

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

**O processo de interação de *Leishmania (Leishmania)*
chagasi com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a
importância do lipofosfoglicano (LPG)**

por

Vanessa Cabreira de Freitas

Belo Horizonte

Fevereiro/2010

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

**O processo de interação de *Leishmania (Leishmania)*
chagasi com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a
importância do lipofosfoglicano (LPG)**

por

Vanessa Cabreira de Freitas

**Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
Doutor em Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Co-orientação: Dra. Nágila F. da Costa Secundino

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

**Belo Horizonte
Fevereiro/2010**

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

F862p
2010

Freitas, Vanessa Cabreira.

O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG) / Vanessa Cabreira Freitas. – Belo Horizonte, 2010.

xxvii, 183 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 179 - 210

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/Prevenção & controle 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Psychodidae/parasitologia 4. Glicoconjugados/análise I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação). III. Secundino, Nágila F. da Costa (Co-orientação). IV. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

**O processo de interação de *Leishmania (Leishmania)*
chagasi com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a
importância do lipofosfoglicano (LPG)**

por

Vanessa Cabreira de Freitas

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)

Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurentti

Profa. Dra. Maria Norma Mello

Profa. Dr. Nelder Ferreira Gontijo

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias

Suplente: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Tese defendida e aprovada em: 25/02/2010.

***"Entre todos os bens da natureza, o
mais excelente, o mais útil e o mais
necessário é aquele sem o qual nenhum
outro bem se pode gozar, a saúde."***

*Padre Antônio Vieira,
missionário português.*

Aos meus pais Wanderley e Marli

Dedico

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Paulo Pimenta pela oportunidade de trabalhar nessa instituição e pela valiosa orientação no desenvolvimento desse trabalho. Minha gratidão, admiração e respeito.

Aos co-orientadores Dra. Nágila Secundino e ao Dr. Rodrigo Soares pelas sugestões, críticas, contribuições e grande incentivo durante a realização dos experimentos e correção dos manuscritos.

À Dra. Carmem Fontanetti por ter sido a responsável pelo meu ingresso nos caminhos da ciência e por seu um exemplo de determinação e ética.

À Dra. Ana Paula Madureira pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. Márcio Sobreira e Dra. Eliane Teixeira pelas proveitosas conversas e conselhos.

Às amigas Dra. Carina Margonari e Dra. Ana Paula Marques pela amizade, carinho e apoio durante a realização desse trabalho.

Aos amigos Alessandra, Ana Carolina, Bruno, Carolina Cunha, Fernanda Gambogi, Guilherme, Junara, Klívia, Marcelle, Maíra, Rafael Gonçalves e Rafael Ramiro pelas conversas, colaborações nos experimentos e inestimável carinho com a nossa amizade. Minha eterna gratidão.

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia Médica (Alessandra, Ana Bahia, Ana Carolina, Ana Flávia, Ana Paula, Andrezza, Bárbara, Belinha, Breno, Bruno, Caroline, Carol Cunha, Carol Dantas, Cláudia, Cris, Dani Zile, Erika, Felipe, Fernanda Gambogi, Fernanda Rezende, Gustavo Martins, Gustavo Freitas, Helena, Igor Castro, Igor Soares, Izabela, Janes, Junara, Klívia, Kênia, Lili, Luciana, Maíra, Marcelle, Sabrina, Rafael Gonçalves, Rafael Pimenta, Rafael Ramiro e Tati) pelo companheirismo e convivência durante todos esses anos.

Aos grandes amigos da UNESP de Rio Claro/São Paulo. Para verdadeiras amizades não existem distâncias.

À professora e amiga Paola Seabra pelos valiosos conselhos e pelo constante ensinamento da língua inglesa e da escrita científica.

Aos "amigos de caverna" Drops, Érica, Gretynelle, Leopoldo, Marconi e Xavier pelo incentivo e pelas divertidas viagens juntos.

Aos amigos muito especiais Ana Cláudia, Aninha, Karine, Marcos e Michele. É muito bom saber que posso sempre contar com vocês.

À minha nova família mineira, Marilene, João Carlos, Indira, Pedro, Carol, Júlia e vovó Zezé, por terem me acolhido com tanto carinho e atenção e por me darem força e incentivo em todos os momentos.

Aos meus pais Wanderley e Marli e aos meus irmãos Danilo e Priscila, pelo carinho e apoio incondicional e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos difíceis. Amo vocês!

Ao meu namorado João Paulo pelo companheirismo, carinho, dedicação, amizade, paciência e incentivo. Muito obrigada pelas doses diárias de otimismo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo apoio estrutural e financeiro.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pela oportunidade e incentivo recebido.

Às agências de fomento AMSURD (Pôle Amériques), CPqRR, FAPEMIG, PAPES IV e PRONEX.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiv
RESUMO.....	xxvi
ABSTRACT.....	xxvii
1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 As Leishmanioses como problema de saúde pública.....	28
1.1.1 Leishmanioses Cutâneas.....	29
1.1.2 A Leishmaniose Visceral.....	29
1.2 Vetores naturais.....	31
1.2.1 Vetores da Leishmaniose Visceral.....	32
1.3 Interação <i>Leishmania</i>-hospedeiro.....	33
1.3.1 Interação parasito-hospedeiro vertebrado.....	33
1.3.2 Interação parasito-vetor.....	34
1.3.2.1 Eventos fisiológicos da digestão sanguínea nos flebotomíneos.....	34
1.3.2.2 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> no vetor.....	37
1.3.2.3 Mecanismos de transmissão pela picada.....	41
1.4 Barreiras ao desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no flebotomíneo.....	45
1.4.1 Sobrevivência dos parasitos dentro do bolo sanguíneo.....	45
1.4.2 Persistência dos parasitos pós-defecação.....	51
1.4.3 Migração dos parasitos para região anterior.....	57
2 OBJETIVOS.....	61
2.1 Objetivo geral.....	61
2.2 Objetivos específicos.....	61

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1 Captura e acondicionamento de flebotomíneos.....	62
3.2 Parasitos.....	64
3.2.1 Manutenção da cepa selvagem.....	64
3.2.2 Geração de amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e validação da transformação <i>in vitro</i>.....	65
3.2.2.1 Geração das amastigotas axênicas.....	65
3.2.2.2 Cinética do crescimento das amastigotas axênicas.....	65
3.2.2.3 Análise morfológica das amastigotas axênicas.....	65
3.2.2.4 Transformação cíclica das amastigotas axênicas.....	66
3.2.2.5 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> pelas amastigotas axênicas.....	66
3.2.2.6 Eletroforese em poliacrilamina (SDS PAGE) de proteínas totais de promastigotas e amastigotas axênicas.....	67
3.2.2.7 Análise por RT PCR da expressão da proteína A2.....	69
3.2.3 Geração de <i>L. (L.) chagasi</i> deficiente na expressão de <i>LPG1</i>.....	69
3.2.3.1 Manutenção da cepa mutante <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	70
3.2.3.2 Morfologia de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO.....	71
3.3 Caracterização do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO.....	71
3.3.1 Caracterização do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT	71
3.3.1.1 Extração de LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	71
3.3.1.2 Purificação do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	71
3.3.1.3 Western blot do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	72
3.3.1.4 Preparação das unidades repetitivas e partição butanol:água.....	72
3.3.1.5 Tratamentos enzimáticos e cromatografia de troca iônica.....	74
3.3.1.6 Eletroforese de Carboidratos (FACE).....	74
3.3.1.7 Eletroforese Capilar.....	76
3.3.1.8 Gel de Monossacarídeos.....	76
3.3.1.9 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	78
3.3.2 Caracterização do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	78
3.4 Infecção experimental dos flebotomíneos em alimentador artificial.....	78
3.4.1 Preparo do sangue contendo parasitos.....	78
3.4.2 Separação dos flebotomíneos.....	79
3.4.3 Infecção experimental.....	79
3.4.4 Manutenção dos flebotomíneos infectados.....	81

3.4.5 Dissecção e análise do processo de infecção dos flebotomíneos.....	81
3.5 Análise da susceptibilidade de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO a lisado de intestinos contendo sangue.....	83
3.6 Morfologia intestinos infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO.....	84
3.6.1 Microscopia óptica (MO).....	84
3.6.1.1 Processamento dos flebotomíneos e inclusão em historesina.....	84
3.6.1.2 Coloração com Azul de Toluidina.....	84
3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	85
 4 RESULTADOS.....	 86
4.1 Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	86
4.2 Geração de amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	88
4.2.1 Cinética de crescimento	88
4.2.2 Morfologia.....	90
4.2.3 Transformação cíclica.....	93
4.2.4 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	95
4.2.5 SDS PAGE de proteínas totais de promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	97
4.2.6 RT-PCR.....	99
4.3 Geração de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	101
4.3.1  Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	101
4.3.2 Morfologia de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	104
4.4 Caracterização do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	106
4.4.1 Detecção do LPG.....	106
4.4.2 Caracterização das unidades repetitivas.....	106
4.5 Caracterização do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	114
4.6 Infecção experimental de <i>L. (L.) longipalpis</i> com de <i>L. (L.) chagasi</i>	117
4.6.1 Análise da infecção experimental iniciada com promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	117
4.6.1.1 Índice de infecção dos flebotomíneos.....	117
4.6.1.2 Densidade dos parasitos.....	119
4.6.1.3 Morfotipos de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT presentes em <i>L. (L.) longipalpis</i> durante o curso da infecção.....	122

4.6.2 Análise da Infecção Artificial com <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	128
4.6.2.1 Desenvolvimento de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO em <i>L. (L.) longipalpis</i>	128
4.6.2.2 Desenvolvimento de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO em <i>P. (P.) duboscqi</i>	136
4.6.3 Análise da susceptibilidade de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO a lisado de intestinos contendo sangue.....	138
4.7 Aspectos morfológicos dos intestinos infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO.....	141
4.7.1 Morfologia geral de fêmeas de <i>L. (L.) longipalpis</i> não alimentadas.....	141
4.7.2 O intestino de fêmeas infectadas com <i>L. (L.) chagasi</i> WT.....	141
4.7.3 O intestino de fêmeas infectadas com <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO.....	144
5 DISCUSSÃO.....	162
6 CONCLUSÕES.....	178
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179

LISTA DE FIGURAS

Folha de

rosto -	Fêmea de <i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i> ingurgitada com sangue ...	ii
Figura 1 -	Desenho esquemático do tubo digestivo dissecado de <i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i> (Jobling, 1987)	36
Figura 2 -	Desenho esquemático dos morfotipos de <i>Leishmania</i> de acordo com a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) (Desenho de Paulo Pimenta). Da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica	39
Figura 3 -	(A) Representação esquemática dos glicoconjugados secretados e de superfície de promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. EthN=etanolamina; GPI=glicosilfosfatidilinositol; GIPLs=glicoinositolfosfolípides; LPG=lipofosfoglicano; P=fosfato; PG=fosfoglicano; PI=fosfatidilinositol; sAP=fosfatases ácida secretadas; Ser=serina; sPPG=proteofosfoglicanos secretados. A área tracejada indica os domínios especificamente afetados por mutações nos respectivos genes LPG1 e LPG2. (B) Desenho esquemático da estrutura do LPG. Gal=Galactose; Gal _f =Galactofuranose; Glc=Glicose; GlcN=glicosamina; Inos=inositol; Man=Manose; P=fosfato (modificado de Descoteaux & Turco, 1999)	50
Figura 4 -	Comparação entre os diferentes tipos de LPG já descritos durante a metaciclogênese (modificado de Sacks & Kamhawi, 2001)	59
Figura 5 -	Local de coleta de <i>L. (L.) longipalpis</i> - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas	63
Figura 6 -	Esquema de fracionamento do LPG. A hidrólise ácida branda (HCl 0,02 N, 5 min, 100 °C) fragmenta o LPG e libera os glicanos neutros, fosforilados e a porção central-âncora lipídica. Essas últimas são separadas dos demais componentes após partição butanol:água (2:1). As unidades repetitivas fosforiladas foram tratadas com fosfatase alcalina. Os perfis foram posteriormente visualizados através de gel de	

	carboidratos e eletroforese capilar. As unidades repetitivas foram submetidas à hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético a 2 N, 100  , 3 horas) para fragmentação em monossacarídeos, que foram analisados pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e gel de monossacarídeos	73
Figura 7 -	Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral dos recipientes contendo flebotômíneos conectados aos "alimentadores artificiais". (B) Detalhe do alimentador revestido por pele de pintinho (<i>G. g. domesticus</i>) contendo sangue e promastigotas de <i>Leishmania</i>	80
Figura 8 -	Espécimes de <i>L. (L.) longipalpis</i> anestesiados em CO ₂ e gelo para triagem	82
Figura 9 -	Detalhes da triagem de <i>L. (L.) longipalpis</i> . (A) fêmea não ingurgitada e macho de <i>L. (L.) longipalpis</i> (da esquerda para a direita); (B) fêmea de <i>L. (L.) longipalpis</i> ingurgitada com sangue	82
Figura 10 -	Curva de crescimento de <i>L. (L.) chagasi</i> WT em Meio M199 acrescido de 10% de SFB a 26 °C. Gráfico representativo de dois experimentos independentes	87
Figura 11 -	Curva de crescimento e transformação de amastigotas axênicas a partir de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT em Meio M199 acrescido de 20% SFB e hemina (25  , mL) e incubação a 37 °C com 5% CO ₂ . Gráfico representativo de dois experimentos independentes	89
Figura 12 -	Morfologia de promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT coradas pelo método Panótico Rápido e observadas em microscópio óptico. (A) Cultura de promastigotas a 26 °C: parasitos fusiformes, com um longo flagelo e um pequeno cinetoplasto localizado na porção anterior do corpo; (B)-(D) cultura de amastigotas axênicas a 37 °C após 96 horas de incubação: parasitos ovóides e com ausência de flagelo externo. c=cinetoplasto; n=núcleo	91
Figura 13 -	Morfologia de promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT observada em Microscópio Eletrônico de Varredura. (A) cultura de promastigotas a 26 °C: parasitos fusiformes, com um longo flagelo; (B) formas intermediárias presentes em cultura de amastigotas axênicas a 37 °C, 48 horas após incubação; (C) parasitos ovóides, com redução do corpo celular e ausência de flagelo externo em cultura de amastigotas	

	axênicas a 37 °C, 96 horas após incubação. c=corpo celular; f=flagelo ...	92
Figura 14 -	Curva de reversão das formas amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT em formas promastigotas, após adição de Meio M199 (10% SFB) e incubação a 26°C	94
Figura 15 -	Infecção de macrófagos peritoneais murinos (BALB/c) com <i>L. (L.) chagasi</i> WT corados pelo método Panótico Rápido. (A) macrófago não infectado; (B)-(E) macrófagos infectados com amastigotas axênicas. Setas=amastigotas axênicas; asterisco=detalhe de uma amastigota axênica com cinetoplasto duplicado	96
Figura 16 -	Perfil eletroforético (SDS PAGE 10%) de proteínas totais de promastigotas (P) e amastigotas axênicas (A) de <i>L. (L.) chagasi</i> WT corado com solução corante Commassie Blue. O equivalente a 10 ⁷ parasitos foi colocado em cada canaleta. Os pesos moleculares são dados. A=amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT; P=promastigota de <i>L. (L.) chagasi</i> WT; PM=peso molecular	98
Figura 17 -	Análise em RT-PCR da expressão da proteína A2 em amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT. <i>Primer</i> A2 (a) e <i>primer</i> alfa tubulina (b). Colunas 1 a 4: amastigotas axênicas 24, 48, 72, e 96 horas após a incubação <i>in vitro</i> ; coluna 5: cultura de promastigotas; coluna 6: controle negativo sem DNA	100
Figura 18 -	Desenho esquemático da superfície celular de promastigotas de <i>Leishmania</i> selvagens (WT) e deficientes no gene LPG1 (LPG1KO) (modificado de Lodge & Descoteaux, 2005). Promastigotas WT expressam todos os glicoconjugados de superfície; promastigotas LPG1KO são deficientes na síntese de LPG	102
Figura 19 -	Curva de crescimento de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO em Meio M199 acrescido de 10% de SFB a 26 °C, 50 µg/mL de gentamicina (G418) e 50 µg/mL higromicina	103
Figura 20 -	Cultura de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO. Os parasitos foram processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) e (C) promastigotas WT e (B) e (D) promastigotas LPG1KO	105
Figura 21 -	LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT incubado com o anticorpo CA7AE e demonstrado por Western-blot	107
Figura 22 -	Perfil das unidades repetitivas do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT obtido por	

