

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela picada.**

**Por**

**Carolina Cunha Monteiro**

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro/2012**  
**Ministério da Saúde**

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada.**

**Por**

**Carolina Cunha Monteiro**

**Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde na área de concentração Biologia  
Celular e Molecular.**

**Orientação: Nágila F. C. Secundino.**

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro/2012**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M772p	Monteiro, Carolina Cunha.
2012	<p>O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do <i>Lutzomyia longipalpis</i> para a <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada. / Carolina Cunha Monteiro. – Belo Horizonte, 2012.</p> <p>XIV, 71 f: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f. 62 - 71 Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.</p> <p>1. Leishmaniose                      Visceral/transmissão                      2. <i>Leishmania</i>/parasitologia    3. <i>Lutzomyia</i>/parasitologia    I. Título. II. Secundino, Nágila Francinete Costa (Orientação).</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.936 4</p>

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada.**

**Por**

**Carolina Cunha Monteiro**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (Presidente)**

**Prof. Dr. Edelberto Santos Dias**

**Prof. Dr. Francisco José Alves Lemos**

**Suplente: Breno de Melo Silva**

**Dissertação ou tese defendida e aprovada em: 27/02/2012**

“Education is what remains  
after one has forgotten  
everything  
learned in school”  
Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” Fernando Pessoa.

Agradeço,

À Nágila pela orientação, pelo respeito, pela paciência, pelas viagens acadêmicas com pitadas de aventura e por esta sempre perto quando precisei;

À minha mãe por estar sempre presente sem tirar o meu espaço e por doar sempre, sem esperar qualquer retorno. Uma pessoa incomparável;

Ao meu pai pelas oportunidades, pela força e ensinamentos. Já foi meu herói, meu ídolo, meu exemplo, hoje é meu orgulho e sempre me faz querer ser uma pessoa melhor;

Ao Felipe, por me mostrar um mundo muito maior que o acadêmico, com ele vivo momentos inesquecíveis.

À Vanessa, sem ela essa jornada seria impossível, a amizade e os conselhos fizeram os meus dias mais amenos. Um exemplo de profissional e de pessoa;

À Alerrandra pela amizade, conselhos e alegrias do dia a dia. Uma inspiração na minha carreira científica e na minha vida pessoal;

Ao Paulo pela oportunidade e por não ter desistido de mim;

À Léa por ser a ponte que me levou a esse caminho;

À tia Consolação e tia Rita, por terem orgulho de mim;

À minha avó e à tia Vilma, pelos momentos de conforto, com comidinhas gostosas ou palavras sábias e carinhosas;

À toda minha família pela união e presença fundamental na minha vida;

À família do Felipe, com todos os seus agregados por fazerem com que me sinta em casa;

À peste do meu irmão Davi pelos golpes de realidade fundamentais à vida e à Sofia pelo carinho de irmã;

À Lulu, ao Lucas e à Rita Cândido, pela troca de experiências nesse caminho de *stricto sensu*;

À minhas queridas amigas, Babi, Bia, Lorena e Bela, por me adorarem assim, desse jeito que eu sou, eu tenho um pouquinho de cada uma em mim;

À todos os meus amigos por me proporcionarem momentos de diversão e reflexão sempre que nos encontramos;

À Analiz por me ensinar, com entusiasmo, a base desse trabalho;

Ao Franzé, por me receber de braços abertos em seu laboratório;

À Kamillinha pela recepção calorosa, me fazendo ter uma ideia agradável da cidade de Campos;

Ao Breno Mello pelas orientações e direcionamentos em biologia molecular e microbiologia;

À Sociedade do Anel, adoro o pudim de vocês. Exemplos de pessoas dedicadas, inteligentes, cativantes e divertidas;

À Ana Clara, Bruna, Bárbara, Isabela por toda a colaboração e pelos momentos agradáveis na convivência diária;

À Carolzinha, Heleninha, Robertinha, pelos protocolos, xerox, e-mails e ajuda que me salvaram do princípio ao fim desse trabalho;

Aos meus grandes amigos que cursaram esse caminho comigo, Quel, Fê e Antônio, e compartilharam ideias e pensamentos que me ajudaram tanto, e claro, pelos momentos de diversão;

Aos outros amigos da pós pelos sorrisos nos corredores, pelos desabafos e pelos momentos de descontração;

À toda a turma da pós graduação 2010 e agregados a nós;

Ao Bruno, Ana Paula, Marcele, Rafa, Iza, Paula e Junara por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento do trabalho e pelos momentos inesquecíveis;

À Juliana, Luiz, Marcílio, Neide, Bárbara, Pollyana, Grace, Cláudia, Ganbogi, Maíra, Jequeline, Luciana, Maria Angélica, Thais, Ana Carolina, Luiza, Nadja, e Ana Vita por me fazerem rir e compartilharem comigo suas vidas, além de toda a ajuda;

À Elisangela da plataforma de sequenciamento e à colaboração do pessoal do Cebio;

Ao pessoal do biotério;

À toda a equipe do CPqRR, que permite o desenvolvimento do trabalho com qualidade;

Às pessoas que trabalham pelo programa de pós-graduação do CPqRR, incluindo a biblioteca e outros serviços;

Ao órgão de fomento, FAPEMIG, CNPq, CAPES e FIOCRUZ.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. OS FLEBOTOMÍNEOS.....	17
1.2. PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> .....	19
1.3. O CICLO DO PARASITO NO VETOR.....	22
1.4. A TRANSMISSÃO DO PARASITO PELO VETOR.....	23
1.5. A MICROBIOTA E SEU POSSÍVEL PAPEL NA INTERAÇÃO.....	25
1.6. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E SUA POSSÍVEL RESPOSTA A PATÓGENOS.....	27
1.7. MÉTODOS DE CONTROLE DO VETOR.....	28
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
2.2.1. Aspectos relacionados à microbiota de <i>L. longipalpis</i> .....	29
2.2.2. Aspectos relacionados com a transmissão vetorial pela picada.....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. COLETA E ACONDICIONAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	30
Colônia <i>L. longipalpis</i> :.....	30
3.2. MANUTENÇÃO DOS PARASITOS.....	30
3.3. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE <i>L. LONGIPALPIS</i> .....	31
Insetos.....	31
Dissecção e isolamento.....	31
3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	32
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS POR SEQUÊNCIAMENTO DO GENE 16S.....	32
Amplificação.....	32
Gel.....	34
Purificação.....	34
Sequenciamento.....	35
3.6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COM <i>L. (L.) INFANTUM</i> CHAGASI.....	35
Preparo do Sangue.....	35
A cultura.....	35
Sangue e parasitos.....	36
Insetos.....	36
Grupos experimentais para tratamento com antibiotico.....	36



<i>Manutenção dos flebotomíneos infectados para os experimentos de transmissão</i> .....	36
3.7. TRANSMISSÃO DE <i>L. (L.) INFANTUM CHAGASI</i> PELA DA PICADA DO INSETO INFECTADO.....	37
<i>Transmissão</i> .....	37
<i>Extração do DNA genômico</i> .....	37
<i>PCR em tempo real</i> .....	38
3.8. ENSAIO LÍTICO UTILIZANDO <i>L. (L.) INFANTUM CHAGASI</i> E BACTÉRIAS IDENTIFICADAS NO INTESTINO DE <i>L. LONGIPALPIS</i> .....	39
<i>Quantificação de bactérias</i> .....	39
<i>Ensaio lítico</i> .....	39
3.9. ANÁLISE DOS AMP'S EM FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE <i>L. LONGIPALPIS</i> .....	42
<i>Resumo da análise morfológica nos diferentes grupos experimentais</i> .....	46
<i>Resumo da coloração de Gram nos diferentes grupos experimentais</i> .....	46
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....	46
<i>Sequenciamento</i> .....	47
4.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS.....	48
4.3.1. <i>Carbenicilina</i> .....	48
4.3.2. <i>Gentamicina</i> .....	49
<i>O efeito do tratamento na digestão sanguínea</i> .....	50
4.4. ENSAIO LÍTICO UTILIZANDO <i>L. (L.) INFANTUM CHAGASI</i> E BACTÉRIAS IDENTIFICADAS NO INTESTINO DE <i>L. LONGIPALPIS</i> .....	50
4.4.1. <i>Providencia sp. (grupo Gruta da Lapinha)</i> .....	51
4.4.2. <i>Acinobacter soli (Grupo Jacobina Fêmea)</i> .....	52
4.5. ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) EM FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL.....	52
4.6. TRANSMISSÃO DE <i>L. (L.) INFANTUM CHAGASI</i> ATRAVÉS DA PICADA DO INSETO INFECTADO.....	53
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Habitats de flebotomíneos adultos: regiões úmidas com florestas, frestas de pedras e buracos na areia do deserto.....	17
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da digestão sanguínea e do desenvolvimento folicular ovariano em dípteros hematófagos (Forrattini, 1973). .....	18
<b>Figura 3:</b> Representação do tubo digestório de um flebotomíneo (Jobling, 1987). .....	20
<b>Figura 4:</b> Classificação básica das espécies de <i>Leishmania</i> determinada pelo seu padrão de desenvolvimento nos tubo digestório de flebotomíneos. Adaptado de Lainson & Shaw 1979. ....	21
<b>Figura 5:</b> Desenho esquemático do desenvolvimento completo do parasito <i>Leishmania</i> dentro do vetor, (Sacks & Kamhawi, 2001; modificado). .....	23
<b>Figura 6:</b> Experimento de transmissão pela picada. Seta mostrando um <i>L. longipalpis</i> confinado no tubo de acrílico se alimentando na orelha do camundongo. Detalhe da orelha onde se pode observar o eritema causado pela da picada. ....	37
<b>Figura 7:</b> Placas de Petri com colônias bacterianas isoladas do intestino de <i>L. longipalpis</i> , exemplificando características das colônias. A: apresenta colônias mais esbranquiçadas e granulares. B: apresenta colônias amarelas e densas.....	42
<b>Figura 8:</b> Gel de poliacrilamida 0,8%, revelando a banda de 1500pb do gene 16S alvo para sequenciamento. ....	47
<b>Figura 9:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. longipalpis</i> infectado com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> e tratado com antibiótico Carbenicilina no segundo e quinto dia após infecção experimental.....	49
<b>Figura 10:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. longipalpis</i> infectado com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> e tratado com antibiótico gentamicina no 2° e 5° dia após infecção experimental. ....	50
<b>Figura 11:</b> Efeito da incubação de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> com uma bactéria do gênero Providencia, isolada do intestino médio de <i>L. Longipalpis</i> da Gruta da Lapinha. ....	51
<b>Figura 12:</b> Efeito da incubação de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> com uma bactéria do gênero Acinetobacter, isolada do intestino médio de <i>L. Longipalpis</i> de Jacobina.....	52
<b>Figura 13:</b> Valor relativo da expressão de AMP's em <i>L. longiplpis</i> da Gruta da Lapinha Alimentados e Não alimentados. ....	53
<b>Figura 14:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. longipalpis</i> infectado com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> do 2° ao 14° dia após a infecção experimental. ....	54
<b>Figura 15:</b> Densidade de parasitos encontrados na orelha de camundongos Balb/C e Hamster por análise quantitativa absoluta de PCR em tempo real. ....	54

**Figura 16:** Densidade de parasitos encontrados na orelha de camundongos Balb/C expostos à picada de um único flebotomíneo, por análise absoluta de PCR em tempo real.....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequencia dos iniciadores 16S usado para amplificar o DNA extraído dos isolados bacterianos do intestino de <i>L. longipalpis</i> . .....	33
<b>Tabela 2:</b> Componentes da reação em cadeia de polimerase para o gene ribossomal 16S. ....	33
<b>Tabela 3:</b> Condições para a reação de PCR do DNA extraído dos isolados bacterianos do intestino médio de <i>L. longipalpis</i> . .....	33
<b>Tabela 4:</b> Componentes da reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.....	34
<b>Tabela 5:</b> Condições para a reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.....	35
<b>Tabela 6:</b> Iniciadores e sonda usados na quantificação absoluta de parasitos por orelha. ....	38
<b>Tabela 7:</b> Componentes para a reação de quantificação absoluta de PCR em tempo real. ....	38
<b>Tabela 8:</b> Componentes da reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.....	40
<b>Tabela 11:</b> Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Alimentado (S). As leveduras não foram apresentadas na tabela.....	43
<b>Tabela 12:</b> Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Não alimentado (N). .....	43
<b>Tabela 13:</b> Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Pós digestão (O).....	44
<b>Tabela 14:</b> Caracterização dos isolados microbianos do grupo Jacobina fêmea (JF). .....	45
<b>Tabela 15:</b> Distribuição das formas celulares por grupos de análise.....	46
<b>Tabela 16:</b> Distribuição de bactérias Gram negativas ou positivas nos isolados de cada grupo de intestino analisado. ....	46
<b>Tabela 17:</b> Isolados bacterianos que apresentaram similaridade com sequencias depositadas no GenBank. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg = micrograma

µL = microlitro

AMPs = *Antimicrobianos peptides* (Peptídeos antrimicrobianos)

Atac= Atacina

BA = Bahia

BHI= Infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*)

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

Bs = *Bacillus sphaericus*

BSA= *Benzenesulfonic acid*

Bti = *Bacillus thuringiensis israelensis*

CDC = Center for Disease Control light trap

Cec = Cecropina

CPqRR = Centro de Pesquisa René Rachou

Ct = *Threshold cycle*

Def = Defencina

DEPC = dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase

DNA = Desoxyribonuclease

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

F= foward

g = grama

Gamb= Gambicina

IDT = Integrated DNA Technologies

JF = Jacobina fêmea

L = litro

LC = Leishmaniose cutânea

LPG = Lipofosfoglicano

LV = Leishmaniose Visceral

MG = Minas Gerais

mL = mililitro

mM = milimolar

N = Não alimentado

O = Oeste

O = Pós digestão

°C = Graus Celsiusxii  
Pb = pares de bases  
PBS = Tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)  
PCR = reação em cadeia de polimerase  
pH = Potencial hidrogeniônico  
pmol = picomol  
PPGs = proteofosfoglicanos  
PSG = promastigote secretory gel  
q.s.p = quantidade suficiente para  
R = reverse  
RNA = Ribonuclease  
RP49 = Ribossomal Protein gene 49  
rpm = Rotações por minuto  
S = Alimentado  
S = Sul  
TBE = Tris-borado EDTA  
UFC = Unidade formadora de colônia  
V = Volts  
VL = *Visceral leishmaniasis*  
WHO = World Health Organization  
x = vezes

## RESUMO

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada dos flebotomíneos. A doença apresenta diferentes manifestações clínicas, como a leishmaniose visceral (LV). No Brasil a LV é causada pela subespécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* e transmitida principalmente pelo vetor *Lutzomyia longipalpis* e nos últimos dez anos, a média anual de novos casos foi de 3.379. O flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, pode ingerir o parasito que é direcionado ao intestino médio do inseto, onde entra em contato com a microbiota. *In vitro* a ação dessa microbiota sobre o parasito foi avaliada demonstrando a lise na parede celular de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *Leishmania (V.) braziliensis* causada por *Serratia marcescens*, porém ainda não está claro o seu papel no vetor. Neste trabalho foi feita a identificação por sequenciamento de DNA de isolados bacterianos do intestino médio de *L. longipalpis* de duas localidades brasileiras. Nas fêmeas de flebotomíneos da Gruta da Lapinha foi encontrada pela primeira vez a bactéria da família Enterobacteriaceae, *Providencia sp.* Nas fêmeas de Jacobina a bactéria encontrada foi a espécie *Acinetobacter soli*. As duas localidades apresentaram maior número de bactérias do tipo bacilos Gram negativos. Os machos de Jacobina não apresentaram crescimento bacteriano, diferentemente dos machos da Gruta da Lapinha. Para análise da influência das bactérias no desenvolvimento do parasito, Fêmeas de *L. longipalpis* foram infectadas com *Leishmania (L.) infantum chagasi* e tratadas com dois antibióticos de ação principal sobre bactérias Gram negativas, carbenicilina e gentamicina. Os parasitos do grupo tratado com carbenicilina, além de serem capazes de se estabelecer no flebotomíneos após a digestão, tiveram um aumento no seu número. O grupo tratado com gentamicina apresentou uma queda já no segundo dia pós-infecção, tendo um aumento no quinto dia. Ao incubar as bactérias identificadas no intestino médio com *L. (L.) infantum chagasi in vitro*, foi possível ver que as bactérias interferem no crescimento do parasito. Analisamos também a expressão de peptídeos antimicrobianos. Gambicina e defensina apresentaram diferença de expressão entre os grupos Não alimentados e Pós Digestão, sendo que a expressão foi maior em Não alimentados. No processo de interação, estabelecemos no laboratório a transmissão de *L.(L.) infantum chagasi* diretamente via picada do flebotomíneo a hamsters e camundongos. Os dois modelos apresentaram uma variação de 4 a 15 mil parasitos inoculados na orelha dos vertebrados.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and they are transmitted by the bite of sandflies. The disease presents different clinical manifestations, such as visceral leishmaniasis (VL). In Brazil, VL is caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* and it is transmitted by the vector bite *Lutzomyia longipalpis* and during the last ten years the annual new cases average of VL was 3.379. The sandfly is able to ingest the parasite during the blood meal which is directed to the insect midgut where it gets in contacts with the microbiota. The microbiota activity over the parasite was evaluated *in vitro* demonstrating cell walls lysis of *Leishmania (L.) infantum chagasi* and *L. braziliensis* caused by *Serratia marcescens* but their role in the vector is not clear yet. This work identified bacterial isolates from the *L. longipalpis* midgut from two deferent places in Brazil by sequencing DNA. Lapinha Cave females showed for the first time in sandflies a bacteria from the Enterobactereaceae family, *Providencia sp.* Jacobina females' insects presented *Acinetobacter soli* as a midgut bacteria. The insects from both sites showed a majority of Gram negative rods. Males from Jacobina showed no bacterial growth, unlike the Lapinha Cave ones. In order to analyze the influence of bacteria on the development of the parasite, *L. longipalpis* females were infected with *L. (L.) infantum chagasi* and treated with two difenrets antibiotics for Gram negative bacterias, carbenicillin and gentamicin. Carbenicillin treated group parasites were able to establish infection in sand flies after digestion increasing the number of parasites. The gentamicin treated group featured a parasite drop since the second day post-infection, having an increasing on the fifth day. Incubating *in vitro* those bacterias identified in the midgut with *L. (L.) infantum chagasi*, could be seen that bacteria interfere on parasite growth. We also analyzed the antimicrobial peptides expression in the insects. Gambicina and defensin expression differ between groups; Not Fed and Post Digestion. The expression was higher in Not Fed one. In the interaction process, we established the laboratory transmission of *L. (L.) infantum chagasi* directly by the sandfly bite on hamsters and mice. Both models showed a range 4 to 15 million parasites inoculated into the vertebrates' ear.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. OS FLEBOTOMÍNEOS

Flebotomíneos são insetos dípteros da família Psychodidae, distribuídos em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Ashford, 1991). Esses insetos possuem tamanho de 0,3 a 0,4 cm, e cor que pode variar de castanho claro a negro com escamas distribuídas por todo o corpo (Killick-Kendrick, 1999). Quando pousam apresentam as asas eretas em forma de lança. Devido a essas características recebem diversos nomes populares como “birigui”, “mosquito palha”, “cangalhinha”, entre outros. Existem cerca de 400 espécies descritas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Rangel & Laison, 2003).

