dos valores médios (comprimento e largura) do cercômero (209 x 206µm) apresentados por cisticercóides de *R. nana* em *Ctenocephalides* sp.

Quanto às gregarinas, até o momento já foram encontradas três espécies de gregarina em pulgas: *Actinocephalus parvus*, *Agrippina bona* e *Steinina rotundata*, todas pertencentes à família Actinocephalidae. Embora não tenha sido possível identificar a espécie de gregarina aqui encontrada, os dados morfométricos e a morfologia das formas evolutivas (trofozoíto, gametocistos e oocistos) apresentados na Tabela 02, assemelham-se aos de *S. rotundata*, descrita a partir de *Ceratophyllus farreni* e *C. gallinae* por ASHWORTH & RETTIE (1912). A gregarina aqui registrada parece ser a mesma encontrada em um estudo com *C. felis felis* e outras pulgas, na Flórida – EUA (BEARD *et al.*, 1990b). A única diferença morfométrica reside no fato de que os oocistos das gregarinas encontradas neste trabalho apresentam comprimento médio de 10µm, em contraposição a do estudo anterior, onde os oocistos apresentavam comprimento médio de 14µm. Ressalte-se que no estudo da Flórida não foram apresentados dados referentes à largura média destes oocistos. Pela primeira vez, gregarinas da família Actinocephalidae

são assinaladas em pulgas do Brasil, independentemente de serem ou não, uma nova entidade. Ainda que *C. felis felis* seja uma pulga cosmopolita, tal registro é também inédito na região Neotropical.

Em relação a *Nolleria pulicis*, sabe-se que esta espécie foi descrita a partir de *C. felis felis* (BEARD *et al.*, 1990a). Outra espécie do filo Microspora, que já foi encontrada em *C. felis felis*, é *Nosema pulicis* (STRAND, 1977). A diferenciação destas duas espécies é muito fácil, já que *Nosema pulicis* não apresenta em seu ciclo biológico, vesículas do tipo “polysporophorous” (SPRAGUE *et al.*, 1992). Da mesma forma, pela primeira vez um representante do filo Microspora é noticiado infectando pulgas no Brasil.

5.1.2- Identificação dos tripanosomatídeos isolados do intestino posterior de *C. felis felis*

A identificação genérica dos tripanosomatídeos isolados do intestino posterior de *C. felis felis* foi realizada através da aplicação do estudo morfológico e morfométrico; avaliação do crescimento em meio de cultivo e estudo de biologia molecular utilizando a – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Em *C. felis felis* já foram encontrados três gêneros de tripanosomatídeos: *Leptomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (WALLACE, 1966; COUTINHO, 2003). Esses três gêneros podem ser diferenciados a partir das formas evolutivas presentes em seus ciclos biológicos.

O gênero *Trypanosoma*, no hospedeiro invertebrado, apresenta a forma epimastigota. Os gêneros *Leptomonas* e *Leishmania* são caracterizados por apresentarem as

formas promastigotas e amastigotas, sendo que não podem ser diferenciados a partir dos dados morfométricos das formas promastigotas (WALLACE, 1966). Entretanto o gênero *Leptomonas* é considerado como monoxênico, e apresenta no hospedeiro invertebrado, além das formas promastigota e amastigota, formas císticas (WALLACE, 1966; MCGHEE & COSGROVE, 1980).

A análise morfológica e morfométrica das formas encontradas em cultivo (promastigotas com torção corporal, promastigotas sem torção corporal, amastigotas e cistos) demonstrou que, entre os tripanosomatídeos isolados, estavam presentes representantes do gênero *Leptomonas*. Isto porque neste gênero são encontradas as formas císticas e “amastigotas-like” livres no meio de cultivo. Formas de cistos são tipicamente encontradas em *Leptomonas* spp. presentes em sifonápteros. Alguns autores verificaram que estes também são encontrados nas fezes secas das pulgas (BEARD *et al.*, 1989; MOLYNEUX, 1981).

Além disso, a presença de formas promastigotas com torção corporal no meio de cultivo é uma característica dos tripanosomatídeos do gênero *Leptomonas* encontrados em sifonápteros (WENYON, 1926; WALLACE, 1966). Outro dado importante é que os dados morfométricos apresentados na TABELA 03 estão de acordo com os de *L. ctenocephali*, descrita a partir de *Ctenocephalides canis* e já encontrada em *C. felis felis* (promastigota sem torção corporal: comprimento da célula de 6 - 18 μm ; porção livre do flagelo – até 18 μm e presença de formas com torção corporal) (WENYON, 1926; WALLACE, 1966).

Apesar da certeza da presença de tripanosomatídeos do gênero *Leptomonas* nos isolados de *C. felis felis*, a ocorrência de dois picos (14.º e 16.º dias), na curva de crescimento da cepa estudada, poderia ser explicada de duas formas: ou este padrão de curva é decorrente do próprio crescimento da cepa ou da mistura de populações de

tripanosomatídeos. Neste caso, pelo fato das pulgas utilizadas neste estudo terem sido capturadas sobre cães (hospedeiro vertebrado de *Leishmania chagasi*), devido a não diferenciação das formas promastigotas sem torção corporal de *Leptomonas* e *Leishmania*, e por já se ter encontrado *L. chagasi* em *C. felis felis* (COUTINHO, 2003), havia a possibilidade de se ter além de *Leptomonas* sp., tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*.

Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ficou demonstrado que entre os dois isolados de tripanosomatídeos obtidos não estavam presentes espécies do gênero *Leishmania* (Figura 20).

Outro ponto a se destacar, é que o padrão de desenvolvimento e a faixa de temperatura na qual uma das cepas de *Leptomonas* isolada neste estudo se desenvolveu, estão de acordo com o apresentado por *Leptomonas pulexsimulantis*, descrita a partir de *Pulex simulans* (BEARD *et al.*, 1989); espécie de pulga encontrada na América do Norte e que pertence a mesma família de *C. felis felis*.