	Eletroforese de Carboidratos (FACE). Coluna 1 , padrão de peso molecular de oligoglicosés (G1-G7); coluna 2 , unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT revelando a presença de 4 bandas. Hex = hexose, Gal = galactose, Man = manose	108
Figura 23 -	Eletroforese Capilar das unidades repetitivas desfosforiladas de <i>L. (L.) donovani</i> (LD4) (A) e <i>L. (L.) chagasi</i> WT (B)	110
Figura 24 -	Eletroforese de Monossacarídeos de <i>L. (L.) chagasi</i> WT (BH46WT). O controle é representado por <i>L. (L.) donovani</i> (LD4), que não apresenta cadeias laterais. Gal=galactose; Glc=glicose; Man=manose	111
Figura 25 -	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de <i>L. (L.) chagasi</i> WT. (A) Padrão de galactose (Gal), glicose (Glc) e manose (Man); (B) Proporção dos monossacarídeos das unidades repetitivas de <i>L. (L.) chagasi</i> WT. A seta em (B) aponta para o pico de glicose para <i>L. (L.) chagasi</i> WT	112
Figura 26 -	Digrama esquemático do LPG da cepa BH46 de <i>L. (L.) chagasi</i> comparado com o LPG já descrito de <i>L. (L.) donovani</i> (1S-2D) e da cepa PP75 de <i>L. (L.) chagasi</i> . G=galactose; Glc=glicose; M=manose; P=fosfato	113
Figura 27 -	Perfil das unidades repetitivas do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO obtido por Eletroforese de Carboidratos (FACE). Coluna 1 , padrão de peso molecular que vai de 1 glicose até 7 glicosés (G1-G7); coluna 2 , unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> WT revelando a presença das 3 cadeias laterais de glicose; coluna 3 , unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO revelando a ausência de bandas	115
Figura 28 -	Perfil da região do core do LPG de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO e WT obtido por Eletroforese de Carboidratos (FACE). Coluna 1 , core de <i>L. (L.) chagasi</i> LPG1KO, revelando a presença de uma banda na posição G3, evidenciando um core truncado; coluna 2 , core de <i>L. (L.) chagasi</i> WT, revelando um arraste e uma banda na posição G7, consistente com a região conservada do core glicano de todos os LPGs	116
Figura 29 -	Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT após alimentação artificial com formas promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) . Análise	

	representativa de quatro experimentos para cada gráfico	121
Figura 30 -	Morfotipos de <i>L. (L.) chagasi</i> WT encontrados em intestino infectados de <i>L. (L.) longipalpis</i> . (A) Desenho esquemático dos morfotipos de acordo com a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) (Desenho de Paulo Pimenta); (B) a (F) Fotos dos morfotipos encontrados em intestinos infectados de <i>L. (L.) longipalpis</i> . As lâminas foram produzidas com 10  de macerado de intestino diluído em PBS e posteriormente coradas pelo método Panótico Rápido. (B) promastigota procíclica, (C) promastigota nectomona, (D) promastigota haptomona, (E) promastigota paramastigota e (F) promastigota metacíclica	123
Figura 31 -	Padrão de desenvolvimento de infecções iniciadas com promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) de <i>L. (L.) chagasi</i> WT. Amostras foram preparadas para análise morfológica e um mínimo de 300 parasitos foi analisado por flebotomíneo. A relativa proporção de amastigotas, promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigota, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas são demonstradas (consultar a Figura 30 para as definições). A média aritmética encontrada no intestino de 12 insetos provenientes de dois experimentos diferentes é representada em cada gráfico. O conjunto de dados de cada gráfico representa a análise de aproximadamente 30000 parasitos individuais	125
Figura 32 -	Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após infecção experimental. Análise representativa de dois experimentos independentes	129
Figura 33 -	Densidade de parasitos no intestino médio de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes	132
Figura 34 -	Densidade de parasitos no intestino de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT (círculos fechados) e LPG1KO (quadrado fechado) após infecção experimental com inibidor de tripsina (it). WT (círculos fechados); WT na presença de inibidor de tripsina (círculos abertos); LPG1KO (quadrado fechado); LPG1KO presença de inibidor	

	de tripsina (quadrado aberto). Análise representativa de dois experimentos independentes	134
Figura 35 -	Densidade de parasitos no intestino de <i>P. (P.) duboscqi</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes	137
Figura 36 -	Análise <i>in vitro</i> da susceptibilidade a morte de <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO em presença de lisados de intestinos de <i>L. (L.) longipalpis</i> contendo sangue. (A) densidade de promastigotas após exposição por 12 horas a lisados de intestinos individuais contendo sangue (24 horas após repasto sanguíneo não infectante). (B) Porcentagem de promastigotas viáveis. A barra representa a média do número de parasitos viáveis nos intestinos analisados. Cultura de <i>L. (L.) chagasi</i> WT (círculos aberto) e LPG1KO (círculo fechado); cultura de <i>L. (L.) chagasi</i> WT (quadrado aberto) e LPG1KO (quadrado fechado) na presença de lisado de intestino; cultura de <i>L. (L.) chagasi</i> WT (triângulo aberto) e LPG1KO (triângulo fechado) na presença de lisado de intestino e inibidor de tripsina. Análise representativa de dois experimentos independentes	139
Figura 37 -	Secções histológicas longitudinais de fêmea de <i>L. (L.) longipalpis</i> sem alimentação sanguínea. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. (A) visão geral do flebotomíneo mostrando a localização do intestino; (B) detalhe da localização do intestino. c=cutícula; cg=corpo gorduroso; ep=epitélio intestinal; ia=intestino anterior; im=intestino médio; m=musculatura; ve=válvula do estomodeu	146
Figura 38 -	Intestino de fêmea de <i>L. (L.) longipalpis</i> 48 horas após o repasto com sangue de camundongo não infectado. O intestino foi dissecado e fotografado sob lupa	147
Figura 39 -	Secções histológicas longitudinais do intestino de fêmea de <i>L. (L.) longipalpis</i> alimentadas com sangue de camundongo não infectado (A-B) e infectado com <i>L. (L.) chagasi</i> WT (C-E). Os intestinos foram dissecados 48 horas após o repasto sanguíneo e antes da liberação total do bolo fecal. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. (A) e (C) visão geral do intestino; (B) , (D) e (E) detalhe do intestino médio e da região da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; cc=célula	

colunar, d=divertículo, ep=epitélio, ia=intestino anterior, im=intestino médio, ip= intestino posterior; n=núcleo das células colunares, s=sangue, tm=túbulos de Malpighi, ve=válvula do estomodeu, setas=microvilosidades

148

Figura 40 - Secções histológicas longitudinais de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os insetos foram processados 5 dias após o repasto sanguíneo infectante. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. **(A)** visão geral do flebotomíneo; **(B)** detalhe da válvula do estomodeu, do intestino médio torácico e dos parasitos; e **(C)** detalhe de leishmanias obstruindo o lúmen intestinal e contribuindo para o bloqueio da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; c=cutícula, cg=corpo gorduroso, d=divertículo, e=esôfago, ep=epitélio, f=faringe, gs=glândula salivar, ia=intestino anterior, ima=intestino médio abdominal, imt= intestino médio torácico, m=musculatura, o=ovos, ve=válvula do estomodeu

149

Figura 41 - Secções histológicas longitudinais de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os insetos foram processados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina **(A)** Visão geral do flebotomíneo; **(B)** detalhe da válvula do estomodeu, do intestino médio torácico e dos parasitos; e **(C)** detalhe de promastigotas obstruindo o lúmen intestinal e contribuindo para o bloqueio da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; c=cutícula, e=esôfago, ep=epitélio, f=faringe, gs=glândula salivar, ima=intestino médio abdominal, imt=intestino médio torácico, m=musculatura, o=ovos, ve=válvula do estomodeu

150

Figura 42 - Plug de gel tipo PSG secretado por promastigotas de um intestino de *L. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) chagasi* WT (infecção tardia iniciada com formas promastigotas). **(A)** Secção sagital de uma fêmea de flebotomíneo demonstrando a distensão do intestino torácico e a posição típica do plug de gel (seta) (extraído de Rogers *et al.*, 2002, com modificações). O diagrama mostra o intestino dividido em: 1, intestino anterior; 2, região da cárdia; 3, intestino médio torácico; 4 e 5, intestino médio abdominal e 6, intestino posterior. **(B)** e **(C)** Aparência do gel intacto do intestino torácico dissecado sob microscópio óptico. c=crop;

- im=intestino médio; it=intestino torácico; seta=promastigotas embebidos no gel; tm=túbulos de Malpighi; ve=válvula do estomodeu ... 151
- Figura 43 -** Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 3 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** Vista geral do intestino; **(B)-(D)** detalhe de **(A)**. asteriscos=sinais deixados pela possível inserção do flagelo dos parasitos; cabeça de seta=detalhe da adesão dos parasitos; ep=epitélio intestinal; mv=microvilosidades; p=promastigotas 152
- Figura 44 -** Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 6 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** bolo de parasitos no intestino médio (seta); **(B)** detalhe da área tracejada em **(A)**; **(C)** vista geral do intestino médio aberto e contendo parasitos; **(D)** e **(E)** detalhe de **(C)**. ep= epitélio intestinal; fm=fibras musculares; mv=microvilosidades; p=promastigotas 153
- Figura 45 -** Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** vista geral do intestino médio; **(B)-(C)** detalhe dos parasitos e do gel tipo PSG. ep=epitélio intestinal; fm=fibras musculares; mv=microvilosidades; p=promastigotas; setas= filamentos do gel 154
- Figura 46 -** Trato digestivo aberto na região da válvula do estomodeu de uma fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** Vista geral mostrando a região da válvula do estomodeu repleta de parasitos e o ducto do divertículo; **(B)** detalhe de **(A)**; **(C)** detalhe da densa rede de filamentos de gel tipo PSG que envolve os parasitos. dd=ducto do divertículo; p=parasitos; seta= rede de filamento do gel; ve=válvula do estomodeu 155
- Figura 47 -** Ultraestrutura do epitélio celular do intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após a o repasto sanguíneo com *L. (L.) chagasi* WT.

(A) visão geral das células epiteliais; (B) detalhe da região apical de uma célula epitelial; (C) detalhe da região basal do epitélio intestinal; (D) retículo endoplasmático rugoso com formação concêntrica, mitocôndria e zona de Golgi presentes na região apical do epitélio intestinal. asterisco=ribossomos livres; fm=fibras musculares; g=zonas de Golgi; he=hemocele; l=estruturas semelhantes à lisossomos; lb=lâmina basal; lbb=labirinto basal; lu=lúmen; m=mitocôndria; mv=microvilosidades; n=núcleo; rer=retículo endoplasmático rugoso; setas=complexos juncionais tipo tight 156

Figura 48 - Ultraestrutura de *L. (L.) chagasi* WT no intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após o repasto sanguíneo. (A), (B) e (E) promastigotas livres no lúmen do intestino médio; (C) corte transversal dos parasitos na altura do flagelo; (D) detalhe do axonema do flagelo; (F) detalhe da ligação do parasito às microvilosidades. ax=axonema do flagelo; bf=bolsa flagelar; c=cinetoplasto; cabeça de seta=associação do parasito às microvilosidades; f=flagelo; fg=filamentos de gel (fPPG); lu=lúmen; m=mitocôndria; ms=microtúbulos subpeliculares; mp=membrana plasmática do parasito; mv=microvilosidades; n=núcleo; rer=retículo endoplasmático rugoso; p=promastigotas; seta= complexos juncionais tipo tight 157

Figura 49 - Ultraestrutura de *L. (L.) chagasi* no intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após a o repasto sanguíneo. (A) Localização dos filamentos de gel tipo PSG; (B)-(E) detalhe das promastigotas em associação com filamentos de gel tipo PSG. asterisco=promastigotas em divisão; ax=axonema do flagelo; bf=bolsa flagelar; c=cinetoplasto; cm=corpos multivesiculares; f=flagelo; fg=filamentos de gel; lu=lúmen; m=mitocôndria; ms=microtúbulos subpeliculares; mv=microvilosidades; n=núcleo; p=promastigotas; rer=retículo endoplasmático rugoso 159

Figura 50 - Ultraestrutura do intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 30 horas após o repasto sanguíneo com *L. (L.) chagasi* BH46 LPG1KO. (A) visão geral do epitélio intestinal mostrando a formação da matriz peritrófica; (B)-(C) detalhe da incrustação de pigmentos tipo heme (um produto da digestão das hemáceas) na matriz peritrófica e de hemáceas

parcialmente lisadas; **(D)** vesículas de secreção sendo liberadas pelo epitélio intestinal; **(E)** produtos da digestão. asterisco=secreção de vesículas; fm=fibras musculares; h=hemáceas parcialmente lisadas; he=hemocele; lb=lâmina basal; lu=lúmen; mp=matriz peritrófica; mv=microvilosidades; pd= produtos da digestão; s=secreção; seta=incrustação de pigmentos tipo heme; v=vesículas

161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Soluções para géis de resolução e de concentração de poliacrilamida 10% e 12%	68
Tabela 2 -	Soluções para géis de resolução e de concentração para Eletroforese de Carboidratos	75
Tabela 3 -	Soluções para géis de resolução e de concentração para Eletroforese de Monossacarídeos	77
Tabela 4 -	Comparação entre os índices de infecção de <i>L. (L.) longipalpis</i> com <i>L. (L.) chagasi</i> WT após alimentação artificial com formas promastigotas e amastigotas axênicas	118
Tabela 5 -	Densidade de parasitos no intestino de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectado com <i>L. (L.) chagasi</i> WT após alimentação artificial com formas promastigotas e amastigotas axênicas	120
Tabela 6 -	Porcentagem dos morfotipos de <i>L. (L.) chagasi</i> WT em <i>L. (L.) longipalpis</i> durante o curso de infecções iniciadas com promastigotas e amastigotas axênicas. O preparo das amostras e a análise dos dados foram realizados como descrito na figura 31	127
Tabela 7 -	Densidade de parasitos no intestino de <i>L. (L.) longipalpis</i> infectado com <i>L. (L.) chagasi</i> WT e LPG1KO após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes	131

LISTA DE ABREVIATURAS

AMAC = 2-aminoacridone

AMP = adenosina monofosfato

ANTS = 8-aminoftaleno - 1,3,6-trissulfato

APS = persulfato de amônio

APTS = 8 aminopirene-1,3,6- ácido trissulfônico

BH46 = cepa de *Leishmania chagasi* isolada de adulto com leishmaniose visceral da cidade de Conselheiro Pena, Minas Gerais, Brasil.