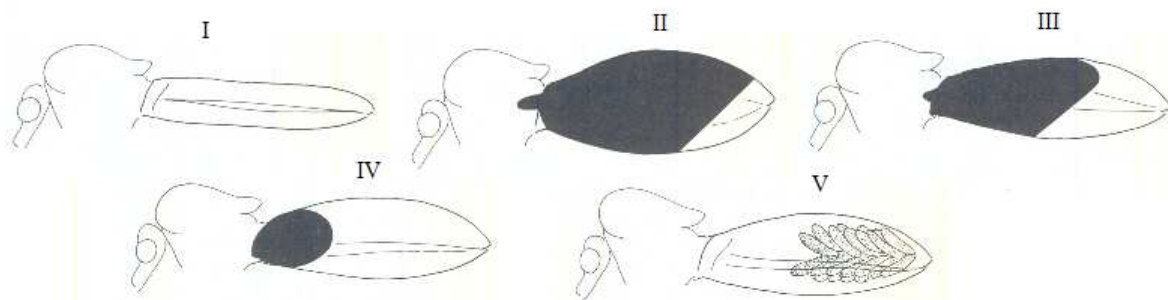
Os flebotomíneos são insetos holometábolos, apresentando após eclosão do ovo, quatro estágios larvais, um estágio de pupa e o adulto. A eclosão do ovo ocorre de 7 a 17 dias após a postura, em condições ambientais favoráveis (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a), e o seu desenvolvimento completo pode variar de 30 a 100 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais, como por exemplo *Lutzomyia longipalpis*, que apresenta seu ciclo de desenvolvimento de 30 a 45 dias em condições de laboratório. As larvas se alimentam de matéria orgânica do solo (Ferro *et al.*, 1997) e se desenvolvem em locais úmidos onde haja substrato orgânico (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a). Os flebotomíneos adultos vivem em abrigos úmidos como fendas de árvores, tocas de animais e fendas de pedras (Figura 1).



**Figura 1:** Habitats de flebotomíneos adultos: regiões úmidas com florestas, frestas de pedras e buracos na areia do deserto.

Os habitats dos flebotomíneos variam desde florestas tropicais a desertos, incluindo ambientes urbanos (Forattini, 1973). Eles alimentam-se de fontes naturais de açúcar (seiva vegetal) (Killick-Kendrick, 1999). As fêmeas, da maioria das espécies, necessitam de alimentação sanguínea para maturação do folículo ovariano, que ocorre após a digestão e absorção dos nutrientes do sangue (Figura 2). Os flebotomíneos possuem em sua maioria,

hábitos crepusculares ou noturnos para realizarem a hematofagia. Durante o repasto sanguíneo, o flebotômíneo introduz as peças bucais na pele do hospedeiro, lacerando o tecido e formando uma pequena piscina de sangue. Durante a hematofagia o inseto libera saliva que apresenta diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, imunossupressores e vasodilatadores (Ribeiro *et al.*, 1995; Kamhawi, 2000). O sangue ingerido é direcionado ao intestino médio, enquanto as soluções açucaradas são direcionadas ao divertículo esofágiano.



**Figura 2:** Representação esquemática da digestão sanguínea e do desenvolvimento folicular ovariano em dipteros hematófagos (Forrattini, 1973).

A preferência do flebotômíneos ao hospedeiro vertebrado para a obtenção do sangue é bastante variada. O comportamento pouco seletivo de algumas espécies leva esses insetos hematofágos a se alimentarem em diversas fontes de vertebrados, inclusive humanos. Esse comportamento facilita a transmissão de doenças (Killick-Kendrick, 1999). Os flebotômíneos são capazes de transmitir, bactérias patogênicas que causam a Bartonelose, vírus causadores da febre papatasi e de algumas arbovirose e protozoários, causando as Leishmanioses (Forattini, 1973, Pessoa & Martins, 1977).

No intestino médio o sangue é envolvido pela matriz peritrófica, composta de quitina, proteínas e glicoproteínas, secretadas pelas células do intestino médio. (Walters *et al.*, 1993; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Entre as funções da matriz peritrófica podemos citar: (a) proteção do epitélio contra elementos constituintes do bolo alimentar (Richards & Richards, 1997); (b) compartimentalização do bolo alimentar (Terra & Ferreira, 1994); (c) proteção contra patógenos (Peters, 1992; Miller & Lehane, 1993); (d) controle do fluxo de pequenas moléculas como enzimas digestivas e produtos da digestão (Tellam, 1996); (e) detoxificação e sequestro do “heme” produzido pela quebra da hemoglobina (Pascoa *et al.*, 2002).

Os flebotomíneos, assim como muitos outros insetos, digerem as proteínas do sangue com o auxílio de proteases, tais como tripsinas, que são secretadas pelas células do epitélio intestinal e responsáveis pela quebra do alimento. A digestão dos peptídeos, produzido pela quebra parcial das proteínas, é acompanhada pela produção de amino-carboxipeptidases que se encontram livres ou associadas ao epitélio intestinal. Os nutrientes provenientes da digestão são absorvidos no intestino médio, e os sais e água no intestino posterior (Richards & Davies 1977, Chapman 1982, 1985). Esses nutrientes são usados para a maturação dos ovos.

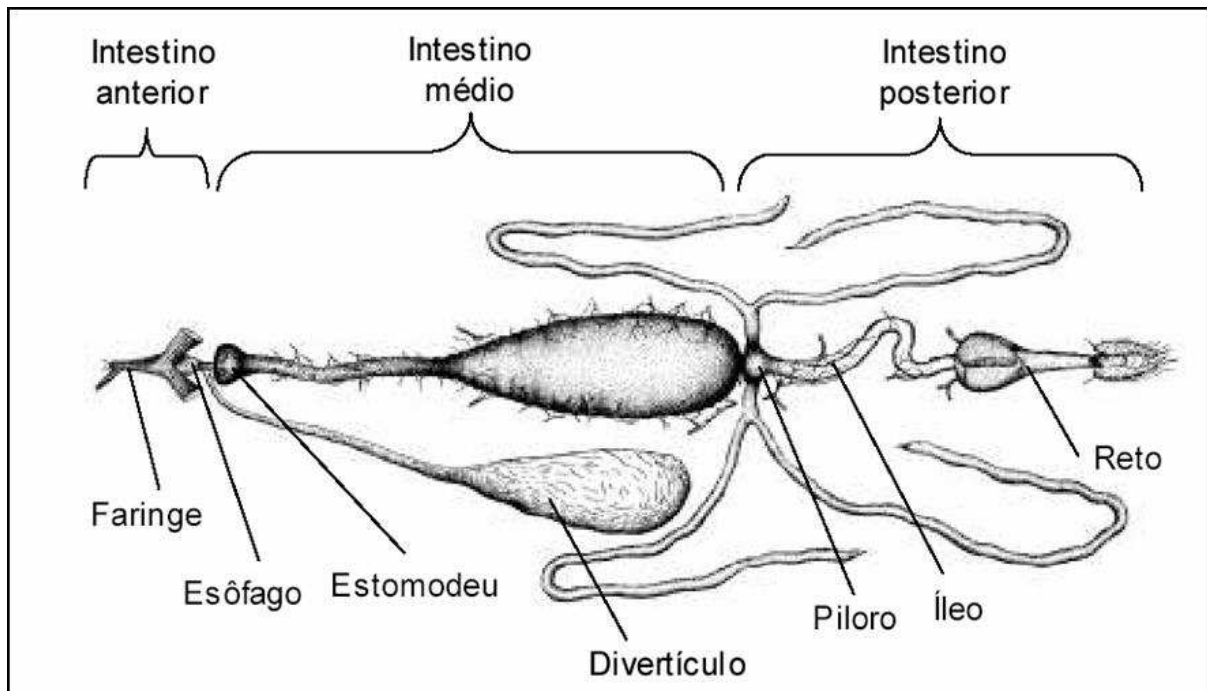
## 1.2. PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

*Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae. Compreendem organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo simples e uma organela semelhante à mitocôndria, rica em DNA, o cinetoplasto (Ross, 1903). O ciclo de vida do parasito se distingue em dois estágios de desenvolvimento, um no hospedeiro vertebrado e o outro no hospedeiro invertebrado, os flebotomíneos. No hospedeiro vertebrado o parasito é encontrado na forma intracelular amastigota, sem flagelo aparente, dentro de células do sistema imune fagocitário. No invertebrado é encontrada a forma extracelular promastigota, no trato digestório, que passa por um processo de diferenciação, a metaciclogênese.

Esses parasitos são encontrados em uma variedade de animais silvestres e domésticos em todos os continentes, exceto na Antártica (Ashford, 1996), e são agentes etiológicos de doenças conhecidas como Leishmanioses. Aproximadamente 40 espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas, sendo cerca de 21 responsáveis por causar a doença (Killick-Kendrick, 1990).

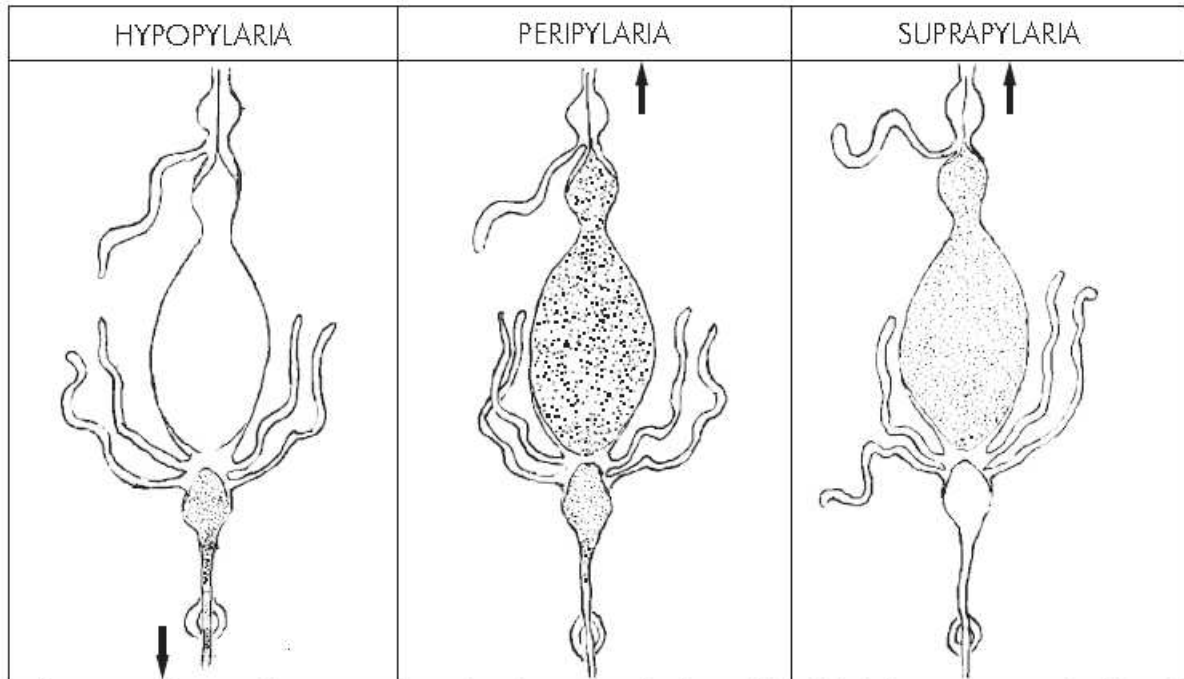
A classificação em subgêneros de *Leishmania* está relacionada com o seu comportamento de desenvolvimento no trato digestório do vetor. Três tipos de desenvolvimento foram descritos por Lainson e Shaw (1987). A classificação suprapilárica, é caracterizada pelo desenvolvimento dos parasitos restrito ao intestino médio do vetor. No desenvolvimento peripilárico os parasitos são capazes de estabelecer a infecção inicial no triângulo pilórico, onde promastigotas se aderem à cutícula (Nieves & Pimenta, 2000). Essa adesão inicial faz com que os parasitos sobrevivam aos movimentos peristálticos do intestino durante o processo de digestão, evitando desta forma a perda da infecção. E o desenvolvimento hipopilárico em que os parasitos se desenvolvem na porção posterior do intestino. A morfologia do trato digestório dos flebotomíneos está representada na figura 3 e os tipos de desenvolvimento na figura 4.

Utilizando esse padrão de localização de desenvolvimento dos parasitos, os subgêneros determinados. O subgênero *Viannia* contempla os parasitos com desenvolvimento peripilárico como a *L. (Viannia) braziliensis*. O subgênero *Leishmania* contempla as espécies com desenvolvimento suprapilárico, como a *L. (L.) infantum chagasi*. O subgênero *Sauroleishmania* representado pelas espécies com desenvolvimento hipopilárico que apresentam répteis como hospedeiro vertebrado.



**Figura 3:** Representação do tubo digestório de um flebotomíneo (Jobling, 1987).

As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas, relacionadas com as diferentes espécies do parasito. Dentre elas estão as leishmanioses cutâneas, quando o parasito apresenta tropismo por células da pele e aparecem lesões que podem ser ulcerativas e de cura espontânea que deixam fortes cicatrizes. Existem ainda formas recidivas da doença que aparecem após o tratamento. As leishmanioses cutâneas são causadas principalmente por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo e *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* no Novo Mundo (revisado por Sacks *et al.*, 2008; Sharma & Singh, 2008). A leishmaniose cutânea difusa apresenta lesões não ulcerativas, por todo o corpo e sem cura espontânea e é causada principalmente por *L. (L.) amazonensis* no Novo Mundo sendo de difícil tratamento. A leishmaniose muco-cutânea apresenta lesões nas mucosas podendo ser desfigurante e são causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (Herwald, 1999).



**Figura 4:** Classificação básica das espécies de *Leishmania* determinada pelo seu padrão de desenvolvimento nos tubo digestório de flebotomíneos. Adaptado de Lainson & Shaw 1979.

A leishmaniose visceral (LV) também conhecida como Kala azar, é outra forma de manifestação da doença, sendo sistêmica e podendo ser fatal se não tratada. Apresenta como principais sintomas febre, perda de peso, inchasso do baço e do fígado (hepato-esplenomegalia) e diminuição de células sanguíneas (pancitopenia). Em alguns casos após o tratamento pode haver o aparecimento de uma forma cutânea pós kala azar. Infectam principalmente crianças, indivíduos desnutridos e imunossuprimidos (Gramiccia & Grandoni 2005; Chappuis *et al.*, 2007). Seus agentes etiológicos são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) infantum chagasi* no Novo Mundo (revisado em Mauricio *et. al.*, 2000 e Lukes *et al.*, 2007).

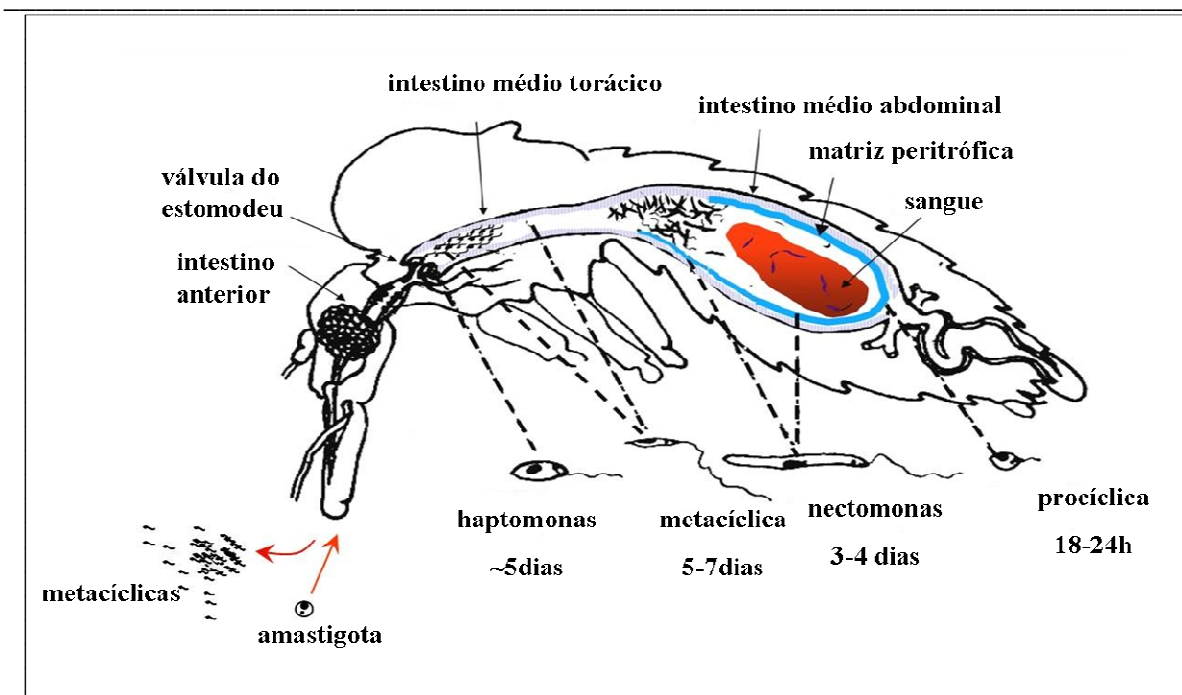
As leishmanioses são prevalentes em 88 países de quatro continentes do mundo e estima-se que apareçam 1,6 milhões novos casos por ano, sendo que apenas 600 mil são reportados, por ser uma doença de notificação compulsória em somente 33 desses países. Quinhentos mil desses novos casos são de leishmaniose visceral, ocorrendo 90% deles em apenas cinco países, Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2010). A LV está distribuída em 21 estados do Brasil, atingindo todas as cinco regiões. Nos últimos dez anos a média anual de casos de LV humana foi de 3.379. A região Nordeste representa 48% dos casos humanos do país (Brasil, 2009). No Brasil a LV é causada pela subespécie *L.(L.)*

*infantum chagasi* (Cunha & Chagas 1937; Nicolle 1908; Shaw 2006) e transmitida pelos vetores *L. longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) e *L. cruzi* (Missawa *et al.*, 2011).