O pequeno número de isolados obtidos neste estudo decorreu da não-adaptação ao meio ou à contaminação fúngica. Esta dificuldade, ao se trabalhar com tripanosomatídeos de *C. felis felis* foi registrada por BEARD *et al.*, 1990b, onde após várias tentativas não foi possível isolar os tripanosomatídeos presentes nesta pulga. Os dois isolados de tripanosomatídeos eram provenientes de tubos digestivos de *C. felis felis* que não foram rompidos para a realização da técnica de isolamento. O não rompimento do tubo digestivo para a realização desta técnica pode ter facilitado na adaptação dos tripanosomatídeos ao meio de cultivo.

5.1.3- Determinação dos sítios de infecção dos endossimbiontes em *C. felis felis* e provável forma de transmissão.

A determinação do sítio de infecção é essencial para a compreensão do ciclo biológico de um parasito. Frequentemente o sítio de predileção apresenta uma correlação direta com a morfologia e o ciclo biológico dos parasitos (SPRAGUE *et al.*, 1992).

Os sítios de infecção apresentados na Tabela 04 estão de acordo com aqueles encontrados por outros autores: *D. caninum* – cavidade geral (MARSHALL, 1967; BEARD *et al.*, 1990b); gregarina (Actinocephalidae): trofozoítos, gamontes e gametocistos – intestino médio, oocistos – intestino médio e posterior (BEARD *et al.*, 1990b); *N. pulicis* – intestino médio (BEARD *et al.*, 1990a; BEARD *et al.*, 1990b); *Leptomonas* sp. – intestino posterior e túbulos de Malpighi (WENYON, 1926; BEARD *et al.*, 1990b).

Para as gregarinas, em menos de 1% das pulgas infectadas, as formas de trofozoítos, gametocistos ou gamontes foram observadas no intestino posterior (em oposição a 99,2% para o intestino médio). Também, foi observada no intestino posterior, a presença de vesículas do tipo “polysporophorous” em 6% das pulgas infectadas com *N. pulicis* (contra 94% no intestino médio). A presença das formas acima referidas tanto para gregarinas quanto para *N. pulicis* provavelmente não representa novos sítios de predileção para estes endossimbiontes. Estes achados devem estar relacionados com um possível deslocamento destes endossimbiontes do intestino médio para o posterior, durante a dissecação destas pulgas. Explicação semelhante foi apresentada por BEARD *et al.* (1990b), com relação ao encontro de gametocistos de gregarinas no intestino posterior.

É importante destacar o encontro de oocistos de gregarinas no intestino médio e posterior; de esporos de *N. pulicis* em 80% das pulgas no intestino posterior e de formas císticas de *Leptomonas* sp. no meio de cultivo. A presença de oocistos de gregarina e de esporos de *N. pulicis* já havia sido relatada por BEARD *et al.* (1990b). Estes mesmos autores também informaram o achado de cistos nas fezes de *C. felis felis* positivas para tripanosomatídeos.

O mecanismo de transmissão é o início da relação parasito-hospedeiro sendo dois os principais modos: transmissão oral (horizontal) e transovariana (vertical) (SPRAGUE *et al.*, 1992). Levando-se em conta a presença das formas acima citadas, no intestino posterior de *C. felis felis* e o fato já conhecido de que as larvas desta pulga utilizam como recurso alimentar, sangue seco semi-digerido proveniente das pulgas adultas (RUST & DRYDEN, 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000), é provável que o principal mecanismo de transmissão para gregarinas, microsporídios e tripanosomatídeos de *C. felis felis* seja por via oral (transmissão horizontal). Um importante aspecto que facilita este tipo de transmissão, é que os ovos e as fezes de *C. felis felis* possuem uma distribuição sobreposta, onde as larvas se desenvolvem nos locais em que o hospedeiro geralmente repousa e que concentram a maior quantidade de fezes secas das pulgas adultas (KERN *et al.*, 1992).

Este tipo de transmissão fica evidenciado pelo trabalho de BEARD *et al.* (1990b), onde conseguiram a infecção experimental de *C. felis felis* com gregarinas, ao alimentá-las, durante a fase larvária, com fezes secas de pulgas adultas positivas para este endossimbionte. Wenyon em 1913 conseguiu a transmissão de tripanosomatídeos para *C. felis felis* ao alimentá-las também, com fezes de pulgas adultas que continham estes protozoários (WENYON, 1926). Para *N. pulicis* ainda não foram realizados estudos que enfoquem o seu mecanismo de transmissão. Estudos desta natureza poderão ser delineados

de forma a testar a provável transmissão oral entre estes microsporídios. É importante destacar que apesar de não terem sido encontradas formas evolutivas destes microsporídios ou de gregarinas nos ovócitos, o mecanismo de transmissão transovariana (vertical) não deve ser descartado.

5.2- Índices e coeficientes de infecção por endossimbiontes em *C. felis felis*.

O estudo da relação parasito-hospedeiro é essencial para a compreensão da influência do parasito sobre a dinâmica populacional do hospedeiro. É atualmente aceito que os parasitos afetam o crescimento e a regulação populacional dos seus hospedeiros; distribuição espacial; sucesso reprodutivo individual e seleção sexual (AMO *et al.*, 2005). Desta forma, a prevalência e a intensidade de infecção correspondem ao passo inicial para se entender o impacto dos parasitos (endossimbiontes) sobre uma população natural.

5.2.1- Prevalência de endossimbiontes em *C. felis felis*.

Através da observação da Tabela 06, fica evidente a existência de uma boa adaptação das gregarinas (Actinocephalidae) em *C. felis felis*, já que estava presente em todas as infecções duplas e triplas e sem dúvida, em função de sua maior prevalência. No estudo realizado na Flórida – EUA (BEARD *et al.*, 1990b), as gregarinas da família Actinocephalidae também foram as mais prevalentes, seguidas por tripanosomatídeos, *N. pulicis* e *D. caninum*. Entretanto estes autores não informam sobre a presença de outros parasitos resultando em infecções duplas ou triplas. Outro dado importante foi que o número de infecções simples foi 10 vezes maior que o número de infecções duplas.