CDC = armadilha luminosa (*Center for Disease Control light trap*)

DMEM = meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO = dimetilsulfóxido

dNTP = desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EST = sequências expressas (*expressed sequences tag*)

EthN = etanolamina

FACE  eletroforese de Carboidatos (*Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis*)

fPPG = filamentos de proteofosfoglicanos

Gal = galactose

Gal_f = galactofuranose

GalNAc = N-acetil galactosamina

GDP = guanosina difosfato

GIPL = glicoinositolfosfolípides

Glc = glicose

GlcN = glicosamina

GPI = glicosilfosfatidilinositol

Hex = hexose

HIV = vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC  cromatografia Líquida de Alta Performance (*High-Performance Liquid Chromatography*)

Inos = inositol

it = inibidor de tripsina

KO = tipo mutante (*knock out*)

LPG = lipofosfoglicano

LV = Leishmaniose Visceral

Man = manose

MET = microscopia eletrônica de transmissão

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MO = microscopia óptica

MP = matriz peritrófica

NIH = National Institute of Health

P = fosfato

PBS = tampão fosfato/salina (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

PG = fosfoglicano

PI = fosfatidilinositol

PKDL = Leishmaniose dérmica pós calazar (*Post-kala-azar dermal leishmaniasis*)

PPGs = proteofosfoglicanos

PSG = gel secretado por promastigotas (*Promastigote secretory gel*)

qsp = quantidade suficiente para

rpm = rotações por minuto

RT = transcriptase reversa

sAP = fosfatases ácida secretadas

SDS PAGE = Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

Ser = serina

SFB = soro fetal bovino

sPPG = proteofosfoglicanos secretados

TBE = Tampão Tris borato EDTA

TEMED = N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina

THF = tetrahidrofurano

UV = ultravioleta

VE = válvula do estomodeu

WHO = Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

WT = tipo selvagem (*wild type*)

RESUMO

Estudos da interação *Leishmania*-vetor são importantes para o entendimento dos processos de desenvolvimento e transmissão do parasito. Significativas informações têm sido relatadas principalmente para espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. No Novo Mundo, existem poucas informações detalhadas sobre o desenvolvimento de *Leishmania chagasi* em seu vetor natural *Lutzomyia longipalpis*. O desenvolvimento desse parasito foi investigado em infecções experimentais do vetor com promastigotas e amastigotas axênicas obtidas por transformação *in vitro*. Ambas as formas do parasito geraram alta porcentagem de flebotomíneos infectados. Foi observado um decréscimo no número de parasitos por intestino no terceiro dia após o repasto. Entretanto, os parasitos sobreviventes nos dois grupos foram capazes de se multiplicar e se desenvolver no intestino, apresentando densidade máxima entre seis e sete dias. Todos os morfotipos de promastigotas foram observados. Infecções iniciadas com promastigotas ou amastigotas axênicas mostraram perfis semelhantes de desenvolvimento e produziram formas infectantes. Assim, promastigotas podem ser preferencialmente utilizadas em experimentos de infecção por ser este um processo menos laborioso. Para muitas espécies de *Leishmania* tem sido sugerido que o lipofosfoglicano (LPG) promova a adesão do parasito ao epitélio intestinal do flebotomíneo. Análises estruturais do LPG de diferentes espécies de *Leishmania* têm revelado que o polimorfismo nesses glicoconjugados se deve a variação dos açúcares das cadeias laterais e "cap". A análise das cadeias laterais da cepa BH46 revelou pela primeira vez um LPG poliglicosilado em *L. chagasi*. A importância do LPG na sobrevivência dessa espécie em *L. longipalpis* foi investigada usando parasitos mutantes em LPG. Foram observadas reduções na sobrevivência ou no crescimento desses mutantes no período que antecede a defecação e, em 60 horas, a infecção foi perdida. Em todos os pares naturais *Leishmania*/vetor analisados até o momento o LPG é requerido para a adesão do parasito ao intestino para evitar sua expulsão com o bolo fecal. Diferentemente, nós observamos que a síntese de LPG foi essencial para a sobrevivência inicial de *L. chagasi* no intestino de *L. longipalpis*, provavelmente protegendo o parasito do ataque enzimático. Aspectos morfológicos dessa interação foram investigados por microscopia óptica, eletrônica de varredura e transmissão. Diferente da adesão altamente especializada previamente proposta para *L. chagasi* em *L. longipalpis*, poucos parasitos foram observados com corpo e flagelo em contato com o epitélio intestinal e, esporadicamente, com o flagelo superficialmente inserido entre as microvilosidades. Diante de nenhuma vacina efetiva contra a doença e de uma variedade limitada de drogas para o tratamento, detalhes de todos os aspectos da biologia do parasito são desejáveis para a formulação de novas estratégias de controle contra o protozoário e o vetor.

ABSTRACT

Studies on *Leishmania*-vector interactions are important to understand processes involved in parasite development and transmission. Considerable information has been reported mainly for Old World *Leishmania* species. In the New World, there is little detailed information about the development of *Leishmania chagasi* in its natural vector *Lutzomyia longipalpis*. The development of this parasite was investigated in experimental infection of the vector with cultured promastigotes and axenic amastigotes obtained by *in vitro* transformation. Both parasite forms enable high percentage of infected sand flies. It was observed a decrease in parasite number within the gut on the third day after bloodmeal. However, the surviving promastigotes of both groups were able to multiply and develop in the gut. The highest density of parasite per gut occurred between six and seven days and all the promastigote forms were observed in the parasite life cycle. Experimental infections initiated with promastigotes and axenic amastigotes showed a similar trend of development and produced infective forms. Therefore, promastigote infection can be preferably use in experimental infection being less laboring. For many *Leishmania* species, the lipophosphoglycan (LPG) has been suggested to promote the attachment between parasite and sand fly epithelial midgut. Structural analyses of different *Leishmania* species LPG have showed that the polymorphism in theses glycoconjugates reside in the sugar side chain and cap. The analysis of strain BH46 side chains demonstrated for the first time a poly glucosylated LPG in *L. chagasi*. The LPG importance in survive of this specie in *L. longipalpis* was investigated using mutant parasites in LPG biosynthesis. It was observed reductions in mutant survive or growth prior to excretion and, in 60 hour, the infection was completely lost. In all natural *Leishmania*/vector combinations examined to date, the LPG is required to binding the parasites to the sand fly midgut to avoid their loss with the blood meal excretion. Unlike of these observations, we observed that the LPG synthesis was essential to early survive of the *L. chagasi* in *L. longipalpis* midgut, probably protect the parasites from enzymatic attack. Morphological aspects of *Leishmania*/vector interaction were investigated using to light microscopy and scanning and transmission electron microscopy. Different of highly specialized attachment proposed previously to *L. chagasi* in *L. longipalpis*, few parasites were observed with body and flagella in contact with the epithelial midgut and, not often, with the flagella superficially insert between microvilli. In front of no effective vaccine against the disease and a limited range of drugs to treatment, details in all aspects of parasite biology are desirable to formulation of new strategy of control against protozoa and vector.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses como problema de saúde pública

Protozoários parasitos do gênero *Leishmania* Ross, 1903, são membros da família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), que compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto. As várias espécies do gênero *Leishmania* infectam milhares de pessoas no mundo todo, causando um amplo conjunto de doenças coletivamente denominadas leishmanioses, as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomas (Herwaldt, 1999). As leishmanioses são doenças negligenciadas, relacionadas à pobreza e a conflitos sociais (Desjeux, 2001, 2004; Yamey & Torreele, 2002; Bañuls *et al.*, 2007; Lynn & McMaster, 2008). Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e que, a cada ano, 500 mil desenvolvam a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença. Entretanto, esse número pode estar subestimado, uma vez que as leishmanioses são notificadas somente em 33 dos 88 países nos quais elas ocorrem (WHO, 2006). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de distribuição das leishmanioses tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Desjeux, 2004; WHO, 2006).

Parasitos do gênero *Leishmania* infectam uma variedade de mamíferos e hospedeiros silvestres ou domésticos (Ashford, 1996, 2000). No homem, as leishmanioses são causadas por aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* (Herwaldt, 1999; WHO, 2010) e transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (Desjeux, 2004).

A progressão da doença é dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e das condições genética e imunológica do hospedeiro. O recente aumento na distribuição da doença é devido, em parte, à co-infecções com HIV/AIDS (WHO, 2006). Ainda não existe vacina contra as leishmanioses e, assim como para outras doenças causadas por tripanosomatídeos, o tratamento é dependente de uma limitada variedade de drogas (Croft *et al.*, 2006) que são tóxicas, pouco eficazes e requerem atendimento ambulatorial (revisado por Davies *et al.*, 2003). Outro fator agravante, nesse contexto, é o aparecimento de cepas resistentes em algumas áreas endêmicas (Sundar *et al.*, 2000; Sundar, 2001).

Devido a diferentes combinações de vetores, parasitos, reservatórios, sintomas, condições ecológicas, epidemiológicas e culturais que contribuem para a transmissão de *Leishmania* spp., nenhum método disponível de controle vetorial apresenta-se adequado para controlar todas as populações de flebotomíneos (revisado em Alexander & Maroli, 2003). Além disso, métodos existentes de controle de vetores ou reservatórios são de difícil

implementação e manutenção em países pobres devido ao seu alto custo (Dantas Torres & Brandão Filho, 2006).

Em humanos, as Leishmanioses ocorrem sob duas formas: a Cutânea, a qual inclui a forma Difusa e a Muco-cutânea; e a Visceral (WHO, 2006).

1.1.1 Leishmanioses Cutâneas

As leishmanioses cutâneas freqüentemente apresentam lesões que evoluem de pápulas, para nódulos e desses para lesões ulcerativas ou não. São causadas principalmente por *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) colombiensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi* no Novo Mundo (revisado por Sacks *et al.*, 2008 e Sharma & Singh, 2008). A leishmaniose cutânea difusa, causada principalmente por *L. (L.) amazonensis (Leishmania)* no Novo Mundo, se caracteriza por lesões não ulcerativas que não se curam espontaneamente. A leishmaniose muco-cutânea pode causar extensa destruição das mucosas oral, nasal, laríngea e faríngea, com conseqüentes lesões desfigurantes e é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* no Novo Mundo (Herwald, 1999).

1.1.2 A Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), prevalente em crianças mal nutridas, é a mais grave das formas de leishmaniose tanto no Velho como no Novo Mundo, levando a morte se não tratada. É caracterizada por febre, perda de peso, hepato-esplenomegalia e/ou linfadenopatias e anemia (Desjeux, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005; Chappuis *et al.*, 2007). A doença pode evoluir de forma aguda, subaguda e crônica, mas muitos indivíduos afetados permanecem completamente assintomáticos. Ela causa epidemias em larga escala com alta taxa de mortalidade e, mesmo depois de recuperados, os pacientes podem desenvolver uma forma cutânea crônica chamada leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL – “post-kala-azar dermal leishmaniasis”). A PKDL ocorre, usualmente, após o tratamento da LV causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* (Chappuis *et al.*, 2007).

A LV é uma doença sistêmica causada por *L. (L.) donovani* (África e Índia) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Europa, norte da África e América Latina) (revisado em Mauricio *et al.*, 2000 e Lukes *et al.*, 2007). Parasitos da espécie *L. (L.) infantum* infectam preferencialmente crianças, indivíduos mal nutridos e imunossuprimidos (HIV positivos) (Gramiccia & Grandoni, 2005; Chappuis *et al.*, 2007).

Desde a primeira descrição de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) como uma nova espécie responsável pela doença nas Américas, a nomenclatura e, particularmente, a origem do agente causal da LV nessas áreas tem sido objeto de extensos debates. A controvérsia começou no ano seguinte a descrição de *L. (L.) chagasi*, quando o próprio Cunha (1938) concluiu que o agente da LV nas Américas era idêntico à *L. (L.) infantum* Nicolle, 1908, espécie presente no Mediterrâneo. Com base em pequenas diferenças fenotípicas e genotípicas, alguns autores têm separado *L. (L.) chagasi* de *L. (L.) infantum* (Lainson & Shaw, 1987; Gramiccia *et al.*, 1992). Entretanto, trabalhos mais recentes consideraram *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* como sendo a mesma espécie (Mauricio *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2007). Como esse assunto ainda não foi discutido em fórum específico nesse trabalho *L. (L.) chagasi* não foi considerada sinonímia de *L. (L.) infantum*.

Há dois tipos de LV, as quais diferem em suas características de transmissão: LV zoonótica, transmitida do animal para o vetor e para o humano e LV antroponótica, transmitida de humano a humano pelo vetor. No primeiro, humanos são ocasionalmente hospedeiros e animais, principalmente canídeos, são reservatórios do parasito. LVs antroponóticas são encontradas em áreas de transmissão de *L. (L.) donovani* (Índia) e LVs zoonóticas são encontradas em áreas de transmissão de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (Chappuis *et al.*, 2007).

Vários canídeos selvagens (Deane & Deane, 1955; Deane, 1956; Silva *et al.*, 2000) e roedores sinantrópicos (Oliveira *et al.*, 2005) podem servir de reservatórios para *L. (L.) chagasi*. Já os reservatórios domésticos são representados por cães (França-Silva *et al.*, 2003).

A LV é considerada endêmica em 65 países (Desjeux, 2004), sendo prevalente em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2006). Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em áreas rurais e suburbanas economicamente desfavorecidas, particularmente no subcontinente da Índia, Leste da África e Américas Central e do Sul, com o Brasil contribuindo para maior parte dos casos do Novo Mundo (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Berman, 2006). Entretanto, nos últimos 20 anos, a doença, que antes era restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões e alcançou grandes centros urbanos (Ashford, 2000; Gontijo & Melo, 2004; Costa *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2007,

2009; Cerbino Neto *et al.*, 2009). Atualmente, a LV ocorre em 23 dos 27 estados brasileiros, destacando-se aqueles da região Nordeste, nos quais ocorre a maior parte dos casos notificados (Ministério da Saúde, 2010).

1.2 Vetores naturais

Os vetores das leishmanioses são conhecidos como flebotomíneos, dípteros da família Psychodidae. Os flebotomíneos são holometábolos e seu desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estádios larvais, pupa e adulto. Esses insetos são pequenos (raramente excedem três milímetros), frágeis e com o corpo densamente coberto por finas cerdas. Sua coloração varia do quase branco para o quase negro (dependendo da espécie) e quando em repouso esses insetos mantêm suas asas em posição semi-ereta (Killick-Kendrick, 1999). Flebotomíneos voam em curtos saltos e a maioria das espécies neotropicais raramente voa para longe de seus abrigos (Chaniots *et al.*, 1974).

Flebotomíneos adultos estão adaptados a viver em abrigos úmidos e escuros, como os observados nas florestas tropicais. Contudo, seus criadouros são de difícil localização na natureza, sendo que as larvas alimentam-se de matéria orgânica do solo (Ferro *et al.*, 1997) e os adultos, tanto fêmeas quanto machos, de fontes naturais de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar) (revisado em Rangel e Lainson 2003; Petts *et al.*, 1997). Além de açúcar, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para a ovogênese (Adler, 1964; Schlein & Warburg, 1986; Young & Lawyer, 1987; Killick-Kendrick, 1999), embora algumas espécies produzam ovos no seu primeiro ciclo gonotrófico sem a necessidade de sangue (Johnson, 1961; Brazil & Oliveira, 1999). Trabalhos realizados no Novo Mundo tem revelado a existência de variações inter-específicas no padrão de atividade dos flebotomíneos, com algumas espécies demonstrando preferência por períodos crepusculares e outros por noturnos (González *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2005). Mas existem exceções, como por exemplo, a espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) wellcomei*, que pica principalmente durante o dia (Sharma & Singh, 2008). A preferência pelo tipo de hospedeiro para obtenção de sangue também varia entre as espécies de flebotomíneos. Algumas espécies têm preferência limitada a poucos hospedeiros animais, enquanto outras demonstram um amplo comportamento "oportunista" (Tesh *et al.*, 1971; Quinnell *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1993; Borgiorno *et al.*, 2003; Nery *et al.*, 2004; Muniz *et al.*, 2006; Dias-Sversutti *et al.*, 2007; Missawa *et al.*, 2008). Claramente, os flebotomíneos "oportunistas" são melhores vetores porque são expostos a uma maior variedade de hospedeiros potencialmente infectados (Sacks *et al.*, 2008).