### 1.3. O CICLO DO PARASITO NO VETOR

As leishmanioses são transmitidas aos hospedeiros vertebrados por cerca de 30 espécies de flebotomíneos. (Shaw & Lainson, 1987). O flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, pode ingerir o parasito na forma amastigota. Essa forma é rapidamente direcionada ao intestino médio do inseto e envolta pela matriz peritrófica junto ao o bolo sanguíneo (Walters *et al.*, 1993; 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Após um período de doze a vinte horas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas. As promastigotas iniciam o processo de metaciclogênese, transformando-se na forma promastigota metacíclica, forma infectante ao vertebrado, (Sacks & Perkins, 1984; Descoteaux, 1999). Além da forma infectante, no trato digestório do vetor são encontradas outras formas como as promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas e promastigotas haptomonas (Lawyer *et al.*, 1990).

A localização e desenvolvimento das promastigotas no trato digestório do vetor é espécie específica (Walters *et al.*, 1989). Os principais eventos que ocorrem durante o processo de interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*, constituem barreiras para o desenvolvimento do parasito no vetor (Figura 4). (Revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006). Entre eles estão: a ação das enzimas digestivas (Borovsky & Schlein, 1987); a matriz peritrófica (Walter *et al.*, 1993; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005); a transformação de amastigotas para promastigotas procíclicas; a ruptura da matriz peritrófica na região do intestino médio, devido a produção de quitinase pelos parasitos (Sacks *et al.*, 1994); a adesão ao epitélio do trato digestório das promastigotas pelo flagelo, dependente da expressão de moléculas espécie-específicas de lipofosfoliglicano (LPG) na superfície dos parasitos (McConville *et al.*, 1990; Pimenta *et al.*, 1994); a migração dos parasitos para a região da cárdia ou válvula do estomodeu após a completa digestão do alimento sanguíneo; a diferenciação dos parasitos em promastigotas metacíclicas, forma infectiva ao hospedeiro vertebrado no momento da picada (Turco & Descoteaux, 1992); o sucesso na alimentação do flebotomíneo infectado sendo capaz de inocular os parasitos em um novo hospedeiro vertebrado durante a picada; a ação da saliva do vetor, intensificando e modulando o estabelecimento da infecção no local da picada no hospedeiro vertebrado (Ribeiro *et al.*, 1995),



**Figura 5:** Desenho esquemático do desenvolvimento completo do parasito *Leishmania* dentro do vetor, (Sacks & Kamhawi, 2001; modificado).

#### 1.4. A TRANSMISSÃO DO PARASITO PELO VETOR

O inseto encontra-se apto a transmitir o parasito ao hospedeiro vertebrado após a formação das promastigotas metacíclicas. Killick-Kendrick e Molyneaux (1981) sugeriram um mecanismo de transmissão no qual formas metacíclicas interferem diretamente nas sensilas das partes bucais. Essas sensilas, que controlam a sondagem e alimentação, influenciariam a taxa e o direcionamento do material no canal alimentar e promoveriam a liberação dos parasitos na pele do vertebrado. Outro fato previamente proposto foi o dano físico causado à válvula do estomodeu, atribuído à ação de quitinases produzidas pela *Leishmania* (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004). Esse dano físico dificultaria o repasto e favoreceria a regurgitação de promastigotas infectantes na pele do vertebrado. Outros autores, entretanto, relacionam a transmissão à bloqueios biológicos formados por massas de parasitos embebidos em uma matriz tipo gel, na válvula do estomodeu (Warburg *et al.*, 1986; Lawyer *et al.*, 1987, 1990; Walters *et al.*, 1987, 1989; Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002). Essa substância tipo gel, secretada pelo parasito no intestino médio, é denominada PSG (*promastigote secretory gel*). Esse gel seria também responsável pela disfunção mecânica da válvula estomatideal causada pela pressão de uma massa de parasitos. Esse gel foi encontrado em *L. longipalpis* infectados com *L. (L.) mexicana* ou *P. papatasi* infectados com *L. (L.) major*. A obstrução é comum a todas as combinações *Leishmania*/vetor estudadas até o

momento (Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002, 2004). Em altas concentrações e sob o limitado volume do intestino do flebotomíneo os protofosfoglicanos são condensados sob a forma do PSG (Stierhof *et al.*, 1999). Dessa forma, o bloqueio causado pelo PSG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, aumentando o número de tentativas de picada e o tempo de repasto (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Beach *et al.*, 1985; Rogers *et al.*, 2002; Rogers & Bates, 2007).

Após o corte dos vasos sanguíneo ocorre a ação da saliva, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo promovendo uma rápida alimentação do inseto. Os eventos tanto físicos quanto biológicos poderiam causar mudanças no comportamento do inseto que facilitariam a deposição de parasitos. Ações em conjunto tais como: a lesão no tecido do vertebrado causado pela picada; o PSG, obstruindo a válvula e a saliva, auxiliariam o flebotomíneo a realizar o repasto facilitando a entrada do parasito no vertebrado (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Oliveira *et al.* 2008). Após a inoculação na pele do hospedeiro das formas promastigotas metacíclicas, essas são fagocitadas pelos macrófagos, ou primeiramente por neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o sítio da picada (van Zandbergen *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008). Imagens do processo de transmissão dos parasitos revelaram um papel significativo para os neutrófilos, que são rapidamente atraídos para o sítio da picada, provendo a sobrevivência dos parasitos nos períodos iniciais da infecção (Peters *et al.*, 2008). Na literatura, todo o conhecimento gerado acerca do processo de infecção e do estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado tem sido através da inoculação intradérmica ou subcutânea de parasitos. Os experimentos tradicionais e rotineiros utilizam inóculo com quantidades variáveis de parasitos (Belkaid *et al.*, 1998 e 2000). A quantidade de parasitos a ser inoculada era adequada devido à necessidade de se estabelecer a infecção no hospedeiro sem, contudo, levar em consideração o número de parasitos inoculados pelo inseto vetor. Warburg e colaboradores (1986) propuseram uma dose de *L. (L.) major* a ser transmitida por *P. papatasi*. Entretanto essa dose foi estimada através da contagem do número de parasitos metacíclicos regurgitados em um microcapilar, obtendo uma estimativa de 0 a 1.000. Para espécies do Novo Mundo foi sugerido que a quantidade de *L.(L.) mexicana* regurgitadas por *L. longipalpis* varia de 10 a 10.000 parasitos, porém esse estudo foi conduzido utilizando um modelo experimental em que o flebotomíneo picava uma membrana recoberta por meio de cultura, onde regurgitava os parasitos, e não pela picada no hospedeiro (Rogers *et al.*, 2004).

Recentemente, foi demonstrado por PCR em tempo real da orelha do hospedeiro vertebrado, que *P. papatasi* infectado com *L. (L.) major* pode inocular pela picada, de 100 a 100.000 parasitos. Cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 600 ou menos promastigotas,



enquanto os demais liberaram mais de 1.000 células. Altas doses de infecção foram associadas a intestinos fortemente infectados, com mais de 30.000 parasitos (Kimblin *et al.*, 2008)

### 1.5. A MICROBIOTA E SEU POSSÍVEL PAPEL NA INTERAÇÃO

Os insetos estão naturalmente associados a uma diversidade de micro-organismos e atualmente é amplamente aceito que a microbiota intestinal é proveniente do ambiente ao redor, incluindo fontes de alimentação. Uma microbiota distinta pode ser encontrada em insetos em diferentes fases de vida como em larvas, recém-emergidos ou alimentados (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Essas bactérias podem ser endossimbiontes ou entomopatógenas causadores de doenças. Sendo que simbiotes, segundo Douglas (2007), seria qualquer associação entre o micro-organismo e seu hospedeiro. Mutualismo e comensalismo seriam relações positivas de simbiose. No comensalismo o micro-organismo beneficia o hospedeiro e no mutualismo ambos são beneficiados (Klepzing *et al.*, 2009). Os micro-organismos do intestino tem a habilidade de se adaptarem rapidamente a mudanças na dieta do inseto, induzindo a ação enzimática e mudando a população da microbiota intestinal (revisado em Dillon & Dillon, 2004). O uso de antibióticos tem efeito tóxico ao hospedeiro, selecionando uma colonização de micro-organismos resistentes (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Foi demonstrado que as bactérias da microbiota em alguns insetos são capazes de trocar plasmídios contendo inclusive genes de resistência a antibióticos (Watanabe & Sato, 1998). A significância adaptativa da microbiota intestinal dos insetos, leva ao desenvolvimento de mecanismos de supressão da resposta imune intestinal pelas bactérias (Ryu *et al.*, 2008). Contudo, os insetos desenvolveram uma resposta imune eficiente para combater a invasão de outros micro-organismos não simbiotes, sendo essa, composta pelo sistema imune inato, envolvendo componentes humorais e celulares (Christophides *et al.*, 2002; Osta *et al.*, 2004; Hillyer & Christensen, 2005). Embora os insetos não possuam o sistema imune adaptativo como os mamíferos existem múltiplas defesas de imunidade inata contra vários desafios microbianos que insetos tais como os mosquitos possam interagir (Alphey, 2009), interferindo na sua competência vetorial.

A maior parte dos estudos realizados se concentra nas interações caracterizadas por contribuições das bactérias para o metabolismo do inseto hospedeiro (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Estudos demonstraram que a microbiota pode fornecer resistência contra inimigos naturais e parasitos (Oliver *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2005), pode interferir em relações sociais (Dillon & Charney, 2002) e afetar a resposta imune do inseto hospedeiro

(Hoffman & Reichhart 2002; Basset *et al.*, 2003; Baton *et al.*, 2009). Além disso, bactérias endossimbiontes, como as do gênero *Wolbachia*, estão presentes em tecidos reprodutivos, e estão associadas a uma variedade de anomalias, tais como incompatibilidade reprodutiva, morte de machos e indução de partenogênese (Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999). Azpurua e colaboradores (2010) demonstraram a presença de *Wolbachia* em distintas espécies de *Lutzomyia*.

Embora Schlein e colaboradores (1985) tenham demonstrado que o divertículo esofágico de *P. papatasi* apresenta atividade anti-bactericida e postulado que o intestino médio do inseto é livre de bactérias devido ao efeito destes inibidores presentes no divertículo, outros estudos recentes demonstraram a presença de uma microbiota intestinal em flebotomíneos. Estes estudos, em sua maioria, são referentes à microbiota intestinal de flebotomíneos do Velho Mundo. Dillon e colaboradores (1996) mostraram que o número de bactérias presentes no intestino médio de *P. papatasi* muda durante a sobrevida da fêmea. A seguir Volf e colaboradores (2002) demonstraram que *P. duboscqi* apresenta bactérias imediatamente após a emergência do adulto, e as formas larvais possuem *Pseudomonas sp*, *Oligella sp*, *Enterobacter gervoviae* e *Sphingobacterium spiritivorum*. Já os adultos em distintas condições como antes e após a alimentação sanguínea, apresentaram na sua maioria *Ochrobactrum sp*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* sugerindo que essa microbiota é proveniente da fase larvar. Uma vasta diversidade de microorganismos foi reportada por Hillesland e colaboradores (2008), os quais isolaram do intestino médio de *P. argentipes* 28 micro-organismos dentre eles os mais prevalente foram *Staphylococcus sp*. e dois não patogênicos *Bacillus megaterium* e *Brevibacterium linens*.

Considerando os flebotomíneos vetores das Américas, alguns trabalhos já foram realizados em *L. longipalpis* (Oliveira *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2008; Mccarthy *et al.*, 2011). Oliveira e colaboradores (2000) descreveram a prevalência da microbiota bacteriana encontrada em populações de campo de *L. longipalpis* provenientes da gruta da Lapinha, Minas Gerais. As bactérias encontradas foram: *Acinetobacter lowffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Flavimonas orizihabitans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ozaenae*, *Bacillus thuringiensis* e *Staphylococcus spp*. O mesmo grupo (Oliveira *et al.*, 2001) observou a microbiota de *L. longipalpis* comparando exemplares em duas diferentes condições: a) fêmeas alimentadas com sangue e sacarose, nas quais observou os gêneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Yokenella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* e (b) fêmeas alimentadas apenas com sangue onde se observou os gêneros *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Serratia*. Gouveia e colaboradores (2008) descreveram a microbiota bacteriana encontrada no intestino

de *L. longipalpis* provenientes de Bahia, Maranhão e Minas Gerais. As bactérias encontradas foram: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Critrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Morganella* e *Weeksella* sendo que *Stenotrophomonas* estavam presentes nas três populações analisadas e *Serratia* apenas na população de Jacobina. McCarthy e colaboradores (2011), usaram métodos de identificação não cultiváveis, a metagenômica, identificando bactérias de *L. longipalpis* da Gruta da lapinha e da Argentina.

Embora os estudos descritos acima tenham demonstrado diferentes espécies de bactérias compondo a microbiota do intestino do *L. longipalpis*, até o momento, não existem estudos que possibilitem um entendimento do papel desta microbiota no processo de infectividade e conseqüentemente, na sua influência na competência vetorial para transmissão de *Leishmania* pelo vetor. Segundo Brooks (1963) (Apud Dillon & Dillon 2004) o isolamento e caracterização da microbiota intestinal não tem sentido a não ser que correlacionada com a habilidade do hospedeiro em controlá-la ou com a sua capacidade de alterar a fisiologia do hospedeiro. Existem na literatura artigos demonstrando este fato em mosquitos vetores transmissores de *Plasmodium* causadores de malária humana (Dong *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010). Um estudo pioneiro demonstrou a lise causada por bactérias sobre *Leishmania*, neste caso, Moraes e colaboradores (2008 e 2009) observaram este fenômeno com *Serratia marcescens* atuando na parede celular de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*.

Os estudos indicativos da lise de *Leishmania* por bactérias e os estudos do efeito da microbiota intestinal de mosquitos na infecção com plasmódio, nos faz acreditar que a microbiota do *L. longipalpis* tenha um papel importante na competência vetorial para a *L. (L.) infantum chagasi* influenciado pela presença de bactérias atuando no processo de desenvolvimento e sobrevivência do parasito.

#### 1.6. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E SUA POSSÍVEL RESPOSTA A PATÓGENOS

O tecido epitelial dos insetos fica diretamente em contato com micro-organismos do trato digestório, sendo o principal sítio de interação entre patógenos e hospedeiros. Um sistema imune é essencial para proteção desse hospedeiro. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm se mostrado importantes moléculas de proteção no intestino de invertebrados. (Lehane *et al.*, 1997; Vizioli *et al.*, 2001)

Os AMPs são as proteínas importantes na imunidade contra bactérias e fungos (Lemaitre & Hoffman, 2007). São moléculas catiônicas, de baixo peso molecular, até 30 kDa

e os insetos apresentam diversar dessas molécula (Bulet *et al.*, 1999). A produção dessas moléculas é induzida pelo reconhecimento celular de patógenos e ocorre no corpo gorduroso, na hemolinfa e por estruturas como intestino médio, túbulos de malpighi, traquéia e glândula salivar (Lehane, *et al.*, 1997; Levashina *et al.*, 2004).

A classe das defensina foi até o momento a única identificada em flebotomíneos *Phebotomus duboscqi* e *L. longipalpis*. Em *P. duboscqi* ela é mais expressas quando o inseto é desafiado com bactérias ou por *L. (L.) major* (Boulanger *et al.*, 2004; Pitalunga *et al.*, 2009). As defensinas agem em uma grande variedade de bactérias e fungos, principalmente bactérias Gram positivas.

### 1.7. MÉTODOS DE CONTROLE DO VETOR

O método mais eficaz de combate à etiologia é o controle do vetor, que pode ser feito através de controle químico, gênico e biológico. O controle biológico utiliza diferentes patógenos tais como vírus, bactérias, fungos e nematódeos (Marcondes, 2001; Rangel & Lainson, 2003; Secundino *et al.*, 2002) sendo largamente utilizado nos últimos tempos com a técnica de manejo integrado, associando técnicas de controle a fim de se evitar a seleção de organismos resistentes. O controle biológico tem sido uma das alternativas para contenção e ou eliminação de insetos causadores de pragas na agricultura e causadores de doenças no homem. Como exemplo clássico do uso de controles biológicos de mosquitos temos as formulações de Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) e Bs (*Bacillus sphaericus*), que têm sido usadas no controle do *Aedes aegypti* e de várias espécies de *Culex* (De Barjac, 1978; Consoli *et al.*, 1997).

O uso de bactérias transgênicas da microbiota dos organismos é uma possibilidade para o controle de doenças, mas é necessário um conhecimento sobre a sua colonização, persistência e formas de transmissão para que essa estratégia seja bem sucedida, (Dillon & Dillon, 2004; Peloquin *et al.*, 2002; Kuzina *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2000). Essa estratégia já tem sido proposta para interromper o ciclo de transmissão da doença de Chagas, (Beard, 2002; Durvasula *et al.*, 1997).

---

## 2. OBJETIVO

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar e caracterizar a microbiota de *L. longipalpis* e sua influência na susceptibilidade ou refratariedade à infecção por *L. (L.) infantum chagasi* e caracterizar a sua transmissão ao hospedeiro vertebrado, pela picada do vetor.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1. Aspectos relacionados à microbiota de *L. longipalpis*

Isolar e caracterizar morfologicamente as bactérias cultiváveis presentes na microbiota intestinal de *L. longipalpis* provenientes da Gruta da Lapinha (MG) e de Jacobina (BA).

Identificar as bactérias cultiváveis por métodos moleculares (gene do RNA ribossomal 16S).