Existem poucos estudos que analisam a biologia e o grau de patogenicidade dos endossimbiontes em pulgas, destacando-se os de BEARD *et al.* (1989) com tripanosomatídeos e o de MARSHALL (1967) com *D. caninum*. Estudos posteriores poderão ser realizados para verificar o grau de patogenicidade destas gregarinas e de *N. pulicis* sobre *C. felis felis*. Várias das pulgas positivas para gregarinas continham no intestino médio mais de 20 gametocistos, aparentemente obstruindo o tubo digestivo destas pulgas. É preciso verificar se não há uma alteração no comportamento alimentar ou uma maior taxa de mortalidade para pulgas infectadas. Em outros insetos, as gregarinas podem afetar o seu desenvolvimento e provocar uma maior taxa de mortalidade. A infecção por estes protozoários pode muitas vezes levar a perda total de colônias de insetos mantidos em laboratório (CLOPTON & SMITH, 2002). Uma vez que as gregarinas são monoxênicas até que ponto infecções experimentais poderiam ser utilizadas visando o controle dessa espécie de pulga em ambientes altamente infestados?

Um resultado interessante foi a pequena quantidade de pulgas *C. felis felis* contendo cisticercóides de *D. caninum*, já que este sifonáptero é o hospedeiro invertebrado habitual deste cestódeo (MARSHALL, 1967; PUGH, 1987). Em Belo Horizonte, levantamentos helmintológicos em cães demonstraram prevalências para *D. caninum* acima de 80% (SILVA *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 1962). Anteriormente, LINARDI (2002) assinalou *D. caninum* e *Dipetalonema reconditum* em *C. felis felis* retiradas de 372 cães recolhidos pelo Serviço de Apreensão do Departamento de Controle de Zoonozes da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte entre 1985 e 1987. Chama a atenção o fato que após 18 anos, a prevalência de *D. caninum* em *C. felis felis* recolhidos de cães tenha diminuído sensivelmente, passando de 10,2% (LINARDI, 2002) para 0,9% (presente estudo).

Esta discrepância entre as taxas de infecção apresentadas pelas pulgas (hospedeiros intermediários) e pelos cães (hospedeiros definitivos) pode ser devido aos seguintes fatores: alta mortalidade das pulgas infectadas com cisticercóides de *D. caninum* (MARSHALL, 1967); à reação do hospedeiro contra os cisticercóides (PUGH, 1987); ou devido às condições físico-químicas inadequadas no ambiente que podem resultar na morte dos cisticercóides (PUGH & MOORHOUSE, 1985).

Alguns pesquisadores chamaram a atenção para os efeitos deletérios causados pelo desenvolvimento dos cisticercóides de *D. caninum* em *C. felis felis*. Em nosso estudo, todas as fêmeas de *C. felis felis* parasitadas por cisticercóides de *D. caninum*, apresentaram ovários degenerados. MARSHALL (1967) através de experimentos sob condições ambientais controladas, verificou uma significativa mortalidade de *C. felis felis* no estágio de pupa, fato que coincide com o crescimento do cestódeo. PUGH (1987) noticiou a reação do hospedeiro (*C. felis felis*) contra o parasito (*D. caninum*), concluindo que tal reação era caracterizada pela aderência de hemócitos das pulgas na superfície dos cisticercóides. Ele também observou que a taxa de infecção diminuía de 100% nas larvas para 15% nas pulgas adultas. Este decréscimo poderia ser devido à reação do hospedeiro, à morte natural dos parasitos ou às condições físico-químicas – temperatura, pH e umidade relativa - inadequadas no ambiente (PUGH & MOORHOUSE, 1985; PUGH, 1987).

Outro ponto importante que atualmente tem sido levantado é a possível manipulação do hospedeiro pelos parasitos. Em coleópteros (*Tenebrio molitor*) notou-se que aqueles mais intensamente infectados por *H. diminuta* ficavam mais expostos à predação por *Rattus* sp (WEBSTER *et al.*, 2000). Do mesmo modo, alguns estudos poderiam vir a ser realizados no sentido de investigar uma maior probabilidade de pulgas parasitadas por *D. caninum*,

tornarem-se presas mais fáceis ao “grooming” de seus hospedeiros, o que poderia acarretar diferentes taxas de mortalidade entre pulgas parasitadas e não parasitadas.

Com relação aos sexos, apenas para as gregarinas foi observada diferença significativa ($X^2= 3,97$, $p < 0.05$), em favor de pulgas fêmeas. As taxas de prevalência foram respectivamente, de 13,8% para fêmeas e 10% para os machos. No entanto, levando-se em consideração as infecções simples e associadas, as prevalências observadas para os quatro endossimbiontes ou parasitos (Tabela 5), sempre foram maiores em pulgas fêmeas do que nos machos, ainda que em valores não significativos.

No caso das gregarinas, as diferenças significativas de infecção por sexo do hospedeiro, poderiam ser explicadas pelo encontro diferencial de oocistos (formas infectantes) por fêmeas e machos (CLOPTON, 2004). Para as pulgas, esta diferença no encontro dos oocistos deveria estar relacionada com os hábitos alimentares diferenciados entre as larvas que se desenvolvem em fêmeas ou em machos.