A maioria das espécies de flebotomíneos são gonotróficas concordantes, que fazem somente um repasto por oviposição. Espécies que fazem mais de um repasto por oviposição são gonotróficas discordantes. Esse comportamento possibilita um aumento do contato vetor-hospedeiro e, conseqüentemente, aumenta as chances do inseto tornar-se infectado e transmitir *Leishmania*. Além disso, o desenvolvimento dos parasitos no intestino do vetor parece não ser afetado pela ocorrência de múltiplos repastos em um único ciclo gonotrófico (ElNaeiem *et al.*, 1994). Dependendo da espécie de flebotomíneo e das condições ambientais, uma variável proporção de fêmeas sobrevive a oviposição e sofre múltiplos ciclos gonotróficos (Mukhopadhyay & Ghosh, 1999). Cada ciclo adicional requer pelo menos um novo repasto sanguíneo, aumentando assim a possibilidade da transmissão de *Leishmania*.

De acordo com sua distribuição geográfica e características morfológicas, os flebotomíneos são distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Aproximadamente 1000 espécies de flebotomíneos foram descritas até o momento, e dessas, cerca de 30 são vetores comprovados ou suspeitos na transmissão de *Leishmania* (Desjeux, 2004). De fato, há uma relação consideravelmente seletiva entre parasitos e vetores, o que é resultado de fatores ecológicos e moleculares (revisado em Bates, 2008). Cada uma das 21 ou mais espécies de *Leishmania* de importância médica (Herwaldt, 1999; WHO, 2006) é, usualmente, transmitida somente por poucas espécies de flebotomíneos (Killick-Kendrick, 1985; revisado por Sacks *et al.*, 2008). De acordo com Killick-Kendrick (1999), para ser considerado um vetor o flebotomíneo deve: (1) se alimentar em humanos e, se a doença for zoonótica, no reservatório animal; (2) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (3) possuir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes e; (4) ser capaz de transmitir o parasito pela picada.

1.2.1 Vetores da Leishmaniose Visceral

No Velho Mundo, diversas espécies estão envolvidas na transmissão da LV, como por exemplo, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *argentipes*, *Phlebotomus* (*Larrousius*) *pernicius*, *Phlebotomus* (*Larrousius*) *ariasii* e *Phlebotomus* (*Larrousius*) *neglectus* (revisado por Sacks *et al.*, 2008). Já no Novo Mundo, *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é, comprovadamente, o principal vetor da LV (Lainson *et al.*, 1977). Vale ressaltar que *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *antunesi* (Ryan *et al.*, 1984), *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (Santos *et al.*, 1998; Pita-Pereira *et al.*, 2008) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *forattinii* (Pita-Pereira *et al.*,

2008) já foram incriminados como potenciais vetores de *L. (L.) chagasi* no Brasil, entretanto, estudos ainda são necessários para comprovação dessas espécies como vetores de LV pelos conceitos universalmente aceitos de Killick-Kendrick (1999).

Lutzomyia (L.) longipalpis apresenta ampla distribuição geográfica desde o Sul do México até o Norte da Argentina e Paraguai, distribuição coincidente com a presença de LV nessas regiões. Esse inseto também tem habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos, incluindo aqueles resultantes de ação antrópica (Young & Duncan, 1994). O isolamento geográfico que ocorre entre as numerosas populações de *L. (L.) longipalpis* favorece o processo de divergência genética e a especiação (Lanzaro *et al.*, 1993; Lanzaro & Warburg 1995; Bauzer *et al.*, 2007; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008). Em 1969, Mangabeiras levantou a possibilidade de *L. (L.) longipalpis* ser um complexo de espécies após duas formas distintas da espécie terem sido encontradas em diferentes condições ecológicas. A hipótese de Mangabeiras foi o ponto de partida para décadas de discussões sobre a real condição do principal vetor da LV na América Latina (revisado em Bauzer *et al.*, 2007). Por meio de diversas metodologias, trabalhos recentes têm considerado *L. (L.) longipalpis* tanto como um complexo de espécies (Lanzaro *et al.*, 1999; Uribe, 1999; Souza *et al.*, 2002, 2004; Bottechia *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2005; Bauzer *et al.*, 2007; Abreu *et al.*, 2008; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008; Araki *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009), como única espécie (Azevedo *et al.*, 2000; Queiróz Balbino *et al.*, 2006). Contudo, a determinação da existência do complexo longipalpis ainda está sendo discutida em fórum específico (Pimenta, comunicação pessoal).

1.3 Interação *Leishmania*-hospedeiro

Parasitos digenéticos do gênero *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida, que envolve diversas formas de desenvolvimento (Killick-Kendrick, 1979; Sacks & Perkins, 1984). Essas formas representam adaptações às mudanças nas condições ambientais sofridas pelos parasitos dentro dos hospedeiros mamífero e flebotomíneo (Walters *et al.*, 1987). O parasito possui duas formas morfológicas principais: amastigotas intracelulares, que são células ovóides, imóveis e sem flagelo aparente encontradas em fagócitos mononucleados de mamíferos e responsáveis pela patologia da doença e promastigotas, que são células alongadas, flageladas e móveis encontradas no intestino do vetor.

1.3.1 Interação parasito-hospedeiro vertebrado

Durante a picada, fêmeas de flebotomíneos infectadas inoculam na pele do hospedeiro as formas infectantes promastigotas metacíclicas (Killick-Kendrick, 1990). Estas são fagocitadas pelos macrófagos, diretamente ou após a infecção de neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o sítio da picada (van Zandbergen *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2009). Recentemente, 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). Neutrófilos têm sido descritos como células hospedeiras temporárias de *Leishmania*, pois permitem uma entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, que facilmente ingerem neutrófilos apoptóticos infectados. Esta teoria tem sido nomeada "Cavalo de Tróia" (van Zandbergen *et al.*, 2004).

Promastigotas internalizadas pelo macrófago diferenciam-se em pequenas formas amastigotas no fagolisossomo. Amastigotas proliferam por divisão binária e podem invadir outros macrófagos bem como outras células fagocíticas (como por exemplo, células dendríticas) ou não fagocíticas (como por exemplo, fibroblastos) (Naderer & McConville, 2008).

1.3.2 Interação parasito-vetor

1.3.2.1 Eventos fisiológicos da digestão sanguínea nos flebotomíneos

Quando uma fêmea faz o repasto sanguíneo, o sangue ingerido passa do esôfago para o intestino médio via válvula do estomodeu, que regula o fluxo de entrada de alimento no intestino (Figura 1). Imediatamente, o sangue começa a ser envolvido pela matriz peritrófica (MP), secretada pelo epitélio intestinal e composta de quitina, proteínas e glicoproteínas (Walters *et al.*, 1993, 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Diversos papéis têm sido descritos para a MP, incluindo a proteção das células do epitélio intestinal contra possíveis danos causados pelo conteúdo do alimento sanguíneo, barreira contra a patógenos (Walters *et al.*, 1992; Terra, 2001) e substrato de ligação para detoxificação de heme (Pascoa *et al.*, 2002). A produção de enzimas digestivas é induzida pela presença de sangue (Dillon & Lane 1993b; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2003; Telleria *et al.*, 2007) e a MP é permeável à passagem dessas enzimas, permitindo assim a ocorrência da digestão. O pico de atividade das proteases do intestino depende da espécie de flebotomíneo e da fonte e do volume de sangue, mas, em geral, ocorre em torno de 24-48 horas após o repasto e retorna a níveis basais em cerca de 72 horas (Borovsky & Schlein, 1987; Dillon & Lane, 1993b; Ramalho-Ortigão *et al.*,

2003). A presença de sangue no intestino do inseto induz diurese para que haja o restabelecimento da homeostase e simultaneamente, a distensão do intestino induz peristaltismo. A atividade da quitinase produzida pelo flebotomíneo pode ser detectada entre 24 e 72 horas após o repasto, mas a atividade máxima ocorre aproximadamente em 48 horas (Ramalho-Ortigão & Traub-Cseko, 2003, Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005) e coincide com o período de degradação da MP. O conteúdo digerido passa para o intestino posterior via piloro, íleo e reto e é liberado. Os nutrientes derivados da alimentação são utilizados para o desenvolvimento de ovos, e quando esses estão maduros a fêmea já está apta a um novo repasto sanguíneo.

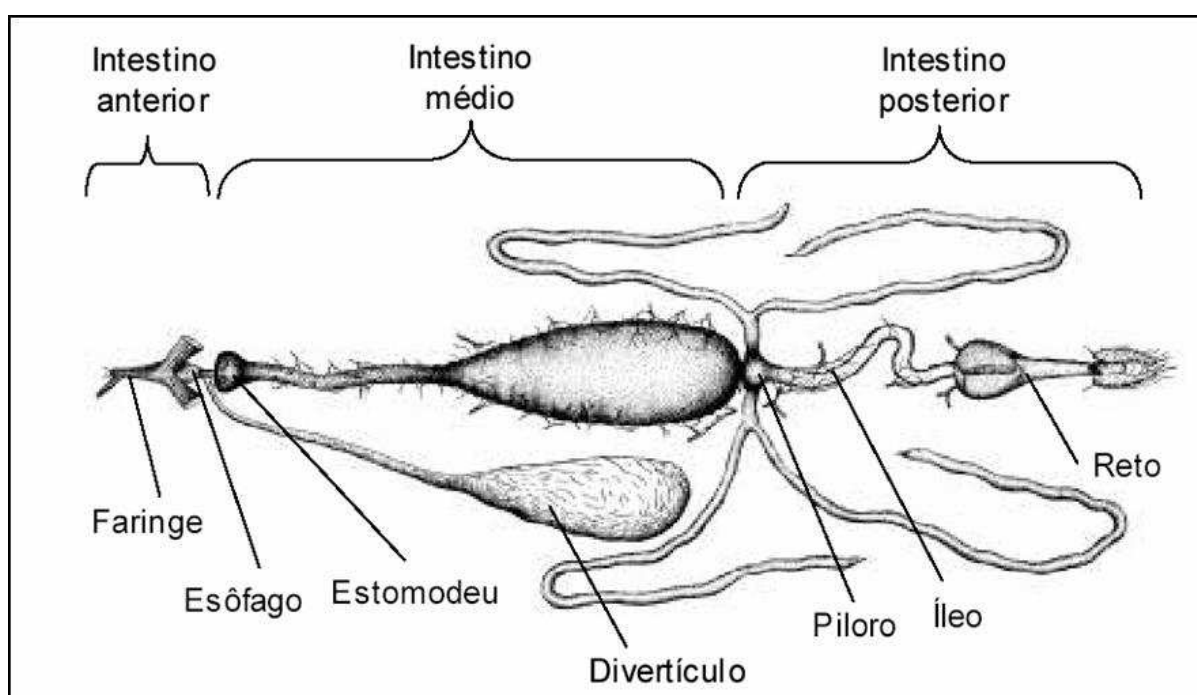


Figura 1: Desenho esquemático do tubo digestivo dissecado de *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi* (Jobling, 1987).

1.3.2.2 Ciclo de vida da *Leishmania* no vetor

O ciclo do parasito se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta sobre um hospedeiro infectado e ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue. Uma vez diferenciadas em promastigotas, os parasitos exibem uma distribuição preferencial dentro do trato digestivo do vetor, formando “micro-habitats”, o que levou Lainson & Shaw (1987) a proporem a classificação das espécies de *Leishmania* como suprapiláricas ou peripiláricas.

Parasitos com comportamento peripilárico estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento. Esses parasitos pertencem ao subgênero *Viannia*, cujos representantes são unicamente encontrados no Novo Mundo.

A maior parte das espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos tem comportamento suprapilárico. O desenvolvimento desses parasitos é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Semelhante ao comportamento peripilárico, os parasitos migram para as porções mais anteriores, onde podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado (Lainson & Shaw, 1987). Parasitos com comportamento suprapilárico pertencem ao subgênero *Leishmania*, o qual inclui a espécie em estudo *L. (L.) chagasi*.

Os parasitos enfrentam mudanças adversas durante a passagem do hospedeiro mamífero para o flebotomíneo (Killick-Kendrick, 1990; Bates & Rogers, 2004; Kamhawi, 2006). Para sobreviver a variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes e oxigênio, os parasitos diferenciam-se em formas altamente especializadas que se distinguem quanto ao seu requerimento nutricional, taxa de crescimento e habilidade de se dividirem, regulação da expressão de moléculas de superfície e também em sua morfologia (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; McConville & Handman, 2007 e Besteiro *et al.*, 2007). Diversos trabalhos utilizam variadas denominações para esses morfotipos, os quais já foram observados tanto em cultura quanto no vetor (Walters, 1993; Nieves & Pimenta, 2000, 2002; Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003; Bates & Rogers, 2004).

No presente estudo, foram adotadas as denominações descritas por Lawyer e colaboradores (1990): promastigotas procíclicas (formas pequenas e volumosas com 3-12 μm de comprimento e um flagelo geralmente curto), promastigotas nectomonas (formas longas, delgadas, medindo 12-19 μm de comprimento e com flagelo longo), promastigotas paramastigotas (formas em forma de pêra ou ovalares com 3,5-9 μm de comprimento, núcleo justaposto ao cinetoplasto e flagelo de comprimento variável), promastigotas haptomonas (formas largas com corpo celular pequeno medindo 5-12 μm e flagelo de comprimento

variável) e promastigotas metacíclicas (formas finas e curtas medindo 6-10  e com flagelo longo) (Figura 2). Tal nomenclatura tem sido utilizada em vários trabalhos sobre o estabelecimento de diferentes espécies de *Leishmania* no seu vetor (Lawyer *et al.*, 1990; Sacks *et al.*, 1985; Saraiva *et al.*, 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Nieves & Pimenta, 2000, 2002; Miranda *et al.*, 2008).

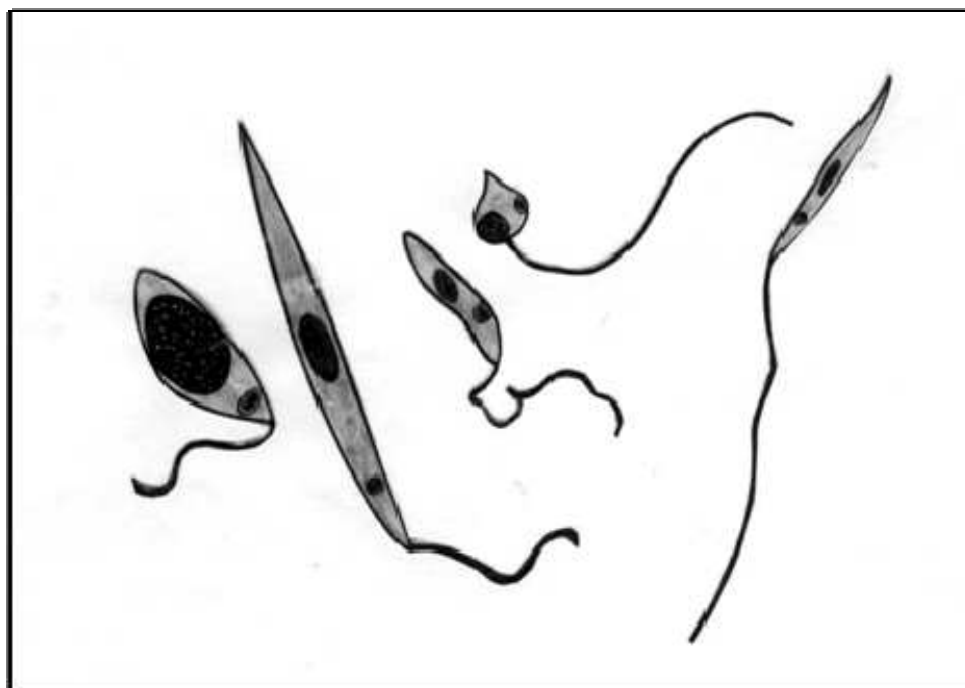


Figura 2: Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania* de acordo com a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) (Desenho de Paulo Pimenta). Da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica.

Como a espécie *L. (L.) chagasi* possui desenvolvimento suprapilárico no seu vetor natural *L. (L.) longipalpis*, serão discutidas, a seguir, características consistentes ao ciclo de vida de parasitos com desenvolvimento suprapilárico em seus vetores naturais.