Caracterizar a influência de micro-organismos presentes no intestino médio de *L. longipalpis* na infecção pela *L. (L.) infantum chagasi*.

Identificar possíveis bactérias que possam afetar o parasito *L. (L.) infantum chagasi*.

Avaliar a expressão de peptídeos antimicrobianos em *L. longipalpis*.

#### 2.2.2. Aspectos relacionados com a transmissão vetorial pela picada

Estabelecer a transmissão vetorial em laboratório.

Quantificar o número de parasitos injetados no hospedeiro vertebrado no momento da picada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA E ACONDICIONAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos foram coletados na Gruta da Lapinha, localizada no Parque Estadual do Sumidouro, no município de Lagoa Santa a 50 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'O; latitude 19°03'S). Armadilhas luminosas tipo CDC (*Center for Disease Control light trap*) (Sudia & Chamberlain, 1962) foram colocadas na face externa da caverna, semanalmente por volta das 14 horas e retiradas no dia seguinte, aproximadamente às 10 horas. Um *Gallus domesticus* foi mantido no interior da caverna como possível fonte de alimentação para os flebotomíneos. As gaiolas com os flebotomíneos coletados foram levadas ao Laboratório de Entomologia Médica no Centro de pesquisas René Rachou em Belo Horizonte (CPqRR/FIOCRUZ-MG) dentro de um isopor com algodão úmido, para manter temperatura e umidade. No laboratório os insetos foram mantidos em insetário a 25°C e com umidade em torno de 80%. Solução de 50% sacarose foi oferecida aos flebotomíneos em pequenos chumaços de algodão “*ad libitum*”.

**Colônia *L. longipalpis*:** Desde 1997, uma colônia de *L. longipalpis* proveniente da Gruta da Lapinha é mantida rotineiramente no Laboratório de Entomologia Médica, seguindo a metodologia de Killick-Kendrick e colaboradores (1977). A dieta larval é fornecida segundo Young e colaboradores (1981) e consiste de fezes, ração de coelho e ração comercial de peixe contendo camarão. Os insetos da colônia foram usados nos experimentos de transmissão vetorial pela picada.

Alguns experimentos foram realizados com *L. longipalpis* provenientes do município de Jacobina do bairro da Grotinha, (longitude 40°31'06" O; latitude 11°10'50" S) a 330 km de Salvador, no Estado da Bahia. Esses flebotomíneos foram coletados usando armadilhas do tipo CDC instaladas no peridomicílio de algumas casas do bairro. Esses insetos foram transportados ao Laboratório de Entomologia Médica no Centro de pesquisas René Rachou em Belo Horizonte (CPqRR/FIOCRUZ-MG), em potes com fundo de gesso, dentro de um isopor com chumaço de algodão embebidos em água, para manter a umidade, e mantidos como descrito acima.

#### 3.2. MANUTENÇÃO DOS PARASITOS

A cepa de *L. (L.) infantum chagasi* MHOM/BR/1970/BH46 foi mantida no biotério de experimentação do CPqRR através de passagem em Hamster. A cultura dos parasitos foi

mantida em meio M199 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL), estreptomicina (50µg/mL), glutamina (12,5mM), Hepes (40mM), adenina (0,1mM) e hemina (2,5µg/mL). O cultivo foi feito em garrafas para cultivo celular estéril em estufa a 26°C.

### 3.3. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE *L. longipalpis*

**Insetos:** Grupos da Lapinha: foram analisados 15 insetos de campo por grupo: a) Alimentado = presença de sangue no intestino médio (S), b) Não alimentado = ausência de sangue no intestino e ovários não desenvolvidos (N) e c) Pós digestão = presença de ovos no abdômen (O). 15 Machos da Gruta da Lapinha foram dissecados somente para constatar se havia crescimento bacteriano a partir do macerado do intestino médio. Grupos de Jacobina: foram separados 15 insetos em dois grupos: a) Machos (JM) e b) Fêmeas (JF).

**Dissecção e isolamento:** Os flebotômíneos foram anestesiados em CO<sub>2</sub> e separados nos distintos grupos de estudo. Posteriormente os insetos foram anestesiados em freezer (-20°C) lavados e dissecados em cabine de fluxo laminar: a) segundo Lacey e Brooks (1997), os insetos foram submergidos em álcool 70% por alguns segundos e 1 minuto em hipoclorito 1%, em seguida foram feitos 3 enxágues em PBS estéril; b) O intestino médio foi dissecado (retirando-se os tubos de Malpighi, o intestino anterior e o intestino posterior) sobre em uma lâmina contendo uma gota de PBS estéril com o auxílio de um estereoscópio e de estiletos, que foram previamente esterilizados com álcool 70% a cada dissecção. Cada grupo de 15 intestinos foi macerado em um microtubo de 1,5mL contendo 300µL de meio BHI líquido 37g/l (Infusão de cérebro e coração).

Da solução estoque de 300µL, 100µL foram transferidos a um erlenmeyer contendo 10mL de meio BHI líquido e incubados em estufa a 27°C por até 48 horas. A cultura passou por diluições seriadas de 10x e alíquotas de 100µL dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo 10mL de meio BHI sólido (15g de ágar/L de meio). Essas placas foram incubadas a 27°C por 48 horas. As colônias obtidas foram selecionadas de acordo com a variedade de cor, forma, margem e elevação. Os 200µL restantes da solução estoque foram disseminados em duas placas de Petri contendo meio BHI sólido, com o auxílio de alça de Drigalsky descartáveis, 100µL por placa, e colocados na estufa a 27°C por até 48 horas. Colônias dessas placas foram selecionadas de acordo com a variedade de cor, forma, margem e elevação. As colônias selecionadas foram submetidas a três repiques em placa de Petri com meio sólido BHI para garantir um isolamento puro e posteriormente foram crescidas em meio BHI líquido. Essas culturas puras provenientes do isolamento foram preparadas para

congelamento em meio de congelamento bacteriano com 65% de glicerol, sulfato de magnésio a 0,1M e Tris HCl pH 8,0 a 0,025M na proporção 50% meio de congelamento 50% cultura e em seguida estocada em freezer a -70°C.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados de culturas puras foram resubmetidos a um crescimento em meio líquido BHI por 16 horas a 27°C. Uma gota de cada cultura foi colocada em duas lâminas de vidro e uma delas foi recoberta com uma lamínula de vidro. Na outra lâmina, a gota foi espalhada com uma alça bacteriológica e quando seco, o material foi fixado em uma chama do bico de Bunsen e corado de acordo com a técnica de Gram: a) 1 minuto com Cristal Violeta (10% em acetona), b) 30 segundos Lugol, c) enxague com solução de acetona e álcool 1:1, d) enxague com água destilada e incubado por 30 segundos em safranina 0,25%. As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio óptico com a objetiva de 100x (imersão). Foram registradas a forma, o tipo de agrupamento, quando possível, e a coloração das células (rosa para Gram negativas ou violeta para Gram positivas).

### 3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S

**Amplificação:** Após a caracterização morfológica alguns isolados bacterianos, representativos dos diferentes tipos celulares e de Gram, foram cultivados como descrito na seção anterior. As culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm. A extração do DNA genômico foi feita com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Quiagen) seguindo orientações do fabricante. Esse DNA extraído foi quantificado e sua pureza analisada em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

Os DNAs foram então submetidos à amplificação em uma reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando iniciadores degenerados da porção do RNA ribossomal 16S, fornecidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies*), (Tabela 1) que amplificam uma região de aproximadamente 1500pb (Polz e Cavanaugh, 1998). A reação em cadeia foi polimerizada com a enzima *GoTaq* (Promega), reagentes listados na Tabela 2, e processada no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*). Os ciclos de cada reação seguiram as condições descritas na Tabela 3. Esse processo foi realizado em triplicata para cada isolado para garantir um volume final compatível com a necessidade de uso na reação de sequenciamento.



**Tabela 1:** Sequencia dos iniciadores 16S usado para amplificar a região de interesse do DNA extraído dos isolados bacterianos do intestino de *L. longipalpis*.

Iniciadores	Sequência 5'-3'
27 senso	5'-AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG
1492 antisenso	5'-TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT

**Tabela 2:** Componentes da reação em cadeia de polimerase para o gene ribossomal 16S.

Componentes	Concentração	Volume/reação
Tampão da reação	5X	5µL
Enzima <i>GoTaq</i>		0,2 µL
Mistura de dNTP	(10mM cada)	0,5 µL
Iniciador senso	(10pmol)	0,75 µL
Iniciador antisenso	(10pmol)	0,75 µL
DNA molde		2 µL
Água DEPC		15,8 µL
<b>Volume final</b>		<b>25 µL</b>

**Tabela 3:** Condições para a reação de PCR do DNA extraído dos isolados bacterianos do intestino médio de *L. longipalpis*.

Temperatura	Tempo	# de ciclos
96°C	2 minutos	1
95 °C	1 minutos	10
50 °C	1 minutos	10
72 °C	3 minutos	10
95 °C	1 minutos	25
50 °C	1 minutos	25
72 °C	3 minutos	25
72 °C	7 minutos	1
4 °C	∞	

**Gel:** Para confirmar a eficiência da reação o produto amplificado foi visualizado em géis de poliacrilamida a 0,8% (bis 30% e acrilamida 0,8%). Para isso foram aplicados no gel 5 $\mu$ L do produto da PCR com 1 $\mu$  do corante *Blue/Orange* 6x (Promega). Foi aplicado também ao gel um padrão de peso molecular 100 pb (Promega). Os géis foram submetidos à corrida de eletroforese (100V) utilizando tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato, ácido bórico e EDTA). Após a corrida os géis passaram pelo processo de fixação por 10 minutos em solução fixadora (2% ácido acético, 4% álcool etílico). Depois foram incubados com solução de nitrato de prata (1g/500mL de água destilada) por 10 minutos e lavados 2 vezes com água destilada por 1 minuto. Para revelar as bandas os géis foram colocados em solução de NaOH 3% (15g/500mL de água destilada) e 200 $\mu$ L de formaldeído até a revelação das bandas. Para interromper a revelação foi adicionada solução fixadora. Os géis foram documentados no Transiluminador UV 302 nm T26M *Easydoc* 100 (*BioAgency*) com uma câmera digital acoplada.

**Purificação:** O produto da PCR foi purificado usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Esse produto de PCR purificado foi quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Uma quantidade de 90 ng de produto amplificado foi usada para a reação de sequenciamento no sequenciador Maga Base 1000 (*GE Healthcare*) usando o kit *DyeNamic ET Terminator* (*GE Healthcare*). Nessa nova reação o mesmo iniciador da Tabela 1 foi usado. Os reagentes e condições para a reação de sequenciamento estão na Tabela 4 e 5 respectivamente.

**Tabela 4:** Componentes da reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.

Componentes	Concentração	Volume/reação
Iniciador senso	5 $\mu$ M	0, 5 $\mu$ L
Iniciador antisenso	5 $\mu$ M	0, 5 $\mu$ L
Produto da PCR	90ng	variável
kit ET Terminator		4 $\mu$ L
Água DEPC	q.s.p 10 $\mu$ L	variável
<b>Volume final</b>		<b>10 <math>\mu</math>L</b>

**Tabela 5:** Condições para a reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.

Temperatura	Tempo	# de ciclos
95°C	20 segundos	30
55°C	15 segundos	30
60°C	1 minutos	30

**Sequenciamento:** Esse segundo produto de PCR contém os dNTPs fluorescentes necessários para a leitura do material no sequenciador. Os procedimentos realizados a partir dessa etapa foram feitos pelos técnicos da Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz Minas. Esse material foi precipitado com 1 µL de acetato de amônio 7,5M e 20µL de etanol (Sigma) 95% ficando incubado, protegido da luz, por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700rpm. O sobrenadante foi descartado invertendo-se a placa e foi adicionado 100µL de etanol 70% a cada reação. Depois de centrifugar por 15 minutos a 3700rpm o sobrenadante foi descartado e uma nova centrifugação foi feita, com a placa invertida, por 5 segundos a 800rpm. O sedimento foi re-suspenso em 10µL da solução do kit. Após esses procedimentos o material foi sequenciado.

As sequências obtidas como resultado foram submetidas, com uso do BLAST, à consulta no banco de dados para comparação com sequências homologas depositadas no *GenBank*. Para escolha dos melhores alinhamentos foram analisados o “*e-value*” e a pontuação de cada sequência.

### 3.6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE FLEBOTOMÍNEOS COM *L. (L.) infantum chagasi*

**Preparo do Sangue:** O sangue de camundongo (*Mus musculus*) foi coletado através de punção cardíaca e centrifugado a 2500 rpm por 8 minutos para separar o plasma das hemácias. O plasma foi inativado a 57°C por uma hora. As hemácias foram lavadas duas vezes em meio M199 sem soro fetal bovino, centrifugadas por 8 minutos a 2500 rpm e mantidas no gelo.

**A cultura:** Parasitos *L. (L.) infantum chagasi* foram utilizados em fase logarítmica de crescimento, na concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL nos experimentos de tratamento com antibiótico e  $4 \times 10^6$  nos experimentos de transmissão.

**Sangue e parasitos:** O sangue foi reconstituído com hemácias, plasma, parasitos e 50µg/mL de antibiótico penicilina-estreptomicina (pen-strep).

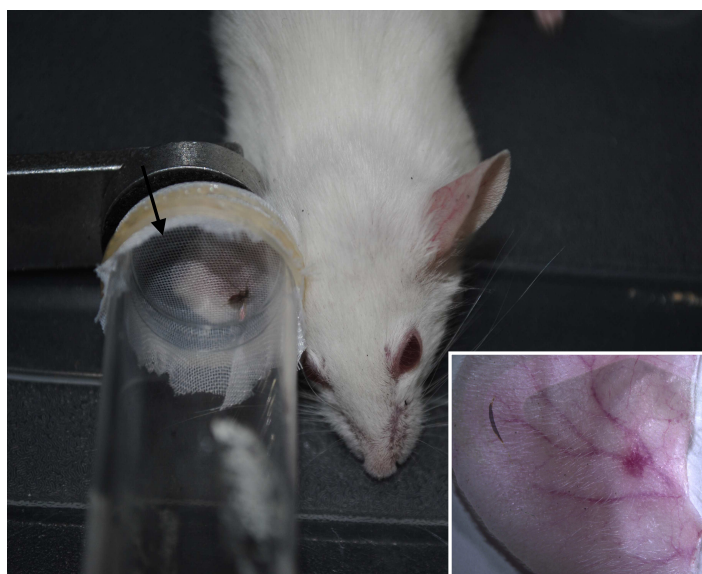
**Insetos:** Aproximadamente 70 fêmeas foram colocadas em recipientes plásticos com fundo de gesso e cobertos com um pedaço de tecido do tipo filó com um orifício central. Nesse orifício do filó um recipiente de vidro com capacidade de 300-500µL, semelhantes a um funil invertido, foi encaixado. A base em contato com o tecido foi coberta com pele de pintinho recém-dissecada e na outra extremidade foi introduzido o sangue. Esse alimentador artificial foi conectado, por finas mangueiras de borracha, a um banho maria a 37°C, tendo sua água bombeada pelas mangueiras. Os flebotomíneos, atraídos pelo odor e temperatura, se alimentaram pela membrana do alimentador por um período de 2 a 5 horas. Após a infecção experimental as fêmeas foram anestesiadas em CO<sub>2</sub>, a fim de separar somente as fêmeas ingurgitadas. Os insetos foram mantidos até o momento da dissecação em dieta de solução de sacarose 50% “*ad libitum*”.

**Grupos experimentais para tratamento com antibiotico** a) pré-tratado: foram previamente tratados com antibiótico carbenicilina ou gentamicina a 2000µg/mL durante cinco dias; b) tratado: foi adicionado ao sangue 50µg/mL de carbenicilina ou gentamicina; além do pen-strep c) controle: o sangue foi reconstituído com hemácias, plasma, parasitos e pen-strep. Os flebotomíneos foram anestesiados em CO<sub>2</sub> e triados em gelo para exclusão de fêmeas já ingurgitadas, com ovos ou de espécies diferentes a *L. longipalpis*. Em cada pote plástico foram colocadas aproximadamente 70 fêmeas. **Análise:** Para a análise do processo de infecção, fêmeas de cada grupo foram anestesiadas no freezer (-20°C) por 5 minutos e colocadas sobre gelo em uma placa de Petri contendo PBS, pH 7.2. O intestino médio foi dissecado em estereoscópio, apoiados em uma lâmina contendo PBS com o auxílio de estiletos. Cada intestino médio foi macerado em um microtubo de 1,5mL contendo 30µL de PBS. A densidade dos parasitos em cada intestino foi determinada através de uma contagem em câmara de Neubauer. O teste estatístico T-Student foi realizado usando o programa GraphPad Prims (Prism 5.01; GraphPad Software Inc.), depois da confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste Shapiro-Wilk.

**Manutenção dos flebotomíneos infectados para os experimentos de transmissão:** Após a infecção experimental, os flebotomíneos foram mantidos em potes de gesso dentro do infectório e em condições de se alimentarem de solução de sacarose 50%. Diariamente, os flebotomíneos mortos foram retirados dos potes.

### 3.7. TRANSMISSÃO DE *L. (L.) infantum chagasi* PELA DA PICADA DO INSETO INFECTADO

**Transmissão:** Dezoito fêmeas de *L. longipalpis* tiveram sua carga parasitária determinada no 2°, 6°, 9°, e 14° dias após a infecção, os flebotomíneos foram transferidos para um pequeno container de acrílico coberto com 0.25-mm membrana de nylon. Camundongos Balb/C (*Mus musculus*) e Hamster (*Mesocricetus auratus*) foram anestesiados e expostos à picada dos insetos infectados dentro do container, por um período de 1-2 horas (Figura 5). Ao final do experimento os animais foram imediatamente sacrificados e as orelhas coletadas para extração de DNA.



**Figura 6:** Experimento de transmissão pela picada. Seta mostrando um *L. longipalpis* confinado no tubo de acrílico se alimentando na orelha do camundongo. Detalhe da orelha onde se pode observar o eritema causado pela da picada.