Entretanto os dados encontrados na literatura demonstram que as larvas (independentemente de se desenvolverem em fêmeas ou em machos) necessitam de se alimentarem das fezes das pulgas adultas contendo sangue semi-digerido (De MARIA, 1981; LINARDI *et al.*, 1997; RUST & DRYDEN, 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000). Outro fator que poderia atuar a favor da maior taxa de infecção de pulgas fêmeas, poderia ser o maior tempo de desenvolvimento para as larvas que se desenvolvem em fêmeas. Entretanto sabe-se que em *C. felis felis*, como em quase todas as espécies de sifonápteros, as larvas que dão origem às fêmeas desenvolvem-se mais rápido do que as que originarão machos (LINARDI & NAGEM, 1972; RUST & DRYDEN, 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000). Então de uma forma contraditória, as larvas que se desenvolvem em machos podem ter mais chance de entrar em contato com fezes contendo

os oocistos de gregarinas do que as que se desenvolvem em fêmeas. Levando-se em conta que as taxas de infecção não foram tão diferentes (13,8% para fêmeas e 10% para machos) e que não foi encontrada diferença significativa relacionada com o sexo das pulgas nas infecções por *N. pulicis*, *Leptomonas* sp. e *D. caninum* (a infecção das pulgas para todos estes endossimbiontes também é por via oral e no estágio larval) esta diferença significativa para gregarinas, pode ser resultado do maior número de fêmeas dissecadas ou da maior proporção de fêmeas (3:1) encontradas na natureza para *C. felis felis* (LINARDI & NAGEM, 1972 e 1973). Ou seja, se as larvas que irão originar machos gastam mais tempo para tal, elas poderiam estar sujeitas a dois fatores antagônicos e simultaneamente complementares: 1) maior possibilidade de infecção; 2) menor possibilidade de longevidade, em função de maior risco às intempéries e conseqüências nefastas da infecção.

5.2.2- Associação entre endossimbiontes

De maneira geral os *habitats* são caracterizados pela coexistência de vários gêneros e até de outros táxons em um mesmo espaço, por exemplo, o microhabitat formado pelo corpo do hospedeiro (SERRA-FREIRE, 2002).

A associação real interespecífica entre os organismos encontrados em *C. felis felis* (Tabela 07), pode ser explicada, inicialmente, através do mesmo tipo de transmissão (oral: horizontal) para todos estes endossimbiontes. Outro ponto ainda não investigado é se pulgas positivas para um determinado endossimbionte infectar-se-iam mais facilmente com outros microorganismos ou se agregariam maiores chances de transmitirem determinados

patógenos. COMISKEY *et al.* (1999) demonstraram que espécimes do mosquito *Aedes aegypti* quando parasitados por gregarinas *Ascogregarina taiwanensis* apresentavam maior potencial na transmissão do filarídeo *Dirofilaria immitis* entre cães. MOURY *et al.* (2003) evidenciaram o papel dos oocistos da gregarina *Ascogregarina culicis* na manutenção do vírus Chikungunya (arbovirose) na Índia.

5.2.3- Índices de abundância e intensidade média de parasitismo

Para as gregarinas (Família Actinocephalidae), os valores dos índices de abundância e de intensidade média de parasitismo foram, respectivamente de 1 e 5,6. A interpretação do índice de abundância significa que se pode esperar um espécime de gregarina (Actinocephalidae) por pulga *C. felis felis* capturada sobre cães em Belo Horizonte. Já a intensidade média revela que entre as pulgas *C. felis felis* capturadas em Belo Horizonte e que contêm gregarinas (Actinocephalidae), o número esperado destes protozoários é de aproximadamente seis por pulga.

Durante a revisão da literatura observou-se um pequeno número de trabalhos sobre a prevalência e a biologia dos endossimbiontes de pulgas. Relativamente à *C. felis felis* apenas um estudo foi realizado analisando tais aspectos (BEARD *et al.*, 1990b). Mesmo assim, os autores não apresentaram dados sobre os índices de abundância e intensidade média do parasitismo. Desta forma, os presentes dados são inéditos podendo ser utilizados para futuras comparações em estudos que abordem os aspectos biológicos destes endossimbiontes.

5.3- Relação entre os índices de infecção de *C. felis felis* e sazonalidade.

As diferenças observadas nos níveis de infecção estacional das pulgas podem ser explicadas através da atuação de fatores ambientais (temperatura, chuvas, umidade relativa do ar e ventos) sobre as fases evolutivas dos endossimbiontes que permanecem fora do hospedeiro (*C. felis felis*) e sobre o ciclo biológico de *C. felis felis*. As adaptações das fases infectantes (oocistos, esporos e cistos) dos parasitos para sobreviverem às condições ambientais adversas, bem com um conhecimento adequado da biologia de seus hospedeiros, seriam essenciais no sentido de se identificarem possíveis rotas de transmissão, diferenças nas taxas de infecção entre os sexos e diferenças sazonais de infecção (MOLYNEUX, 1981 ; MADDOX, 2002; CLOPTON, 2004).

Para *N. pulicis*, a diferença altamente significativa ($p < 0.01$) entre as duas estações em prol da estação chuvosa-quente (Tabela 8), pode ser explicada pela atuação de fatores ambientais sobre os esporos (formas infectantes).

Com relação à persistência dos microsporídios pela transmissão horizontal, sabe-se que ela está baseada na sua adaptação aos seus hospedeiros e às condições ambientais (MADDOX, 2002). Os esporos são as principais formas de resistência, sofrendo diretamente a influência de fatores ambientais, tais como radiação solar, temperatura, humidade, pH, ventos, entre outros. As diferenças sazonais observadas nas infecções por microsporídios, poderiam assim estar relacionadas com a atuação desses fatores. Sabe-se que os esporos dos microsporídios sofrem ressecamento à medida em que há aumento da

radiação e temperatura, e que durante os períodos mais secos eles podem permanecer viáveis no ambiente, até que se estabeleçam novamente as condições propícias para a infecção (MADDOX, 2002).