O ciclo de vida do parasito pode ser dividido em três estágios relativos à digestão sanguínea e à progressão do ciclo gonotrófico no vetor, discutidos a seguir.

Primeiro estágio: 0-2 dias

No primeiro estágio, que ocorre de 0 a 2 dias após a alimentação sanguínea infectante, o desenvolvimento do parasito ocorre no bolo sanguíneo dentro do intestino abdominal. O processo de transformação das amastigotas ingeridas em promastigotas inicia-se entre 6 e 12 horas após o repasto, enquanto o sangue é envolvido pela matriz peritrófica (Lawyer *et al.*, 1987, 1990; Secundino *et al.*, 2005). Nesse período, promastigotas procíclicas originadas das amastigotas sofrem múltiplas divisões e entre 36-48 horas se diferenciam em nectomonas.

Segundo estágio: 2-5 dias

No segundo estágio, de 2 a 5 dias após o repasto, a MP se degenera e o conteúdo parcialmente digerido do intestino inicia sua passagem através do piloro e íleo. Esse evento é acompanhado de intensa multiplicação das formas procíclicas e completa transformação em nectomonas, que preenchem o intestino abdominal anterior. Muitas nectomonas ancoram-se via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal e, dessa forma, evitam sua expulsão durante a liberação do bolo fecal. Nectomonas migram para região anterior do intestino médio e originam formas curtas e largas denominadas haptomonas. Essas sofrem um segundo ciclo de multiplicação e são embebidas e imobilizadas por um gel produzido pelos parasitos chamado PSG (*promastigote secretory gel*) (Rogers *et al.*, 2002, 2004; Gossage *et al.*, 2003). Haptomonas podem se ligar à região da cárdia e à válvula do estomodeu por meio de estruturas tipo hemidesmossomos do flagelo (Killick-Kendrick *et al.*, 1974b) provocando um grande acúmulo de parasitos nessa região ou então ligarem-se umas às outras formando um plug físico concêntrico (Lawyer *et al.*, 1990; Sacks & Kamhawi, 2001). Nesse momento, os ovos do flebotomíneo se encontram quase maduros.

Terceiro estágio: após 5 dias

Durante o estágio final, 5 dias ou mais após o repasto sanguíneo, o intestino está livre do bolo fecal, o desenvolvimento dos ovos está completo e a oviposição é iniciada. Uma massa de parasitos pode ser observada na válvula do estomodeu e outra parte desses parasitos permanece embebida no PSG, formando um plug que se estende para o intestino torácico aumentando o bloqueio já existente na válvula do estomodeu. Finalmente, formas

metacíclicas surgem próximo a válvula do estomodeu. Elas têm um corpo celular pequeno, flagelo longo, não se dividem e são altamente ativas. Diferente das outras formas de desenvolvimento, que permanecem imóveis por estarem ligadas à região válvula do estomodeu ou presas ao PSG, as formas metacíclicas são altamente móveis e livres tanto para migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probócide, possibilitando assim a sua transmissão, como para retornar ao intestino médio.

O tempo necessário para que o parasito complete seu ciclo de vida no flebotomíneo é de aproximadamente 6 a 9 dias, dependendo da espécie (revisado por Kamhawi, 2006). O processo de diferenciação de promastigotas procíclicas em metacíclicas, chamado metaciclogênese, coincide com a procura do vetor por outro repasto sanguíneo, fator determinante na transmissão de *Leishmania* (Sacks & Perkins, 1984; Lawyer *et al.*, 1990). De maneira geral, nesse momento, uma fêmea de flebotomíneo (infectada ou não por *Leishmania* sp.), já teve acesso a substâncias açucaradas e complementa o repasto sanguíneo com a ingestão de carboidratos (Schlein, 1986). Esses carboidratos têm um papel importante na migração das promastigotas para as regiões mais anteriores do tubo digestivo por meio de um processo quimiotático (Barros *et al.*, 2006) e é provável que constituam um fator nutricional importante para o desenvolvimento dos parasitos.

A infecciosidade das promastigotas de culturas em fase estacionária é maior do que em fase logarítmica (Sacks *et al.*, 1985), e um fenômeno similar ocorre durante o desenvolvimento dos parasitos no vetor (Sacks & Perkins, 1984, 1985).

Os mecanismos que engatilham a metaciclogênese *in vivo* ainda são pobremente conhecidos. A única condição em cultura que tem claramente demonstrado aumentar a metaciclogênese *in vitro* é o pH ácido (Zakai *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que outros fatores extrínsecos possam operar sincronicamente para promover a metaciclogênese no flebotomíneo, tais como condições anaeróbicas (Mendez *et al.*, 1999), declínio dos níveis de tetrahydrobiopterina (um co-fator essencial para a atividade catalítica da óxido nítrico sintetase e subproduto da redução de biopterina) (Cunningham *et al.*, 2001), ausência de hemoglobina (Schlein & Jacobson, 1994) e exposição à saliva do flebotomíneo (Charlab *et al.*, 1995).

1.3.2.3 Mecanismos de transmissão pela picada

Fêmeas de flebotomíneos usam suas peças bucais, que são relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, formando um pequeno poço de sangue no qual elas podem se alimentar (telmatofagia) (Ribeiro, 1987).

Recentemente, foi demonstrado por PCR em tempo real do tecido picado que *P. (P.) papatasi* infectado com *L. (L.) major* pode inocular de 100 a 100.000 parasitos. A distribuição da dose apresentou perfil binomial: cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 600 ou menos promastigotas, enquanto os demais liberaram mais de 1000 células. Altas doses de infecção foram associadas a intestinos fortemente infectados, com mais de 30.000 parasitos (Kimblin *et al.*, 2008).

Killick-Kendrick e Molyneaux (1981) sugeriram um mecanismo de transmissão no qual formas metacíclicas interferem diretamente nas sensilas das partes bucais que controlam a sondagem e alimentação, influenciando na taxa e direcionamento do material no canal alimentar e promovendo a liberação dos parasitos na pele. Outros autores, entretanto, relacionam a transmissão a bloqueios 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, 1989a; Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002). Essa obstrução, comum em todas as combinações *Leishmania*-vetor estudadas até o momento (Stierhof *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2002, 2004), é causada por proteofosfoglicanos (PPGs) tipo mucina secretados pelos parasitos. Em altas concentrações e sob o limitado volume do intestino do flebotomíneo os PPGs são condensados sob a forma do já citado PSG (Stierhof *et al.*, 1999).

O bloqueio causado pelo PSG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, que aumenta 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). Essas mudanças no comportamento do inseto podem favorecer a deposição de mais parasitos, PSG e saliva antes que o flebotomíneo possa realizar o repasto com sucesso (Rogers *et al.*, 2004). O PSG regurgitado juntamente com os parasitos atua como um potente fator de virulência (Bates & Rogers, 2004; Rogers *et al.*, 2004) adicional à saliva. Rogers e colaboradores (2004) demonstraram que o componente ativo do PSG é a parte glicana dos filamentos de proteofosfoglicanos (fPPG), que são os principais constituinte desse gel.

Recentemente foi sugerido que a quantidade de PSG de *L. (L.) mexicana* regurgitado por *L. (L.) longipalpis* seja proporcional ao tamanho da infecção original no flebotomíneo e ao número de parasitos transmitidos. Além disso, o PSG foi capaz de exacerbar a infecção de uma ampla variedade de doses de parasitos (10 a 10.000 parasitos) (Rogers *et al.*, 2009). Essa exacerbação foi atribuída a duas propriedades fundamentais do PSG: grande capacidade de recrutar macrófagos para o sítio da infecção e aumentar a expressão e atividade de arginase nessas células, intensificando a síntese de moléculas requeridas para o crescimento do parasito internalizado.

A presença do gel e dos parasitos no intestino torácico também altera o funcionamento da válvula do estomodeu. Essa válvula fica aberta por mais tempo, aumentando o refluxo de sangue e parasitos no local da picada (Schlein *et al.*, 1992, Rogers *et al.*, 2004; Rogers & Bates, 2007). Além disso, sua abertura é presumivelmente essencial para a expansão da infecção para o intestino anterior (Rogers *et al.*, 2002). Alguns autores também sugerem que quitinases produzidas pelos parasitos possam causar uma disfunção na válvula do estomodeu (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004) e, dessa forma, aumentar a transmissão das leishmanias.

A saliva também tem um importante papel na transmissão de *Leishmania*. A saliva dos flebotomíneos é um rico conjunto de componentes com atividades farmacológicas, tais como vasodilatadoras, anti-agregadoras plaquetárias, anti-hemostáticas, imunossupressoras, exacerbadoras da infecção e indutoras de infecciosidade de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado (revisado em Kamhawi, 2000 e Soares & Turco, 2003).

Para diversas espécies de *Leishmania*, a co-injeção de parasitos com homogenados de glândula salivar de *L. (L.) longipalpis* ou *P. (P.) papatasi* produzem um aumento substancial no tamanho da lesão (Titus & Ribeiro, 1988; Theodos *et al.*, 1991; Belkaid *et al.*, 1998; Donnelly *et al.*, 1998; revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; Norsworthy *et al.*, 2004), quando comparados ao controle injetado somente com parasitos. Entretanto, informações sobre as moléculas responsáveis pelo efeito dessa exacerbação ainda são pouco conhecidas. A apirase e o maxadilam são as moléculas mais estudadas. Apirase é uma enzima com atividade anti-agregação plaquetária que tem sido encontrada em ambos os gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Ribeiro *et al.*, 1986, 1989). Ao contrário da apirase, o maxadilam foi unicamente encontrado em *L. (L.) longipalpis*. A habilidade de o maxadilam exacerbar a infecção por *Leishmania* já foi demonstrada *in vivo*. No modelo murino, as injeções de maxadilam com *L. (L.) major* produziram lesões 2-3 vezes maiores que o controle e continha um número de parasitos 400 vezes maior (Titus & Mbow, 1999). Além disso, Morris e colaboradores (2001) demonstraram que maxadilam exacerba a infecção por *Leishmania* na mesma proporção que a saliva total. De fato, o maxadilam tem diversos efeitos sobre macrófagos, o que poderia explicar a sua habilidade em exacerbar a infecção e prolongar a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Rogers & Titus, 2003). As espécies do complexo *L. (L.) longipalpis* diferem na quantidade e subtipos de maxadilam da saliva (Warburg *et al.*, 1994). Em espécies de *L. (L.) longipalpis* da Costa Rica, que produzem pouco maxadilam, a infecção por *Leishmania* tem uma aumentada proliferação cutânea. Inversamente, em espécies do Brasil, que produzem mais maxadilam, ocorre a visceralização da infecção (Warburg *et al.*, 1994). Como já foi

citado, esse importante peptídeo não foi encontrado em espécies do gênero *Phlebotomus*, incluindo *P. (P.) papatasi*, que também apresenta o efeito de exacerbação pela saliva (Kamhawi *et al.*, 2000a). Nessa espécie, a atividade farmacológica da saliva tem sido atribuída a adenosina e a seu precursor 5' AMP (Ribeiro *et al.*, 1999).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a imunidade provocada pela saliva de flebotomíneos permite ao hospedeiro desenvolver proteção contra a infecção por *Leishmania*. Em modelo animal, camundongos imunizados com homogenado de glândula salivar de *P. (P.) papatasi* ou pré-expostos a picadas de flebotomíneos não infectados foram protegidos contra infecção por *L. (L.) major* derivada de inoculação via agulha (Belkaid *et al.*, 1998) ou pela picada do flebotomíneo (Kamhawi *et al.*, 2000a). Trabalhos mais recentes têm demonstrado que diferentes proteínas salivares conferem proteção contra leishmaniose cutânea e visceral (Gomes *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2009). Entretanto, tem sido sugerido que a proteção por pré-imunização seja flebotomíneo espécie-específica (Thiakaki *et al.*, 2005; Drahota *et al.*, 2009).

Os flebotomíneos ingerem parte da saliva secretada por eles durante o processo de alimentação. Essa saliva entra em contato com os parasitos em desenvolvimento dentro do intestino médio do flebotomíneo e esse contato inicial influencia na virulência e na diferenciação das formas infectantes. (Charlab *et al.*, 1993; Cavalcanti *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos sugerem que na presença de homogenados de glândula salivar, macrófagos sejam incapazes de produzir óxido nítrico (Theodos & Titus 1993; Titus & Ribeiro 1990; Waitumbi & Warburg, 1998; Norsworthy *et al.*, 2004), que tem atividade leishmanicida. Entretanto, também tem sido relatado que a saliva e o PSG, isolados ou em combinação, não influenciam a geração do óxido nítrico pelos macrófagos (Rogers *et al.*, 2009).

A saliva de *L. (L.) longipalpis* e *P. (P.) papatasi* também possui fatores quimiotáticos para macrófagos (Anjili *et al.*, 1995; Zer *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2005). Rogers e colaboradores (2009) demonstraram que o recrutamento dessas células em camundongos Balb/C injetados com saliva de *L. (L.) longipalpis* foi 5 vezes maior do que naqueles injetados com salina. Entretanto, para grupos injetados com PSG esse aumento foi de 108 vezes. Quando PSG e saliva foram inoculados juntos a atração foi aumentada para 224 vezes, indicando a existência de um sinergismo para a quimiotaxia dos macrófagos (Rogers *et al.*, 2009).

Todos os trabalhos sobre o efeito da saliva do vetor na exacerbação ou proteção contra a infecção por *Leishmania* têm sido desenvolvidos com vetores colonizados em laboratório.

Entretanto, utilizando o modelo murino, trabalhos recentes têm demonstrado significativas diferenças no efeito de exacerbação causado por lisados de glândulas salivares de *L. (L.) longipalpis* criados em laboratório (colonizados) ou capturados no campo (Laurenti *et al.*, 2009a, 2009b). Quando co-inoculada com parasitos, a saliva dos flebotomíneos colonizados apresentou um efeito de exacerbação mais forte, causando lesões duas vezes maiores do que aquelas provocadas pela inoculação dos parasitos com saliva de flebotomíneos capturados no campo. Além disso, foi sugerido que a saliva dos insetos capturados no campo não possui os mesmos fatores quimiotáticos verificados na saliva de flebotomíneos colonizados. A composição e quantidade de proteínas observadas na saliva dos dois grupos também foram substancialmente diferentes (Laurenti *et al.*, 2009a). Em outro trabalho, os mesmos autores sugeriram que essa diferença poderia explicar o menor efeito na modulação da infecção por *Leishmania* observado em camundongos co-inoculados com parasitos e saliva de flebotomíneos do campo, quando comparados àqueles co-inoculados com parasitos e saliva de flebotomíneos colonizados (Laurenti *et al.*, 2009b).

1.4 Barreiras ao desenvolvimento de *Leishmania* no flebotomíneo

Para completar o seu desenvolvimento no vetor o parasito precisa vencer diversas barreiras, sendo a expressão de moléculas específicas do parasito um evento crucial para esse processo. A ação de enzimas digestivas produzidas pelo intestino pode matar os parasitos no bolo sanguíneo, a matriz peritrófica constitui uma barreira física para a migração dos parasitos para a parte anterior do intestino e a excreção do bolo fecal pode resultar na perda da infecção.