**Extração do DNA genômico:** As orelhas coletadas foram incubadas separadamente, em 500 µl de tampão de lise e proteinase K (Promega). As amostras foram incubadas a 56°C por 12-16 horas. A proteinase K foi inativada por 10 minutos a 95°C. Em seguida, as amostras foram rapidamente resfriadas em gelo e então foi adicionada uma solução de Acetato de Potássio 1M. As mesmas foram incubados por uma hora em gelo, a fim de precipitar o tampão de lise. As amostras foram então centrifugadas a 16000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 500µl de isopropanol e então, centrifugado durante 10 minutos a 16000 g e em seguida, foi lavado em etanol a 70%, seco a temperatura ambiente. Foram re-suspensos em 100 µl de água tratada

com DEPC. A concentração de DNA para cada amostra foi determinada utilizando o aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

**PCR em tempo real:** Cada amostra de DNA foi processada no aparelho *7500 fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* com os iniciadores e sondas descritos na Tabela 6 além do iniciador/ sonda de RNase P e DNA humano (*Applied Biosystems*), os quais foram usados como controle da eficiência da reação. Os componentes da reação estão descritos na Tabela 7. A quantificação foi determinada através da análise comparativa com a curva padrão. O número de *Leishmania* presente em cada amostra foi determinado pela média dos valores (todas as amostras foram processadas em triplicata). A curva padrão foi preparada com diluição seriada de 10x de uma cultura com uma quantidade conhecida de parasitos em PBS e com o DNA de uma orelha não submetida a picadas de flebotomíneos.

**Tabela 6:** Iniciadores e sonda usados na quantificação absoluta de parasitos por orelha.

Iniciadores/ Sondas	Sequência 5'-3'
<b>U1</b>	AAG TGC TTT CCC ATC GCA ACT
<b>L1</b>	GAC GCA CTA AAC CCC TCC AA
<b>Sonda Leish P1</b>	6FAM-CGG TTC GGT GTG TGG CGC C-TAMRA

**Tabela 7:** Componentes para a reação de quantificação absoluta de PCR em tempo real.

Componentes	Concentração	Volume/reação
Iniciador U1	0,4 µM	0,8 µL
Iniciador L1	0,4 µM	0,8 µL
Probe Leish P1	0,4 µM	0,08 µL
DNA humano	10ng/ µL	1 µL
RNase com sonda		0,75µL
Universal PCR Mastermix	1x	10 µL
MgCl	3mM	1 µL
BSA	0.1 mg/ml	0.4 µL
DNA		1 µL
Água DEPC		4,17µL
<b>Volume final</b>		<b>20 µL</b>

### 3.8. ENSAIO LÍTICO UTILIZANDO *L. (L.) infantum chagasi* E BACTÉRIAS IDENTIFICADAS NO INTESTINO DE *L. longipalpis*

Com a finalidade de avaliar a possível atividade lítica das bactérias sequenciadas proveniente do intestino médio de *L. longipalpis* sobre os parasitos *L. (L.) infantum chagasi*, foi realizada um ensaio *in vitro*.

**Quantificação de bactérias:** A quantidade de bactérias do cultivo foi estimada seguindo a técnica de contagem de UFC por semeadura de diferentes diluições seriadas de 10X em placa de Petri com meio BHI. Essa semeadura foi iniciada de um inóculo (solução estoque) de 10 mL de meio BHI líquido com 500 µL bactéria, previamente isolada e identificada, incubada por 16 horas. Com a diluição de  $10^{-6}$  foi possível fazer a contagem das colônias bacterianas e com isso extrapolar os valores para a quantidade de bactérias necessárias para o ensaio.

**Ensaio lítico:** Em um microtubo contendo 90 µL de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração de  $4 \times 10^6$ , em meio M199 sem soro, foram adicionados 10 µL da cultura na concentração aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC seguindo o protocolo modificado de Moraes (2008). Como controle, 10 µL de meio M199 sem soro foi adicionado aos parasitos em lugar da bactéria. As amostras foram incubadas a 27°C por 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas e 14 horas. A atividade lítica foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer. Os teste estatístico T-Student foi realizado usando o programa GraphPad Prims (Prism 5.01; GraphPad Software Inc.), depois da confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste Shapiro-Wilk.

### 3.9. ANÁLISE DOS AMP'S EM FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL

O RNA de 10 fêmeas de *L. longipalpis* provenientes da Gruta da Lapinha foi extraído de flebotomíneos inteiros, Não alimentado (N) e Pós-digestão (O); e imediatamente foi realizada a síntese de cDNA. Esses flebotomíneos foram separados e macerados, em microtubo plástico de 1,5 mL livre de RNase, com Trizol® (*Invitrogen*) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a extração o RNA foi dosado em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Foi usado uma concentração de 200 µg/mL de RNA para digestão com DNase em um volume total de 8µL, completado com água DEPC quando necessário. Ao RNA foi acrescentado 1µL de Tampão Turbo DNase *Buffer* 10X, 1 µL de Turbo DNase (*Applied Biosystem*). Essa solução incubou por 30 minutos

a 37°C e foi inativada com 1 µL de DNase *Inactivation Reagent* (Applied Biosystem) por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10000 g por um minuto e meio.

Para síntese do cDNA foi usado 10 µL do RNA digerido com DNase, 0,5 µL de iniciador randômico (*Invitrogen*) e 4,5 µL de água DEPC, completando um volume de 15 µL para uma amostra de cada grupo. Essa solução foi incubada por 5 minutos a 70 °C e posteriormente resfriada em gelo também por 5 minutos. Para completar a reação de síntese de cDNA foi adicionado a cada tubo 5 µL de M-MMLV 5X tampão da reação (Promega), 1,5 µL de uma mistura com os dNTPs (*Invitrogen*), 1 µL da enzima M-MLV (Promega) e 17,5 µL de água DEPC e incubado por 60 minutos a 37°C.

A reação de polimerase em cadeia em tempo real comparativa foi realizada no *Applied Biosystems® 7500 fast Real-Time PCR System*, usando *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) para determinação da expressão do gene da Defencina, Gambicina, Cecropina e Atacina (Xi *et al.* 2008), usando como controle constitutivo o gene RP49. Como controle da reação, para cada gene, foi usada água no lugar da amostra. As reações foram feitas de acordo com as Tabela 8 e 9. As sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 10.

**Tabela 8:** Componentes da reação de PCR para sequenciamento do produto de PCR purificado.

Componentes	Concentração	Volume/reação
Iniciador senso	10µM	0,35 µL
Iniciador antisenso	10µM	0,35 µL
cDNA	Diluído 3X	3,0 µL
<i>Syber Green Master Mix</i>		7,5 µL
Água DEPC		3,8 µL
<b>Volume final</b>		<b>15 µL</b>

**Tabela 9:** Condições para a reação de PCR em tempo real.

Temperatura	Tempo	# de ciclos
48°C	10 minutos	1
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	40
60 °C	1 minuto	40



**Tabela 10:** Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaios de reação em cadeia de polimerase em tempo real.

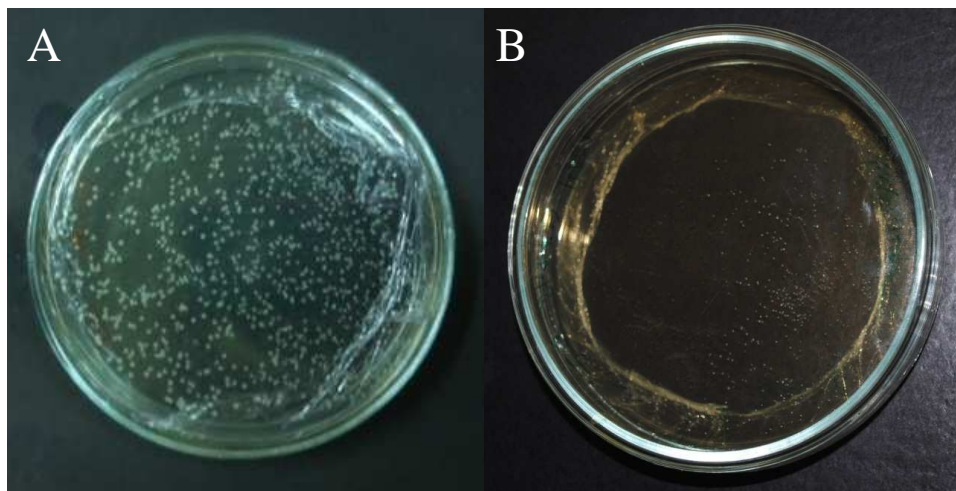
Iniciadores	Sequência 5'-3'
<b>Defensina – F</b>	GAT TCG GCG TTG GTG ATA GT
<b>Defensina – R</b>	TTA TTC AAT TCC GGC AGA CG
<b>Gambicina – F</b>	GCC AAA ACC TGT TCC TCT TG
<b>Gambicina – R</b>	CGA TGT AGC ATT CGG TGA TG
<b>RP49 F</b>	GCT ATG ACA AGC TTG CCC CCA
<b>RP49 R</b>	TCA TCA GCA CCT CCA GCT C
<b>Cecropina F</b>	TCACAAAGTTATTTCTCCTGATCG
<b>Cecropina R</b>	GCTTTAGCCCCAGCTACAAC
<b>Atacina F</b>	TTGGCAGGCACGGAATGTCTTG
<b>Atacina R</b>	TGTTGTCGGGACCGGGAAGTG

Para a análise do método comparativo de expressão gênica foi utilizado o método Delta-DeltaCt (Livak & Schmittgen, 2001). O  $\Delta$ Ct de cada amostra é calculado subtraindo os valores limiares dos ciclos ou CT do controle constitutivo RP49 dos valores do Ct dos genes de interesse. Após a determinação do  $\Delta$ Ct da amostra, escolhe-se a amostra normalizadora que foi o grupo da Lapinha Não alimentado (N). Para o cálculo do  $\Delta\Delta$ Ct é utilizado a seguinte fórmula: [ $\Delta$ Ct (amostra) –  $\Delta$ Ct (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta$ Ct, aplica-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que resulta no valor da expressão relativa.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE *L. longipalpis*

Foram dissecados 15 insetos *L. longipalpis* de cada grupo experimental: Grupo Lapinha (S) - Alimentado, (N) Não alimentado e (O)- Pós digestão; Grupo Jacobina (JM) machos e (JF) - fêmeas. Foi obtido um total de 60 isolados bacterianos provenientes do intestino médio nos diferentes grupos, com exceção do Grupo Jacobina Macho, que não apresentou nenhum crescimento bacteriano. Os isolados foram selecionados de acordo com características das colônias em meio sólido (Figura 6) e características celulares observadas pelo seu exame à fresco em microscópio óptico. Foi possível constatar crescimento de micro-organismos no macerado de Machos da Lapinha, mas esse não foram sequenciados para identificação.



**Figura 7:** Placas de Petri com colônias bacterianas isoladas do intestino de *L. longipalpis*, exemplificando características das colônias. A: apresenta colônias mais esbranquiçadas e granulares. B: apresenta colônias amarelas e densas.

I- Grupo Lapinha Alimentado (S): Foram obtidos 60 isolados sendo 50 desses, leveduras (83%), 15% bacilos, 2% cocos e; sendo 100% Gram negativos (Tabela 11).

**Tabela 9:** Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Alimentado (S). As leveduras não foram apresentadas na tabela.

Isolado	Características da célula	Gram
S1	Bacilo curto	Gram -
S2	Bacilo curto	Gram -
S3	Bacilo curto	Gram -
S4	Bacilo	Gram -
S5	Bacilo curto	Gram -
S6	Bacilo curto	Gram -
S7	Bacilo curto	Gram -
S8	Cocos	Gram -
S9	Bacilo curto	Gram -
S10	Bacilo curto	Gram -

II Grupo Não alimentado (N): Foram obtidos 60 isolados sendo três desses, leveduras 5%; 80% bacilos, 12% cocos e 3% estreptococos; sendo que 86% Gram negativos e 14% Gram positivos (Tabela 12).

**Tabela 10:** Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Não alimentado (N).

Isolado	Características da célula	Gram	Isolados	Característica da célula	Gram
N1	Bacilo	Gram -	N31	Cocos	Gram -
N2	Bacilo	Gram -	N32	Bacilos	Gram -
N3	Bacilo	Gram -	N33	Bacilo	Gram -
N4	Bacilo	Gram -	N34	Bacilo	Gram -
N5	Bacilo	Gram +	N35	Bacilo	Gram -
N6	Bacilo	Gram -	N36	Bacilo curto	Gram -
N7	Levedura		N37	Bacilo	Gram -
N8	Bacilo curto	Gram -	N38	Bacilo curto	Gram -
N9	Levedura		N39	Bacilo	Gram -
N10	Levedura		N40	Bacilo	Gram -
N11	Bacilo	Gram -	N41	Bacilo curto	Gram -
N12	Cocos	Gram +	N42	Cocos	Gram -
N13	Cocos	Gram -	N43	Cocos	Gram -
N14	Bacilo curto	Gram -	N44	Bacilo	Gram -
N15	Bacilo curto	Gram -	N45	Bacilo	Gram -
N16	Bacilo curto	Gram -	N46	Bacilo	Gram -
N17	Bacilo curto	Gram +	N47	Bacilo	Gram -
N18	Bacilo curto	Gram +	N48	Cocos	Gram -
N19	Bacilo curto	Gram -	N49	Bacilo	Gram -
N20	Bacilo curto	Gram +	N50	Bacilo	Gram -
N21	Bacilo curto	Gram -	N51	Bacilo	Gram -
N22	Bacilo curto	Gram -	N52	Bacilo curto	Gram -

N23	Cacos	Gram -	N53	Bacilo	Gram +
N24	Bacilo	Gram -	N54	Bacilo	Gram -
N25	Bacilo	Gram -	N55	Bacilo	Gram -
N26	Bacilo curto	Gram +	N56	Bacilo	Gram -
N27	Estreptococos	Gram-	N57	Bacilo	Gram -
N28	Estreptococos	Gram-	N58	Bacilo	Gram -
N29	Bacilo	Gram -	N59	Bacilo	Gram -
N30	Bacilo curto	Gram +	N60	Bacilo	Gram -

III Grupo Lapinha Pós-digestão (O): dos 60 isolados obtivemos 51% Bacilos, 31,7% cocos e 16,6% estreptococos; sendo que 83,3% Gram negativos e 16,7 Gram positivos (Tabela 13).

**Tabela 11:** Caracterização dos isolados microbianos do grupo Lapinha Pós digestão (O).

Isolado	Características da célula	Gram	Isolados	Característica da célula	Gram
O1	Bacilo móvel	Gram -	O31	Bacilo	Gram -
O2	Bacilo	Gram -	O32	Cocos	Gram -
O3	Bacilo	Gram +	O33	Bacilo	Gram -
O4	Bacilo	Gram -	O34	Cocos	Gram -
O5	Bacilo móvel	Gram -	O35	Bacilo	Gram -
O6	Estreptococos	Gram -	O36	Bacilo curto	Gram -
O7	Cocos	Gram-	O37	Estreptococos	Gram -
O8	Bacilo curto	Gram-	O38	Cocus	Gram -
O9	Estreptococos	Gram-	O39	Bacilo curto	Gram -
O10	Estreptococos	Gram+	O40	Cocos	Gram -
O11	Bacilo curto	Gram-	O41	Bacilo móvel	Gram -
O12	Bacilo curto	Gram-	O42	Cocos	Gram -
O13	Estreptococos	Gram+	O43	Bacilo curto	Gram -
O14	Bacilo curto	Gram-	O44	Cocos	Gram -
O15	Bacilo	Gram-	O45	Cocos	Gram -
O16	Bacilo curto	Gram-	O46	Cocos	Gram -
O17	Bacilo curto	Gram-	O47	Cocos	Gram -
O18	Cacos	Gram-	O48	Cocos	Gram -
O19	Estreptococos	Gram +	O49	Bacilo móvel	Gram -
O20	Estreptococos	Gram +	O50	Cocos	Gram -
O21	Estreptococos	Gram +	O51	Cocos	Gram -
O22	Bacilo curto	Gram -	O52	Bacilo curto	Gram +
O23	Bacilo curto	Gram -	O53	Estreptococos	Gram +
O24	Bacilo curto	Gram -	O54	Cocos	Gram -
O25	Bacilo curto	Gram -	O55	Cocos	Gram -
O26	Bacilo curto	Gram -	O56	Cocos	Gram -
O27	Bacilo curto	Gram -	O57	Bacilo curto	Gram -

<b>O28</b>	Bacilo	Gram -	<b>O58</b>	Bacilo	Gram -
<b>O29</b>	Estreptococos	Gram +	<b>O59</b>	Cocos	Gram -
<b>O30</b>	Bacilo curto	Gram -	<b>O60</b>	Cocos	Gram-

IV - Os grupos de isolados de bactérias dos flebotomíneos provenientes de Jacobina foram: macho (JM) e fêmeas (JF). O grupo de Machos não apresentou nenhum crescimento bacteriano após 48h. Do grupo de fêmeas foram isolados e caracterizados 60 bactérias dos quais, (83%) bacilo, 9% cocos e 1% estafilococos; sendo que 97% Gram negativas e 3% Gram positivas (Tabela 14).