Conforme exposto anteriormente, *N. pulicis* possui o mecanismo de transmissão oral (horizontal). Este predomínio de pulgas com *N. pulicis* durante a estação chuvosa- quente estaria de acordo com o exposto. Os esporos presentes nos “pelets” fecais, provavelmente permaneceriam viáveis na estação seca-fria; com o aumento da umidade relativa do ar, à medida, em que se aproxima a estação chuvosa-quente, eles torna-se-iam infectantes para as larvas das pulgas, acarretando um significativo aumento nas taxas de infecção durante esta estação. Outros autores trabalhando com *Simulium pertinax* encontraram taxas de infecção por microsporídios (*Polydispyrenia* sp; *Microsporidium* sp) superiores nas épocas do verão (ARAÚJO-COUTINHO *et al.*, 2004). Esporos do microsporídio *Nosema whitei* podem sobreviver por um ano, em condições de seca (MILNER, 1972). É importante salientar que este padrão sazonal de infecção para *N. pulicis* está sendo noticiado pela primeira vez.

A Tabela 08 e Figura 25 mostram uma maior taxa de infecção por *Leptomonas* sp. no mês de dezembro de 2004 (21,5%) – estação-chuvosa. Uma diferença significativa ($X^2=4,53$, $p < 0,05$) foi observada (Tabela 08) entre as taxas de infecção nas duas estações (chuvosa-quente e seca-fria). Diferença esta que poderia ser explicada graças à atuação de fatores ambientais sobre as formas de resistência (cistos) presentes no ciclo biológico destes tripanosomatídeos.

Formas císticas são comuns entre os tripanosomatídeos monoxenos (*Leptomonas* sp, *Herpetomonas* sp, *Blastocrithidia* sp e *Crithidia* sp). A presença desta forma de resistência já havia sido verificada em tripanosomatídeos (*Leptomonas ctenocephali*) isolados de *C.*

felis felis (WENYON, 1926; MOLYNEUX & CROFT, 1980) e em *Leptomonas pulexsimulantis*, isolada de *Pulex simulans* (BEARD *et al.*, 1989). Estas formas são extremamente importantes na transmissão oral (horizontal) destes tripanosomatídeos. A infecção experimental de *C. felis felis* por *Leptomonas ctenocephali* foi conseguida pela alimentação das larvas com fezes secas provenientes de pulgas adultas infectadas (WENYON, 1926). Este tipo de infecção também ocorre na pulga *P. simulans*, onde BEARD *et al.*, (1989) infectaram as respectivas larvas ao alimentá-las com fezes de pulgas adultas infectadas ou com cistos provenientes de meio de cultura contendo *L. pulexsimulantis*. A maior taxa de infecção de pulgas durante a estação chuvosa-quente pode ser devida à atuação de fatores ambientais (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, entre outros), sobre os cistos.

O pequeno número de pulgas infectadas por *D. caninum* não permite aqui qualquer conclusão em relação a sazonalidade. Entretanto, o valor encontrado pode ter sido afetado pelos fatores discutidos no tópico sobre a prevalência dos cisticercóides em pulgas. Como discutido anteriormente, as pulgas parasitadas por *D. caninum*, além de apresentarem uma maior taxa de mortalidade (MARSHALL, 1967), poderiam talvez, sofrer uma maior predação por parte de seus hospedeiros (cães).

Com relação às gregarinas (Actinocephalidae), ainda que não tenha sido constatada uma tendência sazonal de infecção (Tabelas 7, 8 e Figura 26), a relação entre as diversas formas evolutivas encontradas em *C. felis felis* com as estações climáticas revelou uma diferença altamente significativa quanto ao encontro de gamontes ($X^2= 15,53$, $p< 0,01$) e gametocistos ($X^2= 6,9$; $p< 0,01$). Esta variação no encontro de trofozoítos, gametocistos e gamontes pode ser observada nas Tabelas 9-11. Pela observação da Tabela 12 fica evidente a superioridade de pulgas com gamontes na estação seca-fria (22,6%) contra 3,8% na

estação chuvosa-quente. Paradoxalmente, para os gametocistos, foi observada uma maior prevalência de pulgas infectadas durante a estação chuvosa-quente (86,8%) do que durante a estação seca-fria (71,4%).

Diferenças sazonais no encontro de gamontes foram verificadas para a gregarina *Ascogregarina taiwanensis* em larvas de *Aedes albopictus* (GARCIA *et al.*, 1994). Assim como para as gregarinas de *C. felis felis*, um maior número de mosquitos com gamontes foi observado durante a época mais seca e fria. Os autores deste trabalho argumentaram que esta diferença deve-se a uma menor taxa de infecção, proporcionada pela redução de oocistos infectantes; fato provocado pelas altas temperaturas do verão. Outros autores também verificaram uma redução da infectividade dos oocistos de *Lankesteria culicis* (encontrada em *Aedes aegypti*), quando submetidos a temperaturas superiores a 60°C (McGRAY *et al.*, 1970).

Somando-se ao argumento da redução das taxas de infecção devido à redução da infectividade dos oocistos durante o verão, o maior número de gamontes em *C. felis felis* na estação seca-fria, poderia ser explicado levando-se em conta os ciclos da pulga e da gregarina.

Sabe-se que a longevidade de *C. felis felis* é afetada pelas condições de temperatura e umidade. A diminuição da temperatura leva a um prolongamento de seu ciclo; assim, durante o inverno, essas pulgas podem sobreviver no estágio de pupa por um tempo maior (SILVERMAN *et al.*, 1981; SILVERMAN & RUST, 1985; RUST & DRYDEN, 1997). Este prolongamento do ciclo durante o inverno coincide com o maior número de pulgas com gamontes de gregarina. Desta forma, a diferença observada em nosso estudo parece indicar uma relação entre a taxa de desenvolvimento das gregarinas e o desenvolvimento de seus hospedeiros. Pelos valores apresentados na Tabela 12, a passagem da forma gamonte

para gametocisto, parece ser mais rápida na estação chuvosa-quente (foi verificado uma maior quantidade de pulgas com gametocistos nesta estação) o que está de acordo com o ciclo mais rápido de *C. felis felis* nesta estação. Aparentemente, haveria um sincronismo no desenvolvimento de gregarinas e *C. felis felis*.