1.4.1 Sobrevivência dos parasitos dentro do bolo sanguíneo

Susceptibilidade dos parasitos às enzimas digestivas

A ingestão de sangue induz a síntese e secreção de enzimas digestivas no lúmen tais como tripsina, quimotripsina, aminopeptidases, carboxipeptidases e glicosidases, que recentemente foram identificadas em sequências expressas (ESTs) de *L. (L.) longipalpis* e *P. (P.) papatasi* (Dillon *et al.*, 2006; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008). Essas enzimas são liberadas no espaço ectoperitrófico e passam através da MP para digerir o sangue. Adler (1938) foi o primeiro a investigar como a digestão do sangue nas fases iniciais da infecção de *P. (P.) papatasi*, que somente transmite *L. (L.) major*, poderia explicar a

resistência natural do vetor a outras espécies de *Leishmania*. Com a diminuição da porcentagem de soro no sangue da alimentação, ele observou que a taxa de infecção aumentou em espécies que normalmente não infectam *P. (P.) papatasi*. O autor atribuiu tal aumento a diminuição dos componentes do soro que induzem proteases. Dessa forma, ele sugeriu que os produtos da digestão eram os responsáveis pela destruição dos parasitos. Reduzido número de parasitos, mortos ou danificados, tem sido observado em intestino de flebotomíneos infectados com espécies de *Leishmania* não compatíveis 2-3 dias após o repasto (Lawyer *et al.*, 1990; Schlein & Jacobson, 1998). Pimenta e colaboradores (1997) observaram que o ambiente intestinal também é danoso para *L. (L.) major*, espécie capaz de completar seu desenvolvimento em *P. (P.) papatasi*, já que 50% dos parasitos do inóculo inicial morreram nas primeiras horas após o repasto sanguíneo. A idéia de Adler que as condições danosas para parasito ocorrem devido às altas concentrações de enzimas proteolíticas foi posteriormente validada por estudos que mostraram um aumento na sobrevivência de *L. (L.) donovani* em *P. (P.) papatasi* em alimentações realizadas sem soro (apenas eritrócitos, salina e amastigotas) (Schlein & Jacobson, 1998). O aumento da sobrevivência foi correlacionado com o retardo e a diminuição nos níveis de atividade das proteases. Outros tratamentos com capacidade de reduzir a atividade proteolítica, tais como a adição de inibidor de tripsina ao sangue, também promoveram a sobrevivência inicial de *L. (L.) donovani* no intestino de *P. (P.) papatasi* (Borovsky & Schlein, 1987). Em um experimento similar, Pimenta e colaboradores, 1997 promoveram a sobrevivência inicial de *L. (L.) major* em *P. (P.) papatasi*. Esse estudo detalhou também o importante papel da MP na redução da taxa de difusão das enzimas digestivas para dentro do bolo sanguíneo e no retardo da exposição do sangue e parasitos ao processo digestivo. A rápida difusão das enzimas em flebotomíneos tratados com quitinase, que bloqueia a produção da MP, foi sugerida como responsável pela mortalidade inicial dos parasitos durante sua transição de amastigotas para promastigotas. Os autores sugeriram que a perda da MP exacerba as condições letais que normalmente existem durante o processo digestivo, já que a morte de parasitos nos períodos iniciais da digestão também foi observada nos flebotomíneos controle.

Os estudos acima suportam a hipótese que a concentração e o tempo de exposição às enzimas proteolíticas presentes no intestino durante o desenvolvimento do parasito podem influenciar a competência vetorial dos flebotomíneos e que a modulação dessas enzimas pelo parasito (discutido abaixo) poderia conferir uma vantagem seletiva para a sua sobrevivência.

É importante citar que os flebotomíneos também produzem glicosidades digestivas, incluindo amilase e glicosidases, as quais têm sua produção aumentada após a

alimentação de açúcar e, em alguns casos, de sangue (Gontijo *et al.*, 1998, Jacobson & Schlein, 2001). Ainda não existem indicações de que infecções por *Leishmania* modulem os níveis de glicosidades no intestino do flebotomíneo ou que essas enzimas sejam prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento do parasito. É mais provável que a digestão de carboidratos produza uma importante fonte de monossacarídeos para o metabolismo dos parasitos (Sacks *et al.*, 2008).

Inibição da digestão em flebotomíneos infectados

Baseado nos resultados descritos acima tem sido proposto que algumas espécies de parasitos possam desenvolver estratégias para superar os efeitos danosos das enzimas digestivas, inibindo ou retardando o pico de atividade enzimática (revisado em Sacks & Kamhawi, 2001). As enzimas proteolíticas produzidas por *P. (P.) papatasi* foram inibidas ou retardadas em infecções com *L. (L.) major*, mas não com *L. (L.) donovani* (Schlein & Romano, 1986; Borovsky & Schlein, 1987). Similarmente, Dillon e Lane (1993a) relataram que a inclusão de amastigotas de *L. (L.) major* ao sangue do repasto retardava e diminuía o pico de atividade de proteases no intestino de *P. (P.) papatasi*. Entretanto, a sobrevivência de *L. (L.) major* em *P. (P.) papatasi* também tem sido observada na ausência de qualquer inibição ou retardo no pico de atividade de proteases durante a infecção (Pimenta *et al.*, 1997). Até o momento, a única outra espécie para a qual o efeito da *Leishmania* sobre a atividade de proteases foi investigado foi *Phlebotomus (Larrousius) langeroni*, que é considerado vetor potencial de *L. (L.) infantum* e um vetor não natural de *L. (L.) major*. Nas primeiras 48 horas, foi observada uma redução na atividade enzimática e uma digestão mais lenta de proteínas nos insetos infectados com sangue contendo *L. (L.) infantum*, quando comparados a insetos alimentados somente com sangue ou com sangue contendo *L. (L.) major*. Entretanto, não houve correlação entre os níveis de atividade proteolítica e a sobrevivência das promastigotas no intestino (Daba *et al.*, 1997) e, em cada caso, foi observada a sobrevivência dos parasitos até 16 dias após a infecção.

A idéia de que a sobrevivência dos parasitos depende, pelo menos em parte, da modulação da atividade proteolítica no intestino foi reforçada em experimentos que fizeram a exposição *in vitro* por 1-2 horas de *L. (L.) major* a lisados de um único intestino de *P. (P.) papatasi* (Pimenta *et al.*, 1997). Amastigotas recém retiradas de tecido infectado e promastigotas totalmente diferenciadas foram mais resistentes à morte do que parasitos em estágio inicial de transição amastigota-promastigota (2-8 horas), que tiveram uma redução de mais de 95% no número de parasitos viáveis quando comparados ao controle. Esses

resultados são consistentes com aqueles de Dilon e Lane (1993a), que indicaram que promastigotas totalmente diferenciadas se desenvolveram na presença de tripsina em cultura. Esses resultados sugerem que diferenças na sobrevivência dos parasitos dentro do intestino do flebotomíneo nos períodos iniciais de digestão relacionadas à espécie ou cepa-específica, particularmente em infecções iniciadas com amastigotas, possam ser devido a diferenças na cinética dos estágios de transformação. O atraso de uma ou poucas horas poderia expor formas transicionais vulneráveis a concentrações letais de enzimas proteolíticas (Sacks & Kamhawi, 2001).

Análises refinadas do transcriptoma de *P. (P.) papatasi* e *L. (L.) longipalpis* têm oferecido uma melhor caracterização das moléculas do intestino e revelado, pela primeira vez, a habilidade de *Leishmania* em modular os transcritos do vetor. A comparação das bibliotecas de cDNA de fêmeas não alimentadas e alimentadas com sangue demonstrou que os transcritos que codificam proteases, incluindo algumas tripsinas, quimotripsinas e carboxipeptidases, são regulados pelo repasto sanguíneo (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Telleria *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008; Pitaluga *et al.*, 2009). Adicionais comparações das bibliotecas de cDNA de fêmeas alimentadas com sangue na ausência ou presença de *Leishmania* identificaram proteases do intestino que são especificamente reguladas pela presença dos parasitos (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008).

Moléculas do parasito que controlam a sobrevivência inicial

Diante do que foi exposto, fica claro que o processo digestivo do flebotomíneo representa um conjunto de fenômenos adversos ao desenvolvimento dos parasitos. A expressão de moléculas estágio e espécie-específica parece promover a sobrevivência e crescimento do parasito durante essa fase crítica (Descoteaux & Turco, 1999). A identificação de moléculas que poderiam ter importante papel na defesa do parasito contra danos causados pela ação de enzimas foi focada na família dos glicoconjugados. Essas moléculas estão presentes na superfície do parasito e podem ser ancoradas a ela por âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI), que incluem os lipofosfoglicanos (LPG), os glicoinositolfosfolípides (GIPLs), proteofosfoglicanos (PPG) e as proteínas ancoradas a GPI (GP63) ou podem ser secretadas como fosfoglicanos (PG), proteofosfoglicanos (sPPG) e fosfatases ácidas (sAP) (Turco & Descoteaux, 1992; McConville & Ferguson, 1993; Ilg *et al.*, 1999; Ilg, 2000) (Figura 3A).

Schlein e colaboradores (Schlein & Romano, 1986; Schlein *et al.*, 1990) deram as primeiras pistas sobre a natureza das moléculas derivadas dos parasitos que poderiam agir

para reduzir a atividade proteolítica no intestino, relatando que glicoconjugados liberados da cultura de *L. (L.) major*, chamados até então de "fatores de excreção", promoviam a sobrevivência inicial em *P. (P.) papatasi* de uma cepa de *L. (L.) major* que geralmente não se desenvolvia nesse vetor.

O LPG é o glicoconjugado majoritário na superfície de promastigotas de *Leishmania*, está localizado em todo o parasito, inclusive flagelo e é organizado como um glicocálix filamentosso (Turco & Descoteaux, 1992). Cada promastigota expressa cerca de $1-5 \times 10^6$ moléculas de LPG (Orlandi & Turco, 1987). Bioquimicamente o LPG é composto por quatro domínios: 1) uma âncora de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol seguida por 2) uma parte central ("core") formada por um heptassacarídeo $\text{Gal}(\beta 1,6)\text{Gal}(\beta 1,3)\text{Galf}(\beta 1,3)[\text{Glc}(\beta 1)\text{-PO}_4]\text{Man}(\beta 1,3)\text{Man}(\beta 1,4)\text{-GlcN}(\beta 1)$, 3) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\beta 1)\text{-PO}_4$ e 4) um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo "cap" (Descoteaux & Turco, 1999) (Figura 3B).

50

Transgênicos de *Leishmania* têm sido utilizados para investigação da função de genes do parasito, incluindo seqüências envolvidas na interação com o hospedeiro e na virulência (revisado por Beattie *et al.*, 2008). A evidência mais conclusiva de que moléculas contendo fosfoglicanos promovam a sobrevivência inicial dos parasitos no intestino veio de estudos empregando mutantes especificamente deficientes na biossíntese de fosfoglicanos como consequência da deleção do gene *LPG2*, resultando no transporte deficiente de GDP-manose no lúmen do Golgi (representação esquemática da localização da mutação na Figura 3A) (Descoteaux *et al.*, 1995). Antes da liberação do bolo fecal, mutantes em *LPG2* de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* foram mortos no intestino de seus respectivos vetores (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004). Interessantemente, mutantes no gene *LPG1*, deficientes na adição de galactofuranose na região glicana do “core” (Huang & Turco, 1993; Ryan *et al.*, 1993) e, dessa forma, deficientes somente na biossíntese de LPG (representação esquemática da localização da mutação na Figura 3A), sobreviveram relativamente bem no intestino contendo sangue, no período que antecede a liberação do bolo fecal (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004). Esses resultados indicaram que o LPG não foi essencial para a sobrevivência inicial dos parasitos e que outras moléculas contendo fosfoglicanos poderiam estar envolvidas na sua proteção contra as enzimas digestivas do intestino.

Tem sido sugerido que proteinases do parasito também têm importante papel na utilização do alimento sanguíneo e na resistência contra enzimas digestivas do flebotomíneo (Schlein *et al.*, 1990). Uma proteinase de superfície de *Leishmania*, a GP63 (leishmanolisina), tem sido considerada um fator de virulência envolvido na interação promastigotas-macrófagos (revisado em Yao *et al.*, 2003), entretanto, o seu papel na interação promastigotas-flebotomíneo ainda é controverso. Enquanto parasitos mutantes em GP63 de *L. (L.) major* desenvolveram-se normalmente no intestino de *P. (P.) papatasi*, *P. (E.) argentipes* e *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* (Joshi *et al.*, 1998, 2002), *L. (L.) amazonensis* com transcrição anti-sense de GP63 apresentou um decréscimo no seu estabelecimento inicial em *L. (L.) longipalpis*. Foi sugerido que GP63 auxilie na proteólise de hemoglobina para ceder heme e outros peptídeos essenciais para o crescimento do parasito nos períodos iniciais da infecção (Hajmova *et al.*, 2004). Nos dois casos os dados demonstraram que a atividade de GP63 não foi essencial para a sobrevivência dos parasitos nos períodos mais tardios.

1.4.2 Persistência dos parasitos pós-defecação

Escape da matriz peritrófica

Os parasitos recém ingeridos com sangue multiplicam-se confinados na MP. Como citado anteriormente, a MP é uma barreira semi-permeável que permite a difusão de enzimas hidrolíticas do flebotômíneo para dentro do bolo e de nutrientes para fora dele, mas impede a saída dos parasitos. Segundo Pimenta e colaboradores (1997), a MP intacta beneficia a sobrevivência dos parasitos durante a fase inicial de desenvolvimento dos parasitos dentro do bolo sanguíneo. Os autores observaram uma queda no número de parasitos de *L. (L.) major* viáveis em *P. (P.) papatasi* tratados com quitinase e sugeriram que a ausência de MP exacerba as condições letais que normalmente existem durante a digestão no intestino do flebotômíneo. A sobrevivência dos parasitos foi aumentada quando inibidor de tripsina foi adicionado ao sangue, sugerindo que os parasitos foram mortos pela ação das enzimas produzidas durante a digestão de sangue. Por outro lado, a matriz pode agir como uma barreira à colonização do intestino anterior, que deve ocorrer antes da defecação do bolo fecal. Alguns autores tem sugerido que a perda de infecções por *Leishmania* em vetores não naturais possa ser devido, pelo menos em parte, a incapacidade dos parasitos escaparem da MP antes da defecação (Feng *et al.*, 1951; Walters *et al.*, 1992). Comparando diferentes cepas de *L. (L.) major*, Cihaková e Volf (1997) observaram que a cepa que foi mais lenta para escapar da MP foi efetivamente perdida durante a excreção do bolo fecal. O requerimento de quitinases derivadas do flebotômíneo e/ou parasito para degradação da MP e escape dos parasitos foi claramente indicado em experimentos envolvendo o uso de alosamidina, um inibidor específico de quitinase. Pimenta e colaboradores (1997) demonstraram que a adição dessa substância no sangue dado a *P. (P.) papatasi* na ausência de *Leishmania* resultou no espessamento da MP, que se sustentou intacta por mais tempo. Em *P. (P.) papatasi* alimentado com sangue tratado com alosamidina e contendo *L. (L.) major*, as promastigotas foram incapazes de escapar da MP e estabelecer a infecção no intestino do vetor. Quando o bolo finalmente foi excretado os parasitos foram perdidos.

Apesar da aparente significância da atividade de quitinase de *Leishmania* para o estabelecimento da infecção de *Leishmania* no vetor, ainda não existem muitas informações acerca desse assunto. Schlein e colaboradores (1991) encontraram que quitinases são produzidas por promastigotas de *L. (L.) major* em crescimento *in vitro* e sugeriu que essas enzimas poderiam, sozinhas, causar a desintegração da porção anterior da MP de *P. (P.) papatasi*, permitindo o escape do parasito. Shakarian e Dwyer (1998, 2000) identificaram em *L. (L.) donovani* um gene para quitinase com alta homologia para quitinases conhecidas e, posteriormente, Joshi e colaboradores (2005) identificaram o gene para quitinase em *L. (L.) mexicana* e um sistema de expressão episomal foi desenvolvido para super expressão desse

gene nesses parasitos. A super expressão de quitinase foi demonstrada em promastigotas e amastigotas e resultou em aumento da lesão em camundongos (Joshi *et al.*, 2005). Em *L. (L.) longipalpis* a super expressão de quitinase facilitou o escape do parasito da MP e contribuiu para destruição da válvula do estomodeu (Rogers *et al.*, 2008), como previamente sugerido por outros autores (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004). Entretanto, recentemente, Sádlová e Volf (2009) não encontraram diferenças no tempo de desintegração da MP em fêmeas de *P. (P.) duboscqi* infectadas ou não por *L. (L.) major*. Além disso, em contraste com as prévias descrições (Schlein *et al.*, 1991), esses parasitos não causaram a desintegração da MP na porção anterior (Sádlová & Volf, 2009), mas migraram através de uma abertura posterior que existe na MP até mesmo de fêmeas não infectadas (Walters *et al.*, 1993, 1995; Warburg 2008; Sádlová & Volf, 2009).