**Tabela 12:** Caracterização dos isolados microbianos do grupo Jacobina fêmea (JF).

<b>Isolado</b>	<b>Características da célula</b>	<b>Gram</b>	<b>Isolados</b>	<b>Característica da célula</b>	<b>Gram</b>
<b>JF1</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF31</b>	Cocos	Gram -
<b>JF2</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF32</b>	Cocos	Gram -
<b>JF3</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF33</b>	Cocos	Gram -
<b>JF4</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF34</b>	Cocos	Gram -
<b>JF5</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF35</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF6</b>	Bacilos longos	Gram -	<b>JF36</b>	Bacilo	Gram +
<b>JF7</b>	Bacilos longos	Gram -	<b>JF37</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF8</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF38</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF9</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF39</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF10</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF40</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF11</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF41</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF12</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF42</b>	Bacilo	Gram-
<b>JF13</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF43</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF14</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF44</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF15</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF45</b>	Cocos	Gram -
<b>JF16</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF46</b>	Cocos	Gram -
<b>JF17</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF47</b>	Cocos	Gram -
<b>JF18</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF48</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF19</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF49</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF20</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF50</b>	Cocos	Gram -
<b>JF21</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF51</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF22</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF52</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF23</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF53</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF24</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF54</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF25</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF55</b>	Bacilo	Gram -
<b>JF26</b>	Bacilo longo	Gram -	<b>JF56</b>	Bacilo curto	Gram -
<b>JF27</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF57</b>	Cocos	Gram -
<b>JF28</b>	Bacilo	Gram -	<b>JF58</b>	Estafilococos	Gram +
<b>JF29</b>	Bacilo curto	Gram -	<b>JF59</b>	Bacilo curto	Gram -
<b>JF30</b>	Bacilo curto	Gram -	<b>JF60</b>	Bacilo curto	Gram -

**Resumo da análise morfológica nos diferentes grupos experimentais:** Foram analisados 240 isolados provenientes de quatro grupos distintos. Sendo que a maioria analisada, 138 isolados, apresentou formas tipo bacilo representando 57% das formas observadas; entretanto foram também descritos cocos 15%, estreptococos 5% e estafilococos 04%. A forma estreptococo foi observada nos grupos Lapinha Pós digestão (O) e Lapinha Não alimentado (N) e estafilococo somente no grupo Jacobina fêmea (JF), (Tabela 15 )

**Tabela 13:** Distribuição das formas celulares por grupos de análise.

Grupos	Bacilos	Cocos	Estreptococos	Estafilococos	Levedura	Total
Lapinha Alimentado	9(15%)	1(2%)	0(0%)	0(0%)	50(83%)	60
Lapinha Não Alimentado	48(80%)	7(12%)	2(3%)	0(0%)	3(5%)	60
Lapinha Pós digestão	31(51,7%)	19(31,7%)	10(16,6%)	0(0%)	0(0%)	60
Jacobina Fêmea	50(83%)	9(15%)	0(0%)	1(2%)	0(0%)	60
<b>Total</b>	<b>138(57,5%)</b>	<b>36(15%)</b>	<b>12(5%)</b>	<b>1(0,4%)</b>	<b>53(22,1%)</b>	<b>240</b>

**Resumo da coloração de Gram nos diferentes grupos experimentais:** Foram analisados 187 isolados provenientes dos quatro grupos distintos. Dentre a maioria analisada, 168 isolados foram Gram negativas e 19 Gram positivas (Tabela 16). As bactérias Gram negativas representam 90% dos isolados analisados, sendo a menor porcentagem encontrada a de 85% no grupo Pós digestão. As bactérias Gram positivas representaram um máximo de 15% das populações bacterianas analisadas.

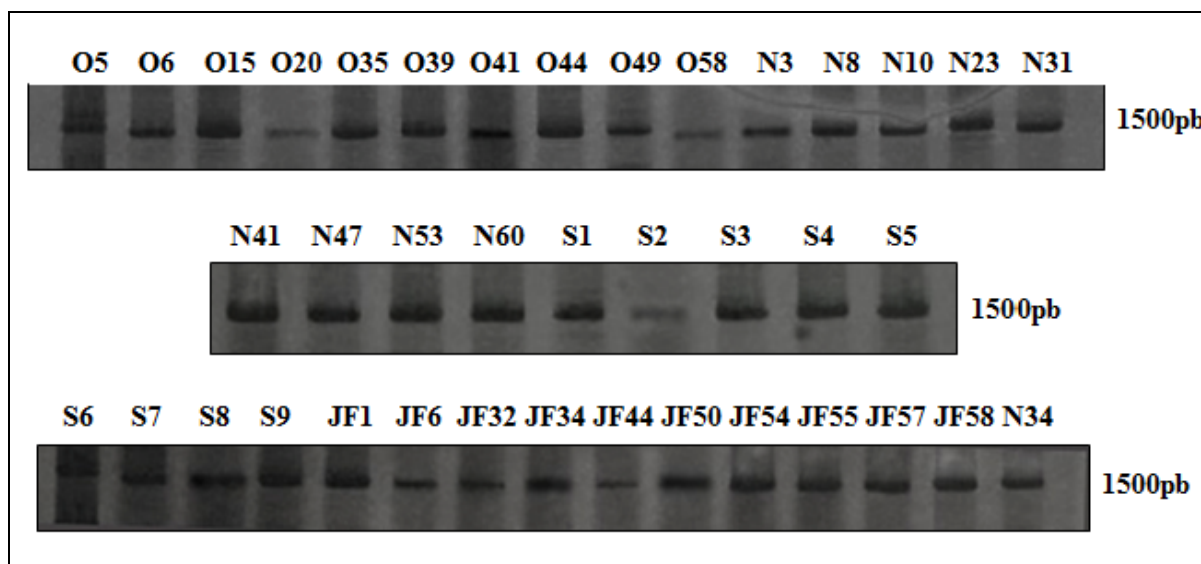
**Tabela 14:** Distribuição de bactérias Gram negativas ou positivas nos isolados de cada grupo de intestino analisado.

Grupos	Gram +	Gram -	Total
Lapinha Alimentado	0(0%)	10(100%)	<b>10</b>
Lapinha Não alimentado	8(14%)	49(86%)	<b>57</b>
Lapinha Pós digestão	9(15%)	51(85%)	<b>60</b>
Jacobina Fêmea	2(3%)	58(97%)	<b>60</b>
<b>Total</b>	<b>19(10%)</b>	<b>168(90%)</b>	<b>187</b>

#### 4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

De um total de 240 isolados, 100 foram escolhidos aleatoriamente e submetidos a PCR e visualizado em gel de poliacrilamida. Desses, 39 foram escolhidos, para serem

sequenciados. Diferentes padrões morfológicos, pureza do DNA e intensidade das bandas (visualizadas no gel de poliacrilamida) foram os critérios para escolha (Figura 7). Dos isolados bacterianos sequenciados, 9 pertencem ao grupo ao Grupo Lapinha Alimentado (S), 10 ao grupo Lapinha Não alimentado (N), 10 ao grupo Lapinha Pós digestão (O), e 10 ao grupo Jacobina Fêmea (JF).



**Figura 8:** Gel de poliacrilamida 0,8%, revelando a banda de 1500pb do gene 16S alvo para sequenciamento.

**Sequenciamento:** As 39 amostras escolhidas foram enviadas para sequenciamento. Dessas amostras, 6 apresentaram similaridade de alinhamento com as sequências de nucleotídeos do GenBank. Foram obtidas zero sequências correspondentes no grupo Lapinha Alimentado (S), 2 sequências no grupo Lapinha Não alimentado (N), 3 sequências no grupo Lapinha Pós digestão (O) e 2 sequências no grupo Jacobina Fêmeas. Os resultados obtidos do sequenciamento foram de baixa qualidade, o que impossibilitou o uso das outras sequências.

Dentre as sete sequências homologas encontramos dois gêneros de bactérias, o gênero *Providencia* e o gênero *Acinetobacter*. O grupo Lapinha (Não alimentado e Pós digestão) apresentou representantes do gênero *Providencia*. Entretanto as bactérias do Gênero *Providencia* não foram identificadas em nível de espécie. No grupo Jacobina Fêmea foi encontrado o gênero *Acinetobacter*, que está representado pela espécie *Acinetobacter soli*. (Tabela 17).

**Tabela 15:** Isolados bacterianos que apresentaram similaridade com sequencias depositadas no GenBank.

Isolados	# de acesso	Descrição	Máxima cobertura	Máxima identidade
O5	JN425074.1	<i>Providencia sp.</i>	99%	95%
O41	JF766697.1	<i>Providencia sp.</i>	100%	94%
O49	JF766697.1	<i>Providencia sp.</i>	98%	94%
N11	AB680339.1	<i>Providencia sp.</i>	99%	94%
N31	HM133593.1	<i>Providencia sp.</i>	99%	94%
JF44	JN644600.1	<i>Acinetobacter soli</i>	99%	100%
JF54	JF732751.1	<i>Acinetobacter soli</i>	97%	100%

### 4.3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS

#### 4.3.1. Carbenicilina

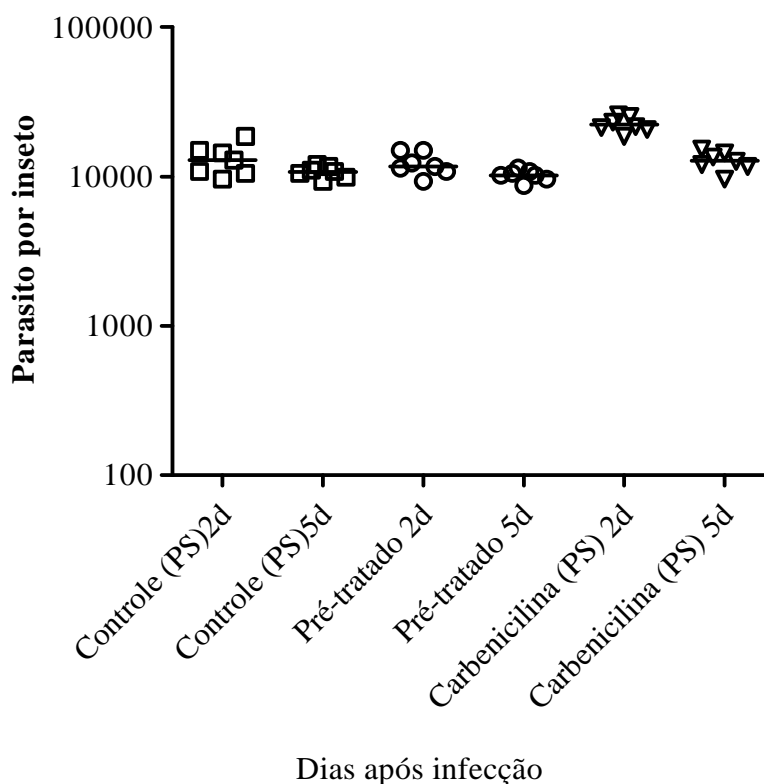
Para avaliar o impacto da microbiota natural do *L. longipalpis* na capacidade do parasito *L. (L.) Infantum chagasi* em estabelecer a infecção, os insetos foram tratados com antibiótico.

O total de 350 fêmeas de flebotomíneos foram, por experimento colocadas para alimentar, sendo que cerca de 90% dessas fêmeas ingurgitaram. Quarenta e oito horas após a infecção experimental, 100% dos flebotomíneos apresentaram promastigotas viáveis, com uma média de 10.000 promastigotas por intestino médio. Ao quinto dias pós-infecção, foi possível observar a manutenção da infecção. Foi analisado o efeito do tratamento com antibiótico carbenicilina da seguinte forma:

a) grupo pré-tratado (recebeu antibiótico por 5 dias antes da infecção experimental), b) tratado (recebeu antibiótico no momento da infecção experimental) e c) controle (nenhum tratamento). O grupo pré-tratado não apresentou diferenças no desenvolvimento dos parasitos quando comparado ao grupo controle. Com média de 10.000 parasitos viáveis nos dois dias de observação. O grupo tratado demonstrou que a adição do antibiótico proporcionou um maior crescimento dos parasitos nas primeiras 48 horas. Com média de 25.000 parasitos viáveis ( $P < 0,0001$ ). A análise no 5º dia demonstrou uma pequena queda ( $- + 50\% = 12.000$ ) quando comparado ao segundo dia, porém, quando comparado ao controle foi possível observar um leve efeito cumulativo da ação do tratamento com antibiótico ( $P = 0.0287$ ), (Figura 8).



**Quantidade de parasitos no intestino médio de flebotomíneos após infecção e tratado com Carbenicilina**



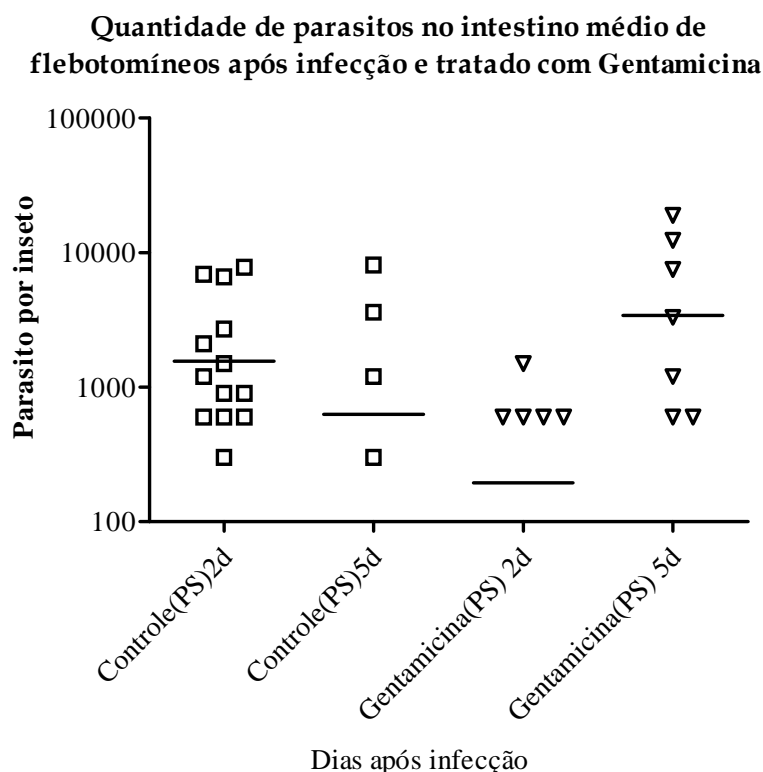
**Figura 9:** Densidade de parasitos no intestino médio de *L. longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi* e tratado com antibiótico Carbenicilina no segundo e quinto dia após infecção experimental.

#### 4.3.2. Gentamicina

Um total de 240 flebotomíneos foram utilizados por experimento, sendo que cerca de 90% dessas fêmeas foram ingurgitadas. Quarenta e oito horas após a infecção experimental, 100% dos flebotomíneos foram positivos para promastigotas viáveis, apresentando o grupo controle uma média de 2.000 promastigotas por intestino médio. Aos cinco dias pós-infecção, foi possível observar a manutenção da infecção. Foi analisado o efeito do tratamento com antibiótico gentamicina da seguinte forma: a) tratado (recebeu antibiótico no momento da infecção experimental) e b) controle (nenhum tratamento).

Os flebotomíneos infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e tratados com o antibiótico gentamicina apresentaram uma densidade de parasitos bem diferente do grupo controle, com

um menor índice de infecção no 2º dia ( $P < 0,05$ ), mas foram capazes de se estabelecer no intestino após a excreção do bolo fecal, porém, não apresentando diferença significativa.



**Figura 10:** Densidade de parasitos no intestino médio de *L. longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi* e tratado com antibiótico gentamicina no 2º e 5º dia após infecção experimental.

### O efeito do tratamento na digestão sanguínea

No segundo dia após a infecção experimental e o tratamento com os antibióticos Carbenicilina e Gentamicina, foi possível observar, no intestino médio dissecado, a presença de inúmeras hemácias, quando-comparado ao grupo controle que somente apresentou restos celulares.

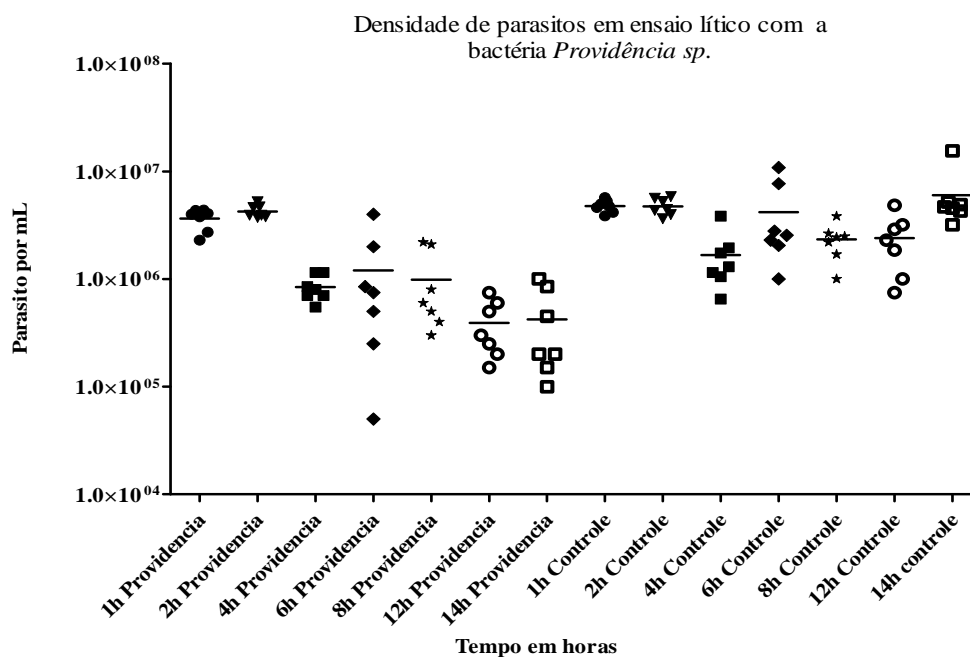
#### 4.4. ENSAIO LÍTICO UTILIZANDO *L. (L.) infantum chagasi* E BACTÉRIAS IDENTIFICADAS NO INTESTINO DE *L. Longipalpis*

Foi avaliado a papel das bactérias isoladas do intestino médio do *L. longipalpis* na capacidade de inibir ou não a multiplicação do parasito *L. (L.) Infantum chagasi*. **Contagem:** A bactéria *Acinetobacter soli* apresentou um crescimento similar ao crescimento da bactéria

*Providência sp.* como encontrado na quantificação bacteriana para o ensaio lítico. Ambas tiveram  $1 \times 10^8$  UFC após 16 horas de crescimento de um inóculo diluído  $10^{-6}$  vezes. Apesar desse crescimento semelhante, durante a análise de lise, foi possível visualizar uma diferença entre o número de bactérias dos dois grupos. No grupo incubado com bactérias do gênero *Providência* foi notada uma presença maior de bactérias durante a contagem dos parasitos no hemocitometro.