5.4- Relação entre os índices de infecção de *C. felis felis* por cisticercóides de *D. caninum* e o sexo e a idade aproximada dos cães.

A pequena quantidade de cisticercóides verificados nas pulgas, através da atuação dos fatores discutidos nos tópicos anteriores, pode ter influenciado os valores encontrados no teste do qui-quadrado. Alguns pesquisadores verificaram uma tendência sazonal na liberação de proglótides de *D. caninum* e acreditam que esta tendência esteja relacionada com a sazonalidade da pulga *C. felis felis* (RAND *et al.*, 2003).

6. CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

- 1- *Ctenocephalides felis felis* atua como hospedeira para diferentes espécies de endossimbiontes.
- 2- Os tripanosomatídeos do gênero *Leptomonas* sp., isolados de *C. felis felis*, são polimórficos nos meios de cultivo.
- 3- Promastigotas com e sem torção corporal podem ser separados por outras características morfológicas intracelulares.
- 4- As gregarinas são os endossimbiontes mais prevalentes entre cães vadios de Belo Horizonte e sua infecção manifesta-se de forma diferenciada por sexo de pulgas.
- 5- As infecções por microsporídios (*Nolleria pulicis*) e tripanosomatídeos (*Leptomonas* sp.) são subordinadas às estações climáticas.
- 6- A abundância e a intensidade média de infecção por gregarinas são, pela primeira vez, noticiadas para pulgas.
- 7- As ocorrências de *N. pulicis*, gregarinas actinocefalídeas e *Leptomonas* sp. em *C. felis felis*, bem como as suas respectivas prevalências e distribuição por sexo das

pulgas e sazonalidade são inéditas para: o Brasil, a América do sul, a região Neotropical.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIELLO, S.E. Desenvolvimento dentário. In: _____. (Ed.) *Manual merck de veterinária*. São Paulo: Rocca, 2001. 8. ed. p. 109-111.
- Anuário Estatístico de Belo Horizonte. In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2003.
- AMO, L.; LOPEZ, P. & MARTIN, J. Prevalence and intensity of haemogregarine blood parasites and their mite vectors in the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *Parasitol. Res.*, v. 96, n. 6, p.378-381, 2005.
- ARAÚJO-COUTINHO, C.J.; NASCIMENTO, E.S.; FIGUEIRO, R. & BECNEL, J.J. Seasonality and prevalence rates of microsporidia in *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) larvae in the region of Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 85, n. 3, p. 188-191, 2004.
- ASHWORTH, J.H. & RETTIE, T. On a gregarine: *Steinina rotundata*, nov. sp., present in the mid-gut of bird-fleas of the genus *Ceratophylus*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, v. 86, p.31-38, 1912.
- BEARD, C.B., BUTLER, J.F. & ORSHAR, E.C. Growth characterization and host parasite relationship of *Leptomonas pulexsimulantis* n. sp., tripanosomatid flagellate of the flea *Pulex simulans*. *J. Parasitol.*, v.75, p. 658-668, 1989.
- BEARD, C.B., BUTLER, J.F. & BECNEL, J.J. *Nolleria pulicis* n. gen., n. sp. (Microsporida: Chytridiopsidae), a microsporidian parasite of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Protozool.*, v.37, n. 2, p. 90-99, 1990a.
- BEARD, C.B., BUTLER, J.F. & HALL, D. W. Prevalence and biology of endosymbionts of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from dogs and cats in Alachua County, Florida. *J. Med. Entomol.*, v. 27, n. 6, p. 1050-1061, 1990b.
- BEAUCOURNU, J.C. Notes sur les siphonaptères parasites de carnivores en France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.48, n. 3, p. 497-516, 1973

- BOTELHO, J. R. *Ectoparasitos de alguns roedores de Belo Horizonte, MG*. Estudos fenéticos, cladísticos e de interação parasito/hospedeiro. 1990. 143f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1990.
- BOTELHO, J.R. & LINARDI, P.M. Endoparasites of *Polygenis tripus* (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) of wild rodents from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 87, n. 3, p. 453-455, 1992.
- BRASIL, D.P., CARVALHO, F.G., ALMEIDA, C.R. & ALMEIDA, A. M. Natural infection by *Yersinia pestis*, in fleas from plague foci in the northeast of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 22, n. 4, p. 177-181, 1989.
- CARVALHO, A. L. M. *Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em Zelus leucogrammus (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae)*. 1973. 82f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1973.
- CASTILLO, J.M. Pathogens of Siphonaptera (fleas). In: D. W. Roberts & J. M. Castillo (Eds.) *Bibliography on pathogens of medically important arthropods*. Supplement 2 vol. 58, Bull. W. H. O. Geneva, Switzerland, 1980. p. 141-149.
- CLOPTON, R. E. Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Léger, 1900. In: LEE, J.J.; LEEDALE, G.; PATTERSON, D. & BRADBURY, P.C. (Eds.). *Illustrated Guide to the Protozoa*. 2. ed. Society of Protozoologists, Lawrence Kansas, 2000. p. 205-288.
- CLOPTON, R. E. *Calyxocephalus karyopera* g. nov., sp. nov. (Eugregarinorida: Actinocephalidae: Actinocephalinae) from the ebony jewelwing damselfly *Calopteryx maculata* (Zygoptera: Calopterygidae) in southeast Nebraska: implications for mechanical prey-vector stabilization of exogenous gregarine development. *Comp. Parasitol.* v. 71, p. 141-153, 2004.
- CLOPTON, R.E. & SMITH, A. Efficacy of oral sulfadimethoxine against two gregarine parasites, *Protomagalhaensia granulosa* and *Gregarina cubensis* (Apicomplexa: Eugregarinida) infecting the death's head cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Parasitol.*, v.88, p.786-789, 2002.