Em muitas combinações parasito-vetor o escape dos parasitos parece coincidir com a quebra da MP pelas quitinases derivadas do flebotomíneo (Ramalho-Ortigão & Traub-Cseko, 2003, Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005). Um sistema quitinolítico induzido por sangue foi caracterizado no intestino de *P. (P.) papatasi* e *L. (L.) longipalpis* (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2005) e ambos flebotomíneos demonstraram significantes níveis de atividade enzimática pós-alimentação sanguínea, com atividade máxima em 48 horas. A análise das seqüências específicas dessas quitinases também revelou que elas são ativadas pela digestão proteolítica.

Recentemente, a identidade das quitinases dos flebotomíneos foi validada pela análise do transcriptoma de *P. (P.) papatasi* e *L. (L.) longipalpis* (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008). Comparações das bibliotecas de cDNA de fêmeas alimentadas com sangue na ausência ou presença de *Leishmania* identificaram que a peritrofina, uma proteína que compõe a MP, é reguladas pela presença de parasitos (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008). Entretanto, não se sabe ainda como a regulação da expressão de peritrofinas poderia interferir no sucesso do desenvolvimento do parasito no intestino do vetor.

Ligação ao epitélio intestinal - o papel do LPG

Após o rompimento da MP durante o estágio tardio da digestão, mesmo as promastigotas que escaparam do confinamento da MP correm o risco de serem liberados do intestino juntamente com os restos do sangue digerido. Nesse estágio, as promastigotas de espécies suprapiláricas se ligam ao epitélio do intestino médio. O ancoramento dos parasitos favorece a sua permanência no intestino frente aos movimentos peristálticos da digestão sofridos pelo vetor. A ligação das promastigotas ao epitélio intestinal foi observada pela

primeira vez sob microscopia óptica por Adler e Teodor em 1927, e subsequente, imagens ultra-estruturais revelaram a íntima associação do flagelo do parasito com as microvilosidades do intestino do flebotomíneo (Killick-Kendrick, 1974a, Molyneux *et al.*, 1975; Lawyer *et al.*, 1987, 1990; Warburg *et al.*, 1986; Walters *et al.*, 1987, 1989a; Saraiva *et al.*, 1995; El Sawaf *et al.*, 2008; Warburg, 2008). O requerimento do flagelo para essa interação é suportado pelos resultados de experimentos que observaram a completa perda de *L. (L.) amazonensis* dos intestinos de *L. (L.) longipalpis* após a defecção em insetos infectados com promastigotas aflagelados que perderam o flagelo devido a uma mutação específica (Cuvillier *et al.*, 2003). Esse fenótipo pode ser explicado pela inabilidade dos parasitos imobilizados encontrarem o epitélio intestinal e/ou ausência do ligante localizado no flagelo.

Diversos trabalhos têm investigado o papel do LPG em mediar a adesão dos parasitos no intestino médio do flebotomíneo. A adesão de várias espécies de *Leishmania* ao epitélio foi completamente inibida *in vitro* pelo PG de formas procíclicas (Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2002) e o PG purificado dessas formas também demonstrou se ligar diretamente a intestinos dissecados (Pimenta *et al.*, 1992, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000b; Soares *et al.*, 2010). Novamente, as mais importantes evidências do papel do LPG na adesão foram obtidas com parasitos mutantes em LPG. Mutantes deficientes na biossíntese de LPG foram gerados após mutagênese e seleção por lectinas ou anticorpos (King & Turco, 1988; Butcher *et al.*, 1996; Descoteaux *et al.*, 1998). Mutantes de *L. (L.) major* deficientes na síntese de LPG não se desenvolveram no vetor após a excreção (Butcher *et al.*, 1996). Dessa forma, as evidências encontradas *in vitro* por Pimenta e colaboradores (1992) sobre o papel do LPG foram confirmadas *in vivo*. Entretanto, como esses mutantes foram obtidos por forte mutagênese e cultivados *in vitro* seu fenótipo poderia não ter se estabelecido definitivamente para deficiente em LPG (Sacks *et al.*, 2000). Com o advento de métodos genéticos funcionais para identificação de genes responsáveis pela biossíntese do LPG, foi possível gerar, por gene alvo, mutantes de LPG “limpos”. Como mencionado anteriormente, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* mutantes em *LPG1* falham somente na expressão de LPG e tiveram apenas uma leve redução na sua sobrevivência e crescimento nos períodos iniciais da infecção, quando os intestinos dos seus respectivos vetores, *P. (P.) papatasi* e *P. (E.) argentipes*, ainda continha sangue. Entretanto, a habilidade em persistir no intestino foi completamente perdida após a excreção do bolo fecal e tal perda foi correlacionada à inabilidade dos parasitos em se ligarem ao epitélio intestinal antes da liberação do bolo fecal (Sacks *et al.*, 2000). Além disso, em ambos mutantes, quando a expressão do LPG foi restaurada pela reintrodução do gene *LPG1*, a adesão e a persistência dos parasitos também foram restauradas.

Ligação espécie-específica

Análises estruturais do LPG de diferentes espécies de *Leishmania* têm revelado completa conservação da âncora lipídica, do core e da estrutura básica Gal β 4Man α -PO₄ da região de unidades repetitivas (Figura 3B). O polimorfismo nos LPGs se deve a variação na composição e frequência dos açúcares das cadeias laterais ligadas a região conservada de unidades repetitivas e “cap” (Turco & Descoteaux, 1992; Sacks *et al.*, 1994). Por exemplo, o LPG de *L. (L.) donovani* proveniente do Sudão não possui cadeias laterais, enquanto o proveniente da Índia possui um ou dois resíduos de α -glicoses (Sacks *et al.* 1995; Mahoney *et al.*, 1999). Em *L. (L.) major* o LPG contém 1-4 β -galactoses frequentemente com arabinose terminal (McConville *et al.*, 1990) e em *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) chagasi* (PP75) contém α -glicoses (Ilg *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2002). Semelhante ao LPG de *L. (L.) donovani* do Sudão, o LPG das formas não infectantes de *L. (V.) braziliensis* não apresenta cadeias laterais (Soares *et al.*, 2005). Até o momento, o LPG de *L. (L.) tropica* é o mais complexo, com 19 tipos de combinações de unidades repetitivas (McConville *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2004). Esse interessante polimorfismo inter e intra-específicos do LPG está relacionado à sua função como ligante do parasito aos receptores do intestino e pode, em muitos casos, explicar a competência vetorial espécie-específica.

A habilidade de *P. (P.) papatasi* em transmitir somente *L. (L.) major* pode ser atribuída a natureza altamente substituída do seu LPG, com múltiplos resíduos de β -galactoses terminais para adesão (McConville *et al.*, 1990), já que outras cinco espécies de *Leishmania* que não contêm os mesmos resíduos falharam em aderir ao intestino de *P. (P.) papatasi* ou em persistir no intestino após a defecação (Pimenta *et al.*, 1994). Além disso, dentre os LPGs purificados dessas cinco espécies, somente o de *L. (L.) major* se ligou ao intestino de *P. (P.) papatasi* *in vitro*. O papel dessas cadeias laterais foi confirmado pelo uso de mutantes de *L. (L.) major* deficientes em LPG que expressam níveis normais de LPG mas são deficientes na biossíntese das cadeias laterais. Um mutante de *L. (L.) major*, chamado Spock, foi gerado por seleção negativa com anticorpos específicos para β -galactose e foi especificamente deficiente para galactosil transferase requerida para a adição de β -galactose. A perda desses resíduos impede a adesão e persistência dos mutantes no intestino de *P. (P.) papatasi* (Butcher *et al.*, 1996). O comportamento dos mutantes Spock em *P. (P.) papatasi* foi similar ao de *L. (L.) donovani* do Sudão, que não possui cadeias laterais, nesse mesmo vetor (Pimenta *et al.*, 1994).

A idéia de que a adesão ao intestino é espécie-específica também é reforçada pelo trabalho de Kamhawi e colaboradores (2000b), que mostraram que intestinos de *Phlebotomus*

(*Phlebotomus*) *sergenti* foram intensamente marcados após incubação com LPG purificado de *L. (L.) tropica*, mas não com o LPG de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*. Embora as unidades repetitivas de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* sejam substituídas, os açúcares das cadeias laterais são diferentes, com *L. (L.) tropica* sintetizando uma abundância de açúcares com terminações em arabinose e glicose, distintos das terminações em galactose características de muitas linhagens de *L. (L.) major*.

Significantes variações também existem na galactosilação em *L. (L.) major* (revisado em Sacks *et al.*, 2008). Algumas linhagens da África que tem as unidades repetitivas relativamente não substituídas (*L. (L.) major* linhagem A2) não podem ser transmitidas por *P. (P.) papatasi* (Joshi *et al.*, 1998, 2002), mas possivelmente por *P. (P.) duboscqi* (Joshi *et al.*, 2002). Diferenças no grau de galactosilação também têm sido observadas em linhagens de *L. (L.) major* de diferentes áreas geográficas. Tem sido sugerido que esse padrão de galactosilação linhagem-específica dependa do padrão de expressão de uma família de genes que codificam a galactosil transferase nessa espécie (Dobson *et al.*, 2003). *Leishmania (L.) tropica* também expressa um alto grau de polimorfismo intra-específico, que foi diretamente correlacionado com o fato das linhagens analisadas terem sido isoladas de dois distintos vetores, *P. (P.) sergenti* e *Phlebotomus (Adlerius) arabicus* (Soares *et al.*, 2004).

O fato de significativas diferenças na adesão mediada por LPG terem sido observadas quando diferentes espécies vetorais foram comparadas sustenta a idéia de que moléculas que servem como sítios de ligação para os parasitos variem entre as diferentes espécies de flebotomíneos e que possam, por isso, proporcionar pressão evolutiva para o polimorfismo estrutural do LPG (Sacks & Kamhawi, 2001). Dessa forma, a natureza dos possíveis receptores de LPG no intestino dos flebotomíneos tem sido foco de interesse. Em 1992, Pimenta e colaboradores sugeriram que moléculas tipo lectinas poderiam servir como sítios de ligação para os parasitos. Posteriormente, diversas publicações relataram à presença de moléculas tipo lectinas capazes de aglutinar parasitos de *Leishmania* em intestinos lisados (Svobodova *et al.*, 1996; Volf *et al.*, 1998, 2002). Em 1999, Dillon e Lane identificaram uma proteína no epitélio intestinal de *P. (P.) papatasi* que se ligava ao LPG de *L. (L.) major*, embora essa proteína não tenha sido identificada. Em 2004 a natureza de receptores para o LPG de *L. (L.) major* foi caracterizada. PpGalec, uma galectina expressa pelo epitélio intestinal de *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) duboscqi*, é utilizada como receptor específico para o LPG de procíclicos de *L. (L.) major*. Intestinos de *P. (P.) papatasi* pré-incubados com anticorpos contra PpGalec e seguidos da incubação com procíclicos de *L. (L.) major* demonstraram a inibição da ligação pelo LPG. Esses resultados foram confirmados em

experimentos de adesão *in vivo*, nos quais o desenvolvimento de *L. (L.) major* foi prejudicado pela pré-incubação dos intestinos de *P. (P.) papatasi* com anti-PpGalec (Kamhawi *et al.*, 2004).

Em comparação a *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) sergenti*, vetores naturais de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*, que expressam LPGs altamente substituídos e demonstram especificidade para seus respectivos parasitos, os vetores naturais de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi*, que expressam LPGs com poucas ou sem adições de cadeias laterais, parecem suportar, em laboratório, o desenvolvimento de diversas espécies de *Leishmania* (revisado em Sacks *et al.*, 2008). Tem sido sugerido que esses vetores experimentalmente "permissivos" possam expressar receptores, ausentes ou inacessíveis em *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) sergenti*, que reconheçam estruturas que são conservadas no LPG.

1.4.3 Migração dos parasitos para região anterior

Ligação estágio - específico

Após a passagem do bolo fecal, o estabelecimento da infecção presumivelmente envolve a liberação de um grande número de parasitos do intestino médio. O estágio final de desenvolvimento da *Leishmania* no vetor envolve a diferenciação dos parasitos em formas metacíclicas.

Ao contrário das outras formas de desenvolvimento, metacíclicas não tem sido vistas aderidas, mas sim livres no lúmen para migrar para a região anterior. Durante a metaciclogênese, as modificações estruturais no LPG das formas não infectantes são responsáveis pela perda da adesão do epitélio intestinal e essas modificações são características para cada espécie de *Leishmania*. Assim, duas formas de LPG têm sido observadas: o LPG das formas não infectantes e das formas infectantes (metacíclicas). Em *L. (L.) major*, por exemplo, durante a metaciclogênese a molécula de LPG aumenta seu tamanho em 2 a 3 vezes devido a um aumento na expressão de unidades repetitivas. Além disso, ocorre uma diminuição nas cadeias laterais terminadas em resíduos de galactose e correspondente substituição por arabinose, o que controlaria a adesão ao epitélio (Sacks *et al.*, 1990; McConville *et al.*, 1992). Já em *L. (L.) donovani* do Sudão, que não expressa cadeias laterais, a molécula dobra de tamanho e a galactose do "cap" se tornaria críptica (Sacks *et al.*, 1995). Para *L. (L.) donovani* da Índia e *L. (L.) chagasi*, que têm cadeias laterais de glicose, a metaciclogênese é associada à elongação da molécula e à diminuição das cadeias laterais de glicose (Mahoney *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2002). Interessantemente, a análise do LPG de *L.*

(*V.*) *braziliensis*, espécie com desenvolvimento peripilárico, revelou um tipo diferente de regulação de carboidrato nas cadeias laterais. Nas formas não infectantes o LPG não possui cadeias laterais enquanto nas formas metacíclicas ocorre a adição de uma ou duas glicoses (Soares *et al.*, 2005).

Em todos os casos, o aumento no tamanho da molécula de LPG e as modificações nas cadeias laterais de açúcares culminam com o desprendimento das promastigotas do epitélio e a migração para a região anterior do tubo digestivo. É importante destacar que a elongação do LPG nas formas metacíclicas também resulta em um espessamento do glicocálix (Pimenta *et al.*, 1989) que parece proteger o parasito da ação do sistema complemento no hospedeiro vertebrado (Sacks, 1989; Sacks *et al.*, 1995). A figura 4 exemplifica alguns tipos de alterações sofridas pelo LPG durante a metaciclogênese.

A expressão de LPG não é regulada somente entre as formas promastigotas durante a metaciclogênese, mas também durante a transição da forma promastigota para amastigota. O número de cópias de LPG expressos por amastigotas intracelulares é substancialmente menor do que promastigotas (Moody & Handman, 1993; Turco, 2003) e, em *L. (L.) major*, o LPG de formas amastigotas é bioquímica e antigenicamente distinto do LPG de promastigotas (Moody & Handman, 1993). Até o momento, nenhuma função tem sido atribuída ao LPG das formas amastigotas (Turco, 2003). Por outro lado, alguns genes também são diferencialmente expressos pelas formas amastigotas, como por exemplo, a proteína A2, (Charest & Matlashewski, 1994), um importante fator de virulência requerido para a sobrevivência no hospedeiro mamífero (Zhang & Matlashewski, 1997) e a proteína imunogênica amastin (Wu *et al.*, 2000).