4.4.1. *Providencia sp.* (grupo Gruta da Lapinha)

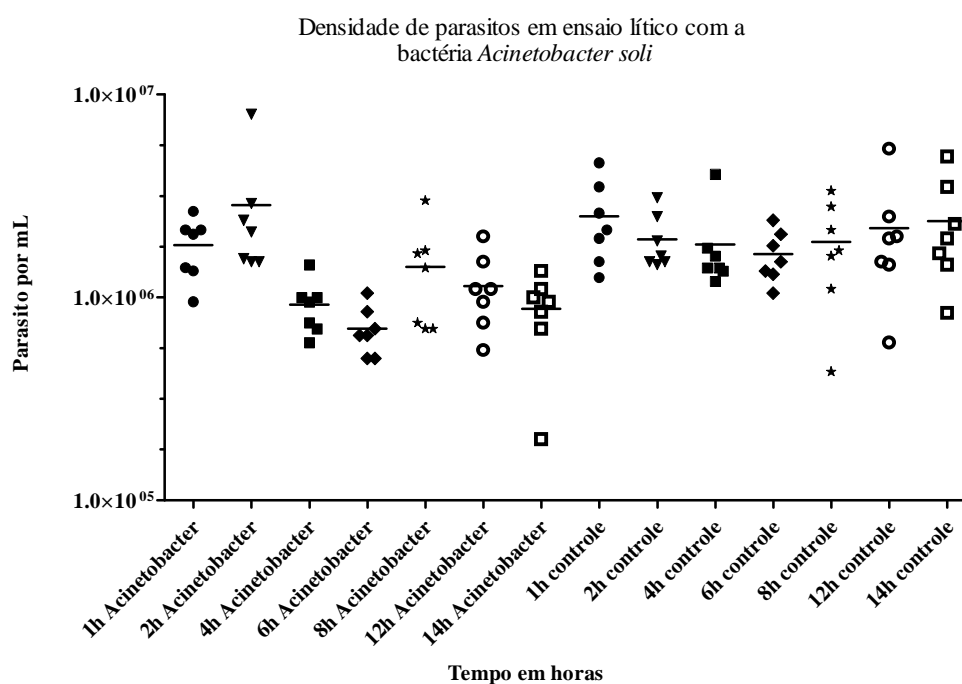
O ensaio lítico demonstrou que a bactéria foi capaz de inibir a multiplicação do parasito apresentando uma leve mortalidade após uma hora de incubação em relação ao controle (P= 0.0141). Nos tempos subsequentes foi possível observar a manutenção do efeito lítico da bactéria no parasito sendo que 12hs uma efeito lítico de aproximadamente 75% (P=0.0028) (Figura 10). Também foi observado um grande número de parasitos arredondados, após 8 horas de interação de *Leishmania* com a bactéria do gênero *Providência*.



**Figura 11:** Efeito da incubação de *L. (L.) infantum chagasi* com uma bactéria do gênero *Providencia*, isolada do intestino médio de *L. Longipalpis* da Gruta da Lapinha.

4.4.2. *Acinetobacter soli* (Grupo Jacobina Fêmea)

Nossos resultados demonstraram que a bactéria foi capaz de inibir a multiplicação do parasito apresentando uma leve mortalidade com uma hora de incubação, e uma significativa queda a partir de 4 horas de incubação ( $P=0.0406$ ). Nos tempos subsequentes foi possível observar a manutenção do efeito lítico da bactéria no parasito sendo que de 4 a 6 horas foi visto um efeito lítico de cerca de 50% ( $P=0.0004$ ) (Figura 11).



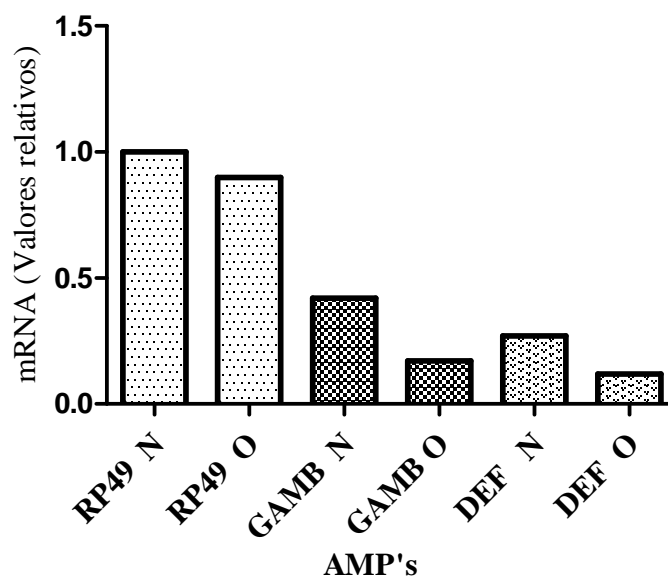
**Figura 12:** Efeito da incubação de *L. (L.) infantum chagasi* com uma bactéria do gênero *Acinetobacter*, isolada do intestino médio de *L. Longipalpis* de Jacobina.

#### 4.5. ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) EM FLEBOTOMÍNEOS UTILIZANDO REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL

Os seguintes AMP's foram analisados: atacina, cecropina, gambicina e defensina. Dos AMP's analisados gambicina e defensina foram os que apresentaram diferenças entre os grupos analisados. A gambicina foi mais expressa no grupo Gruta da Lapinha Não alimentado (N), usado como referência nas análises. A defensina também apresentou uma maior expressão nesse grupo, mas em uma diferença menor entre eles (Figura 12). Para esses dois peptídeos o experimento foi feito em duplicata. Esse gráfico é a análise de um dos

experimentos, que apresentou a melhor relação com o gene de referência, que foi de mosquitos *A. aegypti*, assim como todos os outros iniciadores dos peptídeos. Outro gene de referência de *A. aegypti* foi testato, o S7, não apresentando um resultado comparável entre os grupos experimentais.

#### Níveis de AMP's nos grupos de análise de flebotomíneos



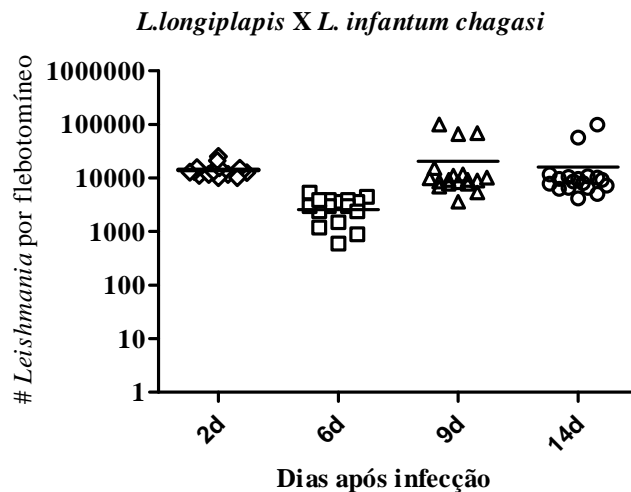
**Figura 13:** Valor relativo da expressão de AMP's em *L. longiplpis* da Gruta da Lapinha Alimentados e Não alimentados.

Atacina e cecropina não apresentaram variações nos dois grupos analisados. A atacina apresentou baixo índice de expressão, com início de replicação em ciclos tardios, por isso o seu resultado foi desconsiderado no gráfico. A cecropina também apresentou replicação em ciclos tardios.

#### 4.6. TRANSMISSÃO DE *L. (L.) infantum chagasi* ATRAVÉS DA PICADA DO INSETO INFECTADO

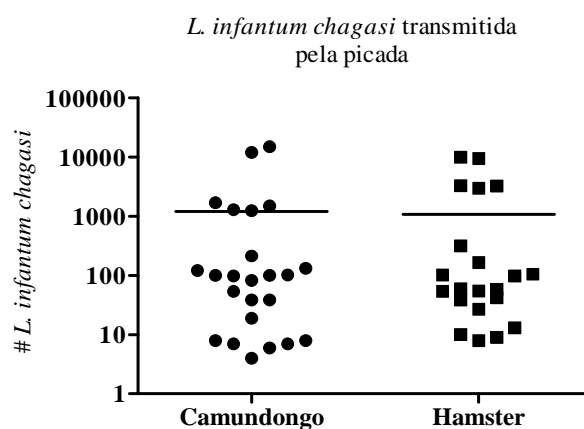
Foram utilizadas 800 fêmeas no processo de infecção experimental. Um total de 640 fêmeas ingeriram sangue infectado contendo promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Um grupo de 300 flebotomíneos foram dissecados e avaliados até 14 dias após a infecção. Quarenta e oito horas após o repasto, 100% dos flebotomíneos apresentaram promastigotas viáveis, uma média de 14 mil promastigotas por intestino médio. Seis dias após o repasto

sanguíneo houve uma redução de aproximadamente 70% no crescimento e sobrevivência do parasito ( $P = 0,0001$ ), com média de infecção de 3000 parasitos por flebotomíneo. Essa queda se deve ao processo de digestão. Entre o 9º a 14º dias pós-infecção, foi possível observar no flebotomíneo com uma média de 15 mil promastigotas por intestino médio (Figura 13).



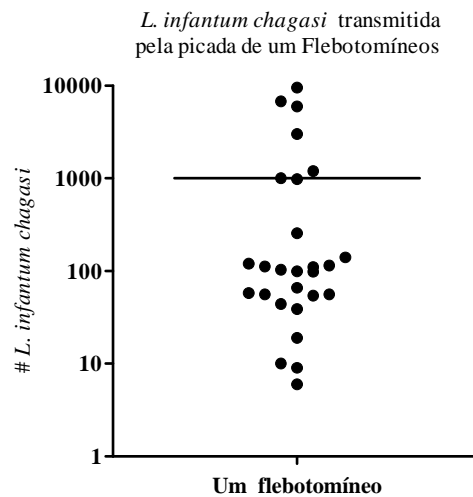
**Figura 14:** Densidade de parasitos no intestino médio de *L. longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi* do 2º ao 14º dia após a infecção experimental.

A carga parasitária transmitida durante a picada em orelhas de camundongos variou de 4 a 15 mil (média: 1.255), e em Hamster variou de 8 a 10.000 (média: 1.122). Não houve diferença significativa no número de parasitos transmitidos por picada nos dois modelos, sugerindo os dois animais experimentais possam ser usados como modelo para o estudo da transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 14).



**Figura 15:** Densidade de parasitos encontrados na orelha de camundongos Balb/C e Hamster por análise quantitativa absoluta de PCR em tempo real.

Foi utilizado um único inseto com intuito de quantificar a transmissão pela picada. O modelo experimental escolhido foi camundongo Balb/c e foram utilizadas (n = 30 orelhas). A quantificação foi detectada através do PCR em tempo real e obtivemos 27 orelhas positivas. As três amostras negativas também não mostraram nenhum sinal de picada. Nas orelhas infectadas, a quantificação mostrou que a carga transmitida pela picada variou de 6 a 10.000 (média: 1002). Finalmente, foi determinado que 93% dos flebotomíneos transmitiram durante a picada (Figura 15).



**Figura 16:** Densidade de parasitos encontrados na orelha de camundongos Balb/C expostos à picada de um único flebotomíneo, por análise absoluta de PCR em tempo real.

---

## 5. DISCUSSÃO

Os insetos vetores podem ingerir parasitos pela alimentação. Durante o estabelecimento da infecção os tecidos ou órgãos do inseto respondem a essa invasão, podendo levar a redução parasitária e até a perda da infecção. Diferentes fatores podem ser responsáveis por essa redução. O papel de micro-organismos naturais tem sido investigado no desenvolvimento desses parasitos no vetor, podendo contribuir para a modulação da competência vetorial.

Os estudos visando caracterizar a microbiota intestinal de flebotomíneos têm encontrado uma maior quantidade de bacilos Gram negativos em diferentes espécies e localidades, como em *L. longipalpis* proveniente da Gruta da Lapinha (Oliveira *et al.*, 2000, 2001, McCarthy *et al.*, 2011), e da Argentina (McCarthy *et al.*, 2011), *P. papatasi* de duas regiões do Egito (Dillon *et al.*, 1996), e do Senegal (Volf *et al.*, 2002). Esses dados estão de acordo com os valores encontrados nesse trabalho, o qual obteve, como maioria dos isolados, bacilos Gram negativos 57% do total, sendo que, apenas o grupo Lapinha Alimentado apresentou maior número de leveduras. Schlein e colaboradores (1985) encontraram também uma grande quantidade de leveduras em *P. papatasi* do Oriente Médio e *P. tobbi* da Grecia, usando métodos de fixação e coloração do intestino inteiro para observação em microscópio.

As bactérias do gênero *Acinetobacter* já foram identificadas por métodos de cultivo em fêmeas de *L. longipalpis* alimentados e não alimentados da Gruta da Lapinha (Oliveira *et al.*, 2000, 2001), de Jacobina e do Maranhão (Gouveia *et al.*, 2008) e por métodos de metagenômica em machos da Gruta da Lapinha (McCarthy *et al.*, 2011). Dois isolados do grupo Jacobina Fêmea foram identificados como *Acinetobacter soli* com identidade de 100% e 94%, assim como Gouveia e colaboradores (2008) identificaram por métodos bioquímicos. Além de ter sido encontrada em diversos estudos da microbiota de *L. longipalpis*, bactérias desse gênero também estão presentes no ambiente e já foram descritas no intestino de outros insetos (La Scola & Raoult 2004, Zayed & Bream 2004), não sendo possível ainda afirmar se é uma bactéria indígena ou transitória em flebotomíneos.

A família Enterobacteriaceae parece ser a mais abundante em flebotomíneos (Dillon *et al.*, 1996, Volf *et al.*, 2002) e também é amplamente encontrada em mosquitos (DeMaio *et al.*, 1996; Pumpuni *et al.*, 1996). Essa família foi representada por identificação das sequências nos nossos grupos experimentais pelo gênero *Providência*. Três isolados do grupo Lapinha Pós-digestão e 2 isolados do grupo Lapinha Não alimentado foram identificados como *Providência sp.* Esse gênero já foi relatado em moscas (*Musca domestica*), cinco espécies usando métodos de identificação bacteriana de cultivo e uma usando um método não



cultivável (Gupta *et al.*, 2012). O gênero em questão apresenta dificuldades de classificação quando usada caracterização bioquímica, pois aparecem várias divergências e diferentes critérios de classificação dependendo do autor (Penner, 1992; Pignato *et al.*, 1999). Esse fato pode explicar a ausência desse gênero em outros trabalhos, já que a grande maioria realiza testes bioquímicos para identificação. As espécies da família Enterobacteraceae se desenvolvem rapidamente, podendo dificultar o crescimento de outras espécies no mesmo meio (Dillon *et al.*, 1996), o que explicaria a sua dominância na maioria dos estudos.

Nós ainda identificamos 2% de *Staphylococcus* no grupo experimental Jacobina Fêmea, essa identificação foi feita por caracterização celular. Oliveira e colaboradores (2000) encontraram 28% de bactérias do intestino de *L. longipalpis* da Lapinha desse gênero. Essa grande diferença na microbiota encontrada em todos os trabalhos já realizados, inclusive com insetos da mesma localidade, pode ser explicada pela diversidade de fontes alimentares dos flebotomíneos.

Em um trabalho de metagenômica de *L. longipalpis* usando pirosequenciamento, (McCarthy *et al.*, 2011), bactérias e fungos não foram identificadas em Macho da localidade de Posadas, na Argentina, uma região endêmica para LV, o que corrobora com nossos achados para *L. longipalpis* Jacobina Macho. No mesmo trabalho os autores, utilizando espécimes da Gruta da Lapinha, identificaram bactérias e fungos em fêmeas e machos. Apesar de não termos identificado a microbiota de machos da Lapinha, foi possível detectar crescimento de micro-organismos após 18 horas de incubação.

Em nosso trabalho usamos métodos dependentes de cultivo para a identificação da microbiota. Sabemos que apenas aproximadamente 1% das bactérias já descritas são cultiváveis (Amann *et al.*, 1995). Essa metodologia nos parece eficiente pois outros estudos realizados com insetos, inclusive usando métodos não-cultiváveis de identificação apresentaram baixa variedade de espécies (Demaio *et al.*, 1996, Oliveira *et al.*, 2000, 2001, Gouveia *et al.*, 2008, Gusmão *et al.*, 2010, McCarthy *et al.*, 2011). Além disso, os isolados bacterianos são fundamentais para os estudos de interação vetor/*Leishmania*. As técnicas de identificação por métodos não cultiváveis não nos permitem obter os isolados. Dessa forma não poderíamos inferir o papel biológico ou fisiológico dessas bactérias.

Pouco é sabido sobre o papel de micro-organismos em vetores e estudos da interação entre flebotomíneos e *Leishmania* têm sido feitos, em geral, tentando entender os mecanismos de escape do parasito às barreiras encontradas durante o seu desenvolvimento. Não se sabe se os micro-organismos presentes no intestino de inseto podem se apresentar como uma barreira ou um facilitador à infecção por *Leishmania*. Moraes e colaboradores (2008, 2009) demonstraram que diferentes cepas de *Serratia marcescens*, uma bactéria descrita no intestino

de *L. longipalpis* da Gruta da lapinha (Oliveira *et al.*, 2000; 2001), apresentam interações diferentes com o parasito. Uma provoca lise celular em *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis* quando incubada *in vitro* enquanto outra cepa não afeta em nada o parasito nas mesmas condições. Entretanto, as bactérias utilizadas no trabalho já foram descritas para *L. longipalpis*, mas não foram isoladas do mesmo. Essa diferença nos resultados com diferentes cepas de bactérias demonstram a importância do uso de bactérias isoladas diretamente da população de insetos a serem estudados. Nós demonstramos que houve uma lise de células de *L. (L.) infantum chagasi* por duas bactérias isoladas do intestino de *L. longipalpis* da Gruta da Lapinha e de Jacobina, *Providencia sp* e *Acinetobacter soli*. Apresentando queda de 75% e 50% respectivamente, no número de Leishmanias em relação ao controle e ainda células bem arredondadas após 8 horas de incubação, podendo significar morte celular, apesar não terem sido realizados experimentos comprovatórios. Schlein e colaboradores (1985) e Dillon e colaboradores (1996) sugerem que como no meio de cultivo as bactérias interferem no desenvolvimento do parasito, isso também deve ocorrer no intestino do flebotomíneo, pela relação de competição entre eles. A partir dos nossos resultados no ensaio lítico podemos sugerir também que além da bactéria afetar o parasito, esse pode interferir no crescimento de uma espécie de bactéria e não em outra. Foi visto que para a espécie do gênero *Acinetobacter* uma menor quantidade de bactérias era encontrada na contagem dos parasitos, podendo representar uma ação do parasito sobre a bactéria.