- COMISKEY, N.M., LOWRIE, R.C. & WESSON, D.M. Effect of nutrient levels and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) infections on the vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae). *J. Med. Entomol.*, v. 36, n.1, p. 55-61, 1999.
- CORRÊA, O. *Contribuição à determinação dos índices helmintológico e entomológico de Canis familiaris Linnaeus na cidade de Porto Alegre*. 1947. 86f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Escola de Agronomia e Veterinária, Porto Alegre, 1947.
- COSTA, H.M.A., BATISTA, Jr. J.A. & FREITAS, M.G. Endo e ectoparasitas de *Canis familiaris* em Belo Horizonte. I- Prevalência e intensidade de infestação. *Arq. Esc. Sup. Vet. UREMF*, v.16, p.103-112, 1962.
- COUTINHO, M. T. Z. *Investigação da capacidade vetorial de sifonápteros e ixodídeos na leishmaniose visceral canina*. 2003. 115f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- DAOUST, R.A. XV Pathogens of Siphonaptera (fleas). WHO/VBC/83. v.1, p. 249-253, 1983.
- De MARIA, M. Desenvolvimento pós-embrionário de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae), submetido a vários meios nutritivos, para propósitos experimentais. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte – MG. Dissertação de Mestrado. 78p. 1981.
- DOBBIN JR., J.E., VALENÇA JR., J.V. & CRUZ, A.E. Algumas informações sobre pulicídeos de chão de habitações e de animais silvestres do nordeste brasileiro. *Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.* v.21, n.4, p. 733-758, 1969.
- FERNANDES, C.G.W., LINARDI, P.M., FACCINI, J.L.H. & DE MOURA, S.T. Pulicídeos de cães e gatos da cidade do Rio de Janeiro (RJ, Brasil) e municípios vizinhos. *Rev. Univ. Rural, Ser. Cienc. Vida.*, v.18, n. 1, p.115-118, 1996.
- FIGUEIREDO, E. M. *Caracterização biológica e molecular de Leishmania sp. isolada de casos humanos de leishmaniose tegumentar da região metropolitana de Belo Horizonte, MG*. 1997. 179f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

- GARCIA, J.J., FUKUDA, T. & BECNEL, J.J. Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.*, v.10, n. 3, p. 413-418, 1994
- JELLISON, W. L. Fleas and disease. *Annu. Rev. Entomol.*, v.4, p. 389-414, 1959.
- JENKINS, D. W. Pathogens, parasites, and predators of medically important arthropods. *Bull. W.H.O.*, p.1-150, 1964.
- KERN, W.H., KOEHLER, P.G. & PATTERSON, R.S. Diel patterns of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) egg and fecal deposition. *J Med Entomol.* v.29, n. 2, p.203-206, 1992.
- LABARTHE, N.; SERRAO, M.L.; FERREIRA, A.M.; ALMEIDA, N.K. & GUERRERO, J. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro. Brazil. *Vet. Parasitol.*,v.123, n.1-2, p. 133-139, 2004.
- LEVIN, J. *Estatística Aplicada a Ciências Humanas*. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1978. 310p.
- LINARDI, P.M. Endoparasitos de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) em Belo Horizonte, MG. *Biológico.*, v.64, n.1, p.65. 2002.
- LINARDI, P.M.; CERQUEIRA, E.J.L. & WILLIAMS, P. *Polygenis tripus* (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae) naturally infected by Allantonematidae (Nematoda: Tylenchida). *J. Med. Entomol.* v.18, n.1,p. 41-43, 1981.
- LINARDI, P.M.; De MARIA, M. & BOTELHO, J.R. Effects of larval nutrition on the postembryonic development of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.*,v. 34(4), p. 494-497, 1997.
- LINARDI, P.M. & GUIMARÃES, L.R. *Sifonápteros do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia, USP/FAPESP. 2000. 291p.
- LINARDI, P.M. & MIURA, R.H.M. Pulicídeos de habitações de Belo Horizonte, MG.. *Ciência e Cultura.*, v.28, n.7 (Supl), p. 428, 1976.

- LINARDI, P.M. & NAGEM, R.L. Observações sobre o ciclo evolutivo de *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1935) (Siphonaptera: Pulicidae) e sua sobrevivência fora do hospedeiro. *Bol. Mus. Hist. Nat. UFMG Zool.*, v.13, p. 1-23, 1972.
- LINARDI, P.M. & NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev. Bras. Biol.*, v.33, n. 4, p. 494-497, 1973.
- LINDSEY, J.R. Diagnosis of filarial infections in dogs. I. Microfilarial surveys. *J. Parasitol.*, v.47, p. 695-702, 1962.
- MADDOX, J.V. Environmental persistence of Microsporidia. In: BAUR, M.E. & FUXA, JR. (Eds). *Factors affecting the survival of entomopathogens*. Southern Cooperative Series Bulletin 400. 2002.
- MARSHALL, A.G. The cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) as an intermediate host for cestodes. *Parasitol.*, v.57, p.419-430, 1967.
- McGHEE, R.B. & COSGROVE, W.B. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.*, v.44, p.140-173, 1980.
- McCRAE, E.M., FAY, R.W. & SCHOOF, H.F. The bionomics of *Lankesteria culicis* and *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.16, p.42-53, 1970.
- MELO, M.N.; DE AZEVEDO, H.P.; ROITMAN, I. & MAYRINK, W. A new defined medium for cultivating *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop.* v.42, n.2, p.137-141, 1985.
- MILNER, R.J. *Nosema whithei*, a microsporidian pathogen of some species of *Tribolium*, III. Effect on *T. castaneum*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.19, p.248-255, 1972.
- MOLYNEUX, D.H. 1969. Intracellular stages of *Trypanosoma lewisi* in fleas and attempts to find such stages in other trypanosome species. *Parasitol.*, v.59, p.737-744, 1969.
- MOLYNEUX, D.H. & CROFT, S.L. Studies on the ultrastructure of candidate "cysts" in *Leptomonas* species of Siphonaptera. *Zeitsch. Parasitenk.*, v.63, p. 233-239, 1980.