Schlein e o seu grupo (1985) tentaram demonstrar o efeito das bactérias sobre os flebotomíneos usando *P. papatasi* de um grupo de insetos em que já havia sido descrito fungos e bactérias. Os insetos foram dissecados 4 dias após a infecção experimental com *L. major* e não apresentaram parasitos no trato digestivo, que continha fungos e bactérias. Entretanto nos nossos resultados encontramos o grupo *Acinetobacter* em uma população de *L. longipalpis* de área endêmica para LV, Jacobina. O ensaio *in vitro* demonstrou que essa bactéria é capaz de afetar o parasito, mas também demonstra uma ação sinérgica, o que pode sugerir que essa bactéria não interfere no desenvolvimento e transmissão do parasito. Apesar de um possível efeito da bactéria no crescimento do parasito, nós vimos também que com a retirada algumas bactérias do intestino dos flebotomíneos, usando antibióticos de espectro para Gram negativos em geral (Gentamicina) e para bacilos Gram negativos (Carbenicilina), há um maior número de parasitos capazes de se estabelecer no intestino após a infecção. O grupo tratado com Gentamicina apresentou primeiramente uma diminuição no número de parasitos no segundo dia, devido ao efeito do antibiótico, mas no quinto dia esse número aumenta, apesar de não apresentar diferença significativa entre o controle. O grupo tratado para o tipo mais abundante de bactérias encontradas no intestino de flebotomíneos, Bacilos

Gram negativos, apresentou um aumento no número de parasitos no trato digestivo após o quinto dia, mostrando assim um desenvolvimento eficiente para manter a infecção. Dillon e colaboradores (1996) constataram que *P. papatasi*, que apresentaram bactérias intestinais previamente visualizadas no grupo de análise, também se infectavam com *Leishmania*. Apesar de não ter sido demonstrado para flebotomíneos se a microbiota interfere na capacidade de infecção da *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado, alguns estudos com mosquito reforçam essa ideia. Para insetos do gênero *Anopheles* foi visto que a microbiota diminui a infecção por *Plasmodium*, por estimular o sistema imune do vetor ajudando no combate a infecção pelo protozoário. (Dong *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010).

Durante nossas observações foi possível avaliar que o tratamento com antibióticos retarda a digestão sanguínea, 48 horas após a infecção foi possível encontrar muitas hemácias no trato digestório dos insetos dissecados, o que também foi visto em *Aedes aegypti* (Gusmão *et al.*, 2010 e Gaio *et al.*, 2011). A digestão sanguínea em flebotomíneos ocorre de 24 a 48 horas após a ingestão sanguínea (Borovsky & Schlein, 1987; Dillon & Lane, 1993; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2003).

Apesar da diversidade de bactérias já descritas em flebotomíneos ainda não somos capazes de entender qual o papel apresentam no inseto. O postulado de Schlein (1985) indica que o divertículo apresenta uma ação bactericida, o que não foi verificado por nós, pois em alguns grupos de insetos mesmo provenientes da mesma localidade foram encontradas diferentes espécies de bactérias. Essa flutuação na microbiota pode também estar associada aos hábitos alimentares desses insetos na fase imatura (Volf *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2000, 2001).

A imunidade do intestino apresenta um grande papel no controle da infecção do vetor por parasitos e micro-organismos. Boulanger e colaboradores (2004) identificaram uma defensina *P. duboscqi* que se assemelha 76% à defensina de *A. aegypti*. Em 2009, Pitaluga e seu grupo também identificou uma defensina em *L. longipalpis*. Para tentar avaliar uma resposta por AMP's ao evento de alimentação, nós quantificamos a expressão de AMPs em *L. longipalpis* Lapinha Não alimentado (N) e Pós-digestão (O), pois a microbiota intestinal dos insetos varia de acordo com suas fases de vida. Sabemos que a vitelogenina tem sua expressão aumentada para a maturação dos ovócitos em insetos e quando isso acontece a produção de moléculas do sistema imune são menos expressas (Raikhel, 1992; Hoffmann *et al.*, 1992). Nos nossos dados, o grupo Lapinha Pós-digestão (O) apresentou uma menor expressão para defensina e gambicina que o grupo Lapinha Não alimentado (N). Como nesse grupo podemos encontrar ovócitos maduros na região abdominal é mesmo esperado que sua expressão de AMPs seja menor.

---

A fim de estabelecer, pela primeira vez, em laboratório na América Latina, um modelo de transmissão natural pela picada, nós utilizamos *L. longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi*. Inicialmente foram avaliados hamster e camundongo B6C/C como hospedeiros experimentais. Concluímos que não há diferença significativa entre esses dois animais. Os dois animais foram picados, por insetos infectados e o número de parasitos ejetados nas orelhas foram semelhantes, demonstrando que como modelo de transmissão natural ambos podem ser considerados para a infecção laboratorial. Nossos resultados mostraram que a dose, número de parasitos, ejetados na orelha do animal experimental por um único *L. longipalpis* pode variar de 4 a 10.000 parasitos, com média de 1.002. Esses números são semelhantes aos descritos por Warburg e colaboradores (1986) utilizando o par *P. papatasi* e *L.(L.) major* através do método de regurgitação em micro capilar e Rogers e colaboradores (2004) utilizando um modelo experimental com o par não natural, *L. longipalpis* com *L. mexicana* através do método de regurgitação em alimentador artificial. No entanto, quando comparamos nossos resultados com os da Kimblin (2008) utilizando o par *L. (L.) major* com *P. duboscqi*, em que um único inseto pode injetar até 100.000 parasitos, mas com a maioria transmitindo cerca de 600 parasitos, podemos concluir que o nosso modelo de transmissão natural utilizando *L. longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi* não foi capaz de transmitir o mesmo número de parasitos como flebotomíneos do Velho Mundo. As doses transmitidas pelo *L. longipalpis* foram muito baixas quando comparada a *P. duboscqi* e cerca de 75% deles transmitiu menos de 300 parasitos. Apenas poucos insetos foram capazes de transmitir uma dose de cerca de 10.000 sendo essa ainda 10 vezes menor que a encontrada para *P. duboscqi*.

---

## 6. CONCLUSÕES

- I – A bactéria *Providência sp.* foi identificada pela primeira vez em flebotomíneos.
- II- As bactérias *Acinobacter soli* e *Providencia sp.* apresentaram atividade lítica sobre *L. (L.) infantum chagasi in vitro* com atividade ótima uma e quatro horas respectivamente.
- III- Flebotomíneos pré-tratados com Carbenicilina e infectados com *L. (L.) infantum chagasi* não apresentaram redução do número de parasitos. Entretanto os tratados com carbenicilina e infectados com *L. (L.) infantum chagasi* apresentam maior número de parasitos no intestino após a liberação do bolo fecal.
- IV- Flebotomíneos tratados com Gentamicina e infectados com *L. (L.) infantum chagasi* apresentam menor número de parasitos no intestino no segundo dia após infecção.
- V – Defensina e gambicina são mais expressas em flebotomíneos com ovócitos desenvolvidos do que em plebotomíneos que não apresentam sinais de alimentação sanguínea.
- VI - Foi possível desenvolver um modelo de transmissão natural a Hamster e camundongo, pela picada do vetor *L.longipalpis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alphey L. Natural and engineered mosquito immunity. *J Biol.* 2009, 8; 40.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995, 59: 143–169.
- Ashford RW. A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. *Parassitologia* 1991; 33: 1-10.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14:523-32.
- Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D. Lutzomyia sand fly diversity and rates of infection by Wolbachia and an exotic Leishmania species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010;4(3):e627.
- Basset A, Tzou P, Lemaitre B, Boccard F. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO reports*. 2003, 4(2):205–9.
- Baton LA, Robertson A, Warr E, Strand MR, Dimopoulos G. Genome-wide transcriptomic profiling of *Anopheles gambiae* hemocytes reveals pathogens specific signatures upon bacterial challenge and *Plasmodium berghei* infection. *BMC Genomics* 2009, 10: 257-270.
- Beach R, Kiilu G, Leeuwenburg J. Modifications of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:278-82.
- Beard BC, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu. Rev. Entomol.* 2002, 47:123–41
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998; 188:1941-53.
- Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DL, Ribeiro JM. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(12):6704–9.
- Borovsky D, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1987; 1(3):235-42.
- Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, Svobodova M, Beverley SM, Späth G, Brun R, Pesson B, Bulet P. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004 72(12):7140-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília 2009. Disponível em: [http:// portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia\\_vig\\_epi\\_vol\\_1.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vig_epi_vol_1.pdf). Acesso em: 1 fev. 2010.

Bulet PC, Hetru J, Dimarcq L, Hoffman D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 1999, 23(4-5): 329-344

Chapman RF. Structure of the digestive system. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (ed. GA Kerkut & LI Gilbert). Oxford. Pergamon Press. 1985, vol. 4 165-205

Chapman RF. *The Insects. Structure and Function*, 3rd ed. Hodder and Stoughton, London 1982.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib, H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral. Leishmaniasis: what are the need for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:S7-S16.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC.. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002 ,5591 159-165.

Consoli RA, Santos BS, Lamounir MA, Secundino NFC, Rabinovith L, Silva CM, Alves R S, Carneiro NF. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 1997, 92(4):571-3.

Cunha AM, Chagas E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. *Hospital (Rio de Janeiro)*1937; 11:3-9.

De Barjac H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var *israelensis* sérotype H14. *C R Acad Sci Paris* 1978, 286: 797-800

Demaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 54: 219–223.

Descoteaux A, Turco JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 341-52.

Dillon R, Charnley K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* 2002, 153:503–9.

Dillon RJ, Lane RP. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langerone*. *Parasitol Res* 1993; 79: 492-6.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol Letters* 2005, 8: 1291–1298.

- Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2004, 49:71-92.
- Dillon RJ, el Kordy E, Shehata M, Lane RP. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Dec;90(6):669-73.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G.. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2009 (5):e1000423.
- Douglas AE. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends in Biotech.* 2007, 25:338-342.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB. 4. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3274-8.
- Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 1997; 34:719-28.
- Forattini OP, 1973. *Entomologia Médica*. V.4ed. São Paulo: Edgard Blucher/ Universidade de São Paulo,
- Gaio ADO, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina M a, Pimenta PFP, Lemos FJ a. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & vectors.* 2011 Jan;4(1):105.
- Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SMP. Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated to Different Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol* 2008, 37:597-601.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches on disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35:1169-80.
- Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* 2012 Mar; 79(3):581-93.
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci Jr M, Berbert-Molina MA, Lemos FJA. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 2010, 115:275-81.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; 354:1191-9.
- Hillesland H, Read A, Subhardra B, Hurwitz I, Mckelvey R, Ghosh K, Das P, Durvasula. Identification of aerobic bacteria from the Kala Azar vector, *Phlebotomus argentipes*: A platform for potential parastransgenic manipulation of sand flies. *Ann.J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 881-886.
- Hillyer JF, Christensen BM.. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *J Histochem Cytochem.* 2005, 53:689-98.



- Hoffman JA, Reichhart JM. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol* 2002, 3: 121-126.
- Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology Today*. 1992; 13 (10):411-5.
- Jobling B. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher; 1987, 119p.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22 (9): 439-45.
- Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2000; 2:1765-73.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD. *The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)*. *J. Med. Entomol.* 1977a, 13: 429-440
- Killick-Kendrick RR, Leaney AJ, Ready PD, Molyneux DH. *Leishmania* in Phlebotominae sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamster by bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B* 1977; 196:105-15.
- Killick-Kendrick R, Moyneaux DH. Transmission of leishmaniasis by bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:152-4.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4:1-24.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17:279-89.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Efen J, Lawyer P, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(29):10125-30.
- Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J, Raffa KF. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ. Entomol.* 2009, 38:67-77.
- Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C.. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2010, 327(5973):1644-8.
- Kuzina LV, Miller ED, Ge BX, Miller TA.. Transformation of *Enterobacter gergoviae* isolated from pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) gut with *Bacillus thuringiensis* toxin. *Curr. Microbiol.* 2002, 44:1-4
- La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10: 1671-1673.
- Lacey LA, Brooks WM. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: Lacey LA, editor. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. 1<sup>st</sup> ed. San Diego: Academic Press Press; 1997. P. 409

- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p.1-121
- Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press; 1979. p. 1-116.
- Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31-43.
- Lawyer PG, Young DG, Butler JF, Akin DE. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987; 24:347-55.
- Lehane, M.J., Wu, D., and Lehane, S. M. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94 11502–11507.
- Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:697-743.
- Levashina EA. Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004 Jul;34(7):673-8.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J, Soteriadou K, Dedet J, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(22): 9375-80.
- Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912, 4:84-95. Mauricio *et al.* 2000
- Marcondes CA, Flebotomíneos. In: *Entomologia médica e Veterinária*. 1 ed. Ateneu São Paulo. 2001, 13-30
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16:188-98.
- McCarthy CB, Diambra LA, Pomar RVR. Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, using an unbiased High-Throughput Approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 5(9): e1304.
- McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *J Biol Chem* 1990; 265:19611-23.
- Miller N, Lehane MJ Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropism with arthropod vectors. *Parasitol. Today*. 1993, 9:45-50.
- Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES. [Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011, Jan-Feb;44(1):76-8.

- Moraes CS, Seabra SH, Castro DP, Genta FA, Brazil R P, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Experimental Parasitology* 2008, 118 561–568
- Moraes CS, Seabra SH, Albuquerque-Cunha JM, Castro DP, Genta FA, de Souza W, Brazil R P, Garcia ES, Azambuja P. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Experimental Parasitology* 2009, 122 84–90
- Nicolle C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observées en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 1908; 3 :1-26.
- Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Phlebotomidae). *J Med Entomol* 2000; 37(1): 134-40.
- Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e226.
- Oliveira SMP; Moraes BA; Gonçalves CA; Giordano-Dias CM; Vilela ML; d'Almeida JM; Asensi MD; Mello RP. Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Phlebotomidae feeding in blood meal and sucrose plus blood meal. *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, 2001, 17(1) 229-232.
- Oliveira SMP; Moraes BA; Gonçalves CB; Giordano-Dias CM; d'Almeida JM; Asensi MD; Mello RP, Brazil RP. Prevalence of the microbiota in the digestive tract of wild caught females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Phlebotomidae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000, 33(3): 319-322.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100:1803–7
- Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* 2004:2551-63.
- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PA, Jacobs-Lorena M, Lemos FJA. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2002, 32:517-523.
- Peloquin JJ, Lauzon CR, Potter S, Miller TA. Transformed bacterial symbionts re-introduced to and detected in host gut. *Curr. Microbiol.* 2002, 45:41–45
- Penner JL. The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer. *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, 1992, 2849–2862.
- Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan 1977.
- Peters NS, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kiling N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321:970-4.

- Peters W . Peritrophic membranes, Zoophysiology series. V30, Springer, Berlin, 1992, 238pp.
- Pignato S, Giammanco GM, Grimont F, Grimont PA, Giammanco G. Molecular characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. *J Clin Microbiol.* 1999, 37(9):2840-7.
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolitic activities of the sandfly midgut. *Parasitol.* 1997; 115: 359-369.
- Pimenta PFP, Saraiva EM, Rowton E, Mogi GG, Garraway LA, Beverley SM, Turco S, Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9155-9.
- Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AM, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko YM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics.* 2009 Sep;282(3):307-17.
- Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology.* 1998 Oct;64(10):3724–30
- Pumpuni CB, DeMaio J, Kent, M., Davis, J.R., Beber, J.C. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1996 54:214-218.
- Raikhel AS. Vitellogenesis in mosquitoes. *Adv. Dis. Vector Res.* 1992, 9:1-39.
- Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko ZM. Molecular characterization of L1chit1, a midgut chitinase cDNA form the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003; 33:279-87.
- Rangel EF, Lainson R. Importância Médico-Veterinária. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. *Flebotomíneos do Brasil.* Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ; 2003. p.15-9.
- Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.*, 308:243-249.
- Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 1997, 22:219-240.
- Richards OW, Davies RG. *Imms general text book of entomology.* 1977 vol. I. London
- Rodrigues J, Brayner AB, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 2010, 329:1353-1355.
- Rogers ME, Bates PA. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 2007; 3(6):818-25.

- Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002; 124:498-507.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430:463-7.
- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J* 1903; 2:1261-2.
- Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ () Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 2008, 319:777– 782
- Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55:453-83. Ribeiro *et al.* 1995
- Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk; 2008. p. 205-38.
- Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984; 223:1417-1419.
- Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PFP. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 1994; 108:S55:62.
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:9944-8.
- Schlein Y, Polacheck I, Yuval B. Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*. 1985, (1) 57-66.
- Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* 2005, 42(6):928-938.
- Secundino NFC, Araújo MSS, Oliveira GHB. Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. *J. Invert. Pathol.*, 2002, 80.35-40.
- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distributions, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 255-72.
- Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101: 577-579.
- Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology, new world. In: Peters, W. and Killick-Kendrick, R.(eds), *The leishmaniasis in biology and medicine*, Vol. 1. . London: Academic Press 1987, 291–36.

- Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E, et al. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol* 1999; 78:675-89.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. 1999; 1:71-102.
- Sudia WD, Chamberlain RW. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq News* 1962; 22: 126-9.
- Tellam RL. The peritrophic matrix. In: *Biology of insect midgut*. Ed: Lehane ML & Billinsley PF.; Chapman & Hall, London 1996, 86-114.
- Terra WR, Ferreira C. Insect digestive systems of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 1994, 35:181-200.
- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Ver Microbiol* 1992; 46:65-94.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004; 173:6521-5.
- Vizioli J, Catteruccia F, della Torre A, Reckmann I, Muller HM. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *European Journal of Biochemistry*. 2001 268: 4027.
- Volf P, Hajmova M, Sadova J, Votypka J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol* 2004; 34:1221-7.
- Volf P, Kiewegova A, Nemeč A. Bacterial colonization in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera:Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica* 2002, 49: 73-77.
- Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, 1993, 30:179-198.
- Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1995; 32:711-25.
- Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(3):295-317.
- Walters LL, Modi GB, Tesh RB, Burrage T. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36(2):294-314.
- Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. The effect of post-blood-meal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:926-30.

---

Watanabe K, Abe K, Sato M. Biological control of an insect pest by gutcolonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88:90–97.

Watanabe K, Sato M. Plasmid mediated gene transfer between insectresident bacteria, *Enterobacter cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae. *Curr. Microbiol.* 1998, 37:352–55

Werren JH. *Wolbachia* run amok. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, 21:11154-11155.

World Health Organization, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/NTD\\_2010report\\_web.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_web.pdf). Acesso em 24 de Janeiro de 2011.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens.* 2008 Jul;4(7)

Young DG, Perkins PV, Endris RG. A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1981;18: 446.

Zayed ME, Bream AS. Biodiversity of the microbial flora associated with two strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2004;69(3):229-34