- MOLYNEUX, D.H., CROFT, S. L. & LAVIN, D. R. Studies on the host-parasite relationships of *Leptomonas* species (Protozoa: Kinetoplastida) of Siphonaptera. *J. Nat. Hist.*, v.15, p.395-406, 1981.
- MOMEN, H. Some current problems in the systematics of trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.640-642, 2001.
- MOURY, D.T., SINGH, D.K., YADAV, P., GOKHALE, M.D., BARDE, P.V., NARAVAN, N.B., THAKARE, J.P., MISHRA, A.C. & SHOUCHE, Y.S. Role of gregarine parasite *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in the maintenance of *Chikungunya* virus in vector mosquito. *J Eukaryot Microbiol.* v.50, n.5, p.379-382, 2003.
- NELSON, G.S. *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) from dog with a note on its development in the flea, *Ctenocephalides felis* and louse, *Heterodoxus spiniger*. *J. Helminth.*, v.36, n. 3, p.297-308, 1962
- NEWTON, W.L. & WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filarid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *J. Parasitol.*, v.42, p.246-258, 1956.
- ODUM, E.P. *Fundamental of ecology*. Phyladelphia: W.B. Saunders, 1967, 546p.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C., AMARANTE, A.F., FERRARI, T.B. & NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.103, n.1-2, p. 19-27, 2002.
- PAUL, J. *Cell and tissue culture*. 4.ed. Edinburg: Livingstone, 1972. p. 179.
- PESSÔA, S. B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia médica*. 11.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 820-828.
- PODLIPAEV, S.A. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.95, p. 517-522, 2000.

- PUGH, R.E. Effects on the development of *Dipylidium caninum* and on the host reaction to this parasite in the adult flea (*Ctenocephalides felis felis*). *Parasitol. Res.*, v.73, p. 171-177, 1987.
- PUGH, R.E. & MOORHOUSE, D. E. Factors affecting the development of *Dipylidium caninum* in *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). *Zeits. Parasitenk.*, v.71, p. 765-775, 1985.
- RAND, C., FOURIE, L.J. & KOK, D.J. Survival strategies of *Dipylidium caninum*. *Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.*, v.74, n. 3, p.88, 2003.
- REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.*, v.122, n. 4, p. 273-286, 2004.
- RUST, M.K. & DRYDEN, M.W. The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annu Rev Entomol.*;v.42, p.451-473, 1997
- SALEM, S.A.; SIDKY, H.A. & ABDEL-REHIM, L. *Xenopsylla cheopis* Rothschild, 1903 and *Ctenocephalides felis* Bouché, 1835 as intermediate hosts for *Hymenolepis diminuta* Rudolphi, 1819 (Hymenolepidae-Cestoda). *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, v.10, n. 1, p. 217-222, 1980.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANTOS, F.R., PENA, S.D. & EPPLIN, J.T. Genetic and population studies of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetic.*, v.90, p.655-656, 1993.
- SCHILLER, E.L. Experimental studies on morphological variation in the cestode genus *Hymenolepis*. 1. Morphology and development of the cysticercoid of *H. nana* in *Tribolium confusum*. *Exp. Parasitol.*, v. 8, p. 91-118, 1959.
- SERRA-FREIRE, N.M. *Planejamento e análise de pesquisas parasitológicas*. Rio de Janeiro: UFF, Niterói, 2002. 195p.

- SHAW, S. E., KENNY, M.J.; TASKER, S. & BIRTLES, R.J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veter. Microbiol.*, v.102, n. 3-4, p. 183-188, 2004.
- SILVA, A.C., LIMA, J.D., CERQUEIRA, M.M.O.P. & DE OLIVEIRA, P.R. Ocorrência de helmintos gastrintestinais e avaliação de métodos de diagnóstico, em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Pat. Trop.*, v.23, n.1, p.61-68, 1994.
- SILVERMAN, J. & RUST, M.K. Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, v.78, p. 763-768, 1985.
- SILVERMAN, J., RUST, M.K. & REIERSON, D.A. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.*, v.18, n. 1, p.78-83, 1981.
- SMYTH, A.J., GHOSH, A., HASSAN, Md. Q., BASU, D., BRUIJN, M.H.L., ADHYA, S., MALLIK, K.K., BAKER, D.C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of Kala-azar patients. *Parasitol.*, v.105, p.183-192, 1992.
- SPRAGUE, V., BECNEL, J.J. & HAZARD, E.I. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.18, p. 1-285, 1992
- STRAND, M.A. XV Pathogens of Siphonaptera (fleas). In: ROBERTS, D.W. & STRAND, M.A. (Eds). *Pathogens of medically important arthropods*. W.H.O. Genève, 1977. p. 279-87.
- STUEBEN, E.G. Larval development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in fleas. *J. Parasitol.*, v.40, p.580-589, 1954.
- VIEGAS, D.M. *Variação mensal da população de Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera, Pulicidae) em cães de um bairro periférico de Belo Horizonte, M.G.* 1996. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.
- WALLACE, F. G. 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Parasitol. Rev.*, v.18, p.124-193, 1966.

WALLACE, F.G., CAMARGO, E.P., McGHEE, R.B. & ROITMAN, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J. Protozool.*, v.30, p. 308-318, 1983.

WEBSTER, J.P., GOWTAGE-SEQUEIRA, S., BERDOY, M. & HURD, H. Predation of beetles (*Tenebrio molitor*) infected with tapeworms (*Hymenolepis diminuta*): a note of caution for the manipulation hypothesis. *Parasitol.*, v.120, n. 3, p.313-8. 2000

WENYON, C.M. *Protozoology*. A manual for medical men, veterinarians and zoologists, vol. 2. London: Balliere, Tindall, and Cox, 1926. 1563p.