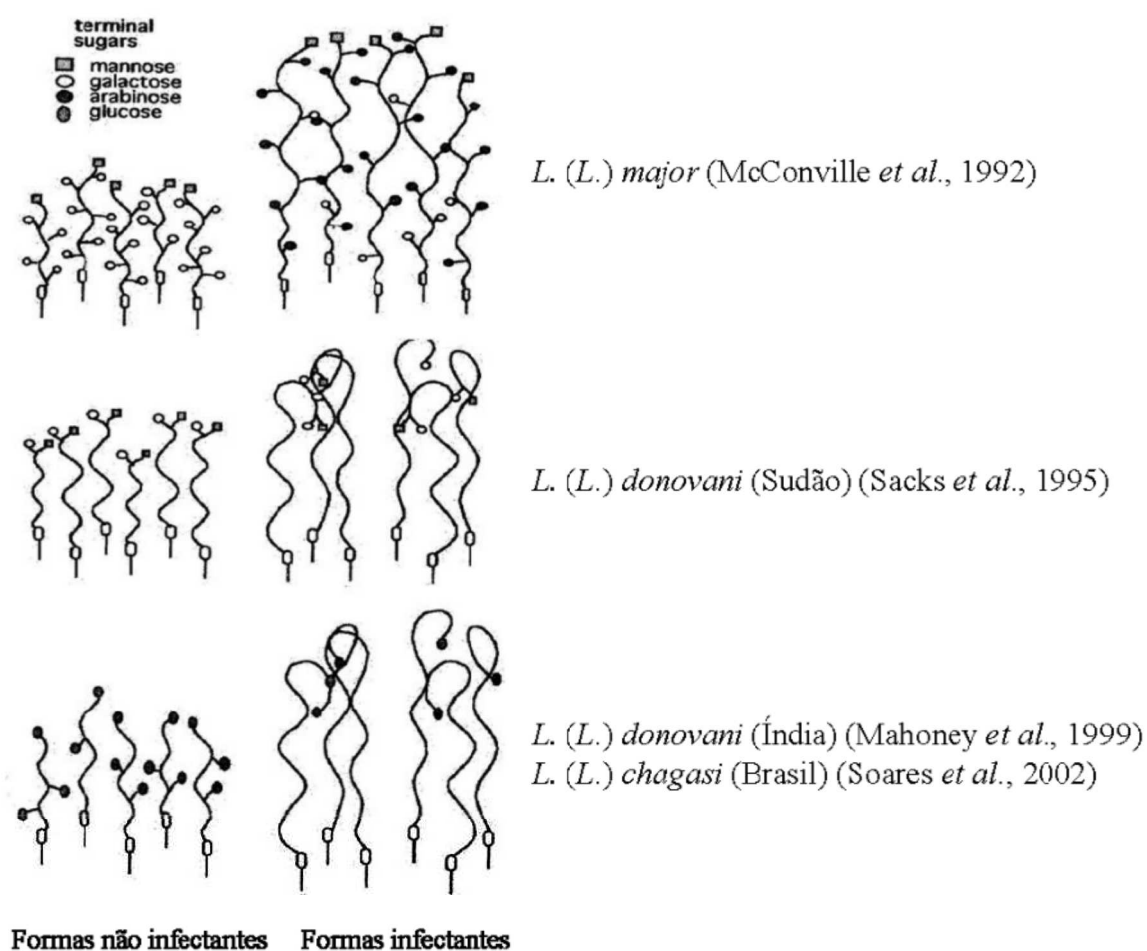


Figura 4: Comparação entre os diferentes tipos de LPG já descritos durante a metaciclogênese (modificado de Sacks & Kamhawi, 2001).

Estudos da interação *Leishmania*-vetor são importantes para o entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento e transmissão do parasito. Os dados da literatura referem-se principalmente às espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Considerando as espécies do Novo Mundo, existem poucos dados na literatura, que incluem o desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) mexicana* em *L. (L.) longipalpis* (Lainson & Shaw, 1988; Walters *et al.*, 1989a; Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003; Rogers & Bates, 2007), *Leishmania (V.) panamensis* em *Lutzomyia (Lutzomyia) gomezi* (Walters *et al.*, 1989b) e *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em *Lutzomyia migonei*(grupo migonei) e *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Nieves e Pimenta 2000; 2002; Miranda *et al.*, 2008). Mais detalhes sobre o desenvolvimento *in vivo* de *L. (L.) chagasi* em seu vetor natural, *L. (L.) longipalpis*, ainda são necessários. Além disso, embora já tenha sido demonstrado que o LPG purificado de *L. (L.) chagasi* se liga ao intestino de *L. (L.) longipalpis* (Soares *et al.*, 2002), o papel dessa molécula no estabelecimento do parasito no seu vetor ainda não foi elucidado.

Neste trabalho nós investigamos em detalhes o desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis*. Além disso, o LPG da cepa utilizada foi caracterizado e o papel dessa molécula na sobrevivência de *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis* foi analisado utilizando-se parasitos mutantes para a biossíntese de LPG.

A consideração do papel do LPG de parasitos do Novo Mundo no estabelecimento da infecção no vetor pode fornecer informações relevantes sobre as leishmanioses, as quais, futuramente, poderão auxiliar no desenvolvimento de métodos alternativos para o bloqueio da transmissão vetorial desta enfermidade. Além disso, na presença de uma variedade limitada de drogas e de nenhuma vacina efetiva contra a doença, detalhes de todos os aspectos da biologia desse parasito são desejáveis para a formulação de novas estratégias de controle contra o protozoário e o vetor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a interação de *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi* durante o processo de infecção experimental utilizando parasitos selvagens e mutantes deficientes no gene *LPG1*.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar amastigotas de *L. (L.) chagasi* obtidas por transformação *in vitro*;

Comparar o índice de infecção dos flebotomíneos, densidade e morfotipos encontrados durante o desenvolvimento do parasito no trato digestivo do vetor após infecção experimental com formas amastigotas transformadas *in vitro* e formas promastigotas;

Caracterizar o *LPG* de *L. (L.) chagasi* selvagem e mutante no gene *LPG1*;

Comparar o índice de infecção dos flebotomíneos e densidade dos parasitos selvagens e mutantes no gene *LPG1* ao longo do seu desenvolvimento no trato digestivo do vetor após infecção experimental com formas promastigotas;

Avaliar a ação de lisado de intestino de *L. (L.) longipalpis* sobre promastigotas de *L. (L.) chagasi* do tipo selvagem e mutante no gene *LPG1*;

Descrever os aspectos morfológicos da interação de *L. (L.) chagasi* com *L. (L.) longipalpis* por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Captura e acondicionamento de flebotomíneos

Os flebotomíneos *L. (L.) longipalpis* utilizados neste projeto foram provenientes de coletas semanais na Gruta Lapinha, localizada nas imediações da cidade de Lagoa Santa, a 60 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'W; latitude 19°03'S), estado de Minas Gerais, Brasil. Os insetos foram capturados com armadilha luminosa tipo CDC (Center for Disease Control light trap) (Sudia & Chamberlain, 1962). Estas armadilhas foram colocadas no início da tarde (por volta das 14 horas) e retiradas no início da manhã do dia seguinte (por volta das 9 horas). Um espécime de *Gallus gallus domesticus* colocado no interior da gruta serviu como fonte de atração para os flebotomíneos (Figura 5).



Figura 5: Local de coleta de *L. (L.) longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas.

As gaiolas contendo os flebotomíneos capturados foram envolvidas por um saco plástico preto contendo um chumaço de algodão embebido em água para manutenção da umidade relativa em torno de 80%. As gaiolas foram então acondicionadas em caixas de isopor, nas quais também havia chumaços úmidos de algodão, para o transporte para o Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais.

No laboratório, as gaiolas foram observadas e selecionadas quanto ao número de flebotomíneos. Quando necessário, os flebotomíneos foram transferidos para gaiolas limpas. As gaiolas utilizadas foram construídas em tecido do tipo “voil”, em formato quadrado e suspensas em suas extremidades por alças presas às hastes metálicas. Os insetos foram mantidos em condições como as descritas por Nieves e Pimenta (2000). Os experimentos foram realizados num período de 24 a 30 horas após a captura.

Em alguns experimentos foram utilizados espécimes de *P. (P.) duboscqi* provenientes do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infecciosas (NIH - National Institute of Health), Bethesda, USA.

3.2 Parasitos

3.2.1 Manutenção da cepa selvagem

A cepa de *L. (L.) chagasi* utilizada foi a MHOM/BR/1970/BH46 isolada de adulto com leishmaniose visceral da cidade de Conselheiro Pena, Minas Gerais, Brasil. Os parasitos foram obtidos e mantidos por passagens em hamster (*Mesocricetus auratus*). Os parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), penicilina (100 U/ml), streptomicina (50 $\frac{U}{ml}$), glutamina (12,5 mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) e 2,5 $\frac{U}{ml}$ hemina (Sigma) (Soares *et al.*, 2002). Os parasitos foram mantidos em garrafas para cultivo de células (produzidas em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 ml, estéreis, com tampa de rosca e gargalo inclinado) em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 26 °C. Para realização dos experimentos descritos a seguir foram utilizados parasitos com até 10 passagens em cultura.

Neste trabalho, a cepa selvagem de *L. (L.) chagasi* BH46 será referida como *L. (L.) chagasi* WT (do inglês *wild type*, tipo selvagem).

Para se conhecer o perfil de crescimento da cepa selvagem, os parasitos foram semeados a partir de uma cultura de células em fase estacionária, em triplicata, em garrafas

para cultivo de células na concentração inicial de 1×10^5 parasitos/mL. Diariamente, duas contagens foram feitas para cada garrafa.

3.2.2 Geração de amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT e validação da transformação *in vitro*

3.2.2.1 Geração das amastigotas axênicas

A obtenção de formas amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT foi possível utilizando-se o protocolo de Araújo *et al.* (comunicação pessoal) com algumas modificações.

A cultura de amastigotas axênicas foi iniciada de uma cultura em fase estacionária de promastigotas (que possui um maior número de formas infectantes metacíclicas). Os parasitos foram centrifugados a 3000 rpm/4°C por 10 minutos e ressuspensos em Meio M199, acrescido com 20% de SFB, penicilina (100 U/ml), streptomomicina (50 U/ml), glutamina (12,5 mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) (Soares *et al.*, 2002) e 25 U/ml de hemina (Sigma) de modo que a concentração final da cultura fosse de 5×10^6 parasitos/mL. O cultivo foi feito em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ (ULTRASAFE, modelo HF212 UV).

3.2.2.2 Cinética do crescimento das amastigotas axênicas

Para se conhecer a cinética da transformação *in vitro* *L. (L.) chagasi* WT, a partir do protocolo de transformação utilizado, foi realizada uma curva de crescimento. A transformação *in vitro* foi realizada em garrafas para cultivo de células e em triplicata. Aliquotas das culturas resultantes foram retiradas em intervalos regulares de 24 horas durante o período de crescimento *in vitro*. Tais amostras foram cuidadosamente homogeneizadas para que os agregados de células fossem desfeitos. Pequenas alíquotas foram diluídas no corante vital Azul Trypan (1%) e contadas em câmara de Neubauer.

3.2.2.3 Análise morfológica das amastigotas axênicas

Durante o processo de transformação *in vitro*, a morfologia dos parasitos foi examinada em preparações de coloração com Panótico rápido (Laborclin) observadas em microscopia óptica (MO). A análise da viabilidade das células transformadas foi realizada utilizando-se o corante vital Azul Trypan (1%).

Amastigotas axênicas provenientes de diferentes tempos após a incubação a 37 °C foram processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os parasitos foram fixados por 24 horas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M,

pH 7.2, lavados em PBS e aderidos durante a noite em lamínula pré-tratada com poly-L-lisina 1%. O excesso de parasitos foi retirado e as lamínulas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% (Pimenta & De Souza, 1985) por 40 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a pós-fixação, as lamínulas foram lavadas em PBS por três vezes, e então desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%). Em seguida, as lamínulas foram secas em ponto crítico, montadas em suporte (*stubs*) e submetidas à metalização com cobertura de ouro (Pimenta & De Souza, 1986). As lamínulas foram observadas em MEV (Jeol® JSM-5600) e fotografadas.

3.2.2.4 Transformação cíclica das amastigotas axênicas

A habilidade das formas amastigotas axênicas diferenciaram-se em promastigotas foi investigada. Amastigotas axênicas geradas como descrito anteriormente no item 3.2.2.1 foram colocadas em Meio 199 (1:1) suplementado com 10% SFB e incubadas a 26 °C. Aliquotas desta cultura foram diluídas em Azul Trypan (1%) a cada 24 horas e contadas por cinco dias consecutivos em câmara de Neubauer.

3.2.2.5 Infecção de macrófagos *in vitro* pelas amastigotas axênicas

A infecciosidade das formas amastigotas axênicas foi monitorada pela infecção de macrófagos peritoneais (M ϕ). Camundongos BALB/c receberam intraperitonealmente 2 ml de tioglicolato 3% para estimulação e migração dos macrófagos para a cavidade peritoneal. Após 72 horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, mergulhados em álcool 70% para desinfecção e presos em isopor na posição decúbito dorsal. Macrófagos peritoneais foram removidos através de inoculação de Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sem SFB. A suspensão celular foi então centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm (500 g) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em DMEM com 10% de SFB de modo que a concentração final ficasse 2x10⁶ macrófagos/ml. Os macrófagos foram cultivados em lamínulas dispostas em placa de 24 wells por 2 horas a 37 °C e 5% CO₂. As células não aderidas foram removidas. Amastigotas axênicas centrifugadas a 3000 rpm/25 °C por 10 minutos, ressuspensionadas em DMEM com 10% SFB e incubadas com as lamínulas contendo os macrófagos na proporção de 10:1. Parasitos livres foram removidos por lavagem em DMEM sem SFB depois de duas horas de incubação. Análises da infecciosidade foram realizadas após 24, 48 e 72 horas. Após cada período definido para a análise três lamínulas foram retiradas e lavadas duas vezes em PBS (Tampão Fosfato Salina). As lamínulas foram coradas pelo método Panótico rápido (Laborclin), secas em temperatura ambiente e montadas

em Entellan (Merck). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem em microscópio óptico. Em cada lâmina foram contados no mínimo 100 macrófagos.

3.2.2.6 Eletroforese em poliacrilamina (SDS-PAGE) de proteínas totais de promastigotas e amastigotas axênicas

Para a extração de proteínas, culturas de promastigotas e amastigotas axênicas foram centrifugadas a 3000 rpm/4 °C por 10 minutos, lavadas em PBS duas vezes e lisadas em 20 mM Hepes, 0,5 % (v/v) Triton-100, 100 μ g/mL de aprotinina, pH 8.0, por 30 minutos em gelo (Debrabant *et al*, 2004 com adaptações). Equivalentes quantidades de proteínas obtidas de cerca de 10^7 células foram solubilizadas em tampão de amostra e aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% (Tabela 1).

Tabela 1: Soluções para géis de resolução e de concentração de poliacrilamida 10% e 12%.

gel de resolução (mL)			gel de concentração (mL)	
	10%	12%		
30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	5,0	3,0	30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	0,65
4x Tris HCl pH 8,8 (1,5 M)	3,75	1,80	4x Tris HCl pH 6,8 (0,5 M)	1,25
H ₂ O destilada e deionizada	6,25	2,60	H ₂ O destilada e deionizada	3,05
10% de persulfato de amônio (APS)	0,05	0,05	10% de persulfato de amônio (APS)	0,05
TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01	0,005	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,005

O material foi submetido à eletroforese em tampão 1x (15 g de glicina, 3,025 g Tris-base, pH 8.3, 1 g SDS em água milli-Q qsp 1000 mL) e submetido a uma corrente elétrica constante de 100 V por aproximadamente 1 hora.

Após o término da corrida o gel foi corado em solução Commassie Blue 1% por cerca de 20 minutos sob agitação. O gel foi então descorado (ácido acético 5%, metanol 10% em H₂O) sob agitação durante a noite e lavado em água destilada.

3.2.2.7 Análise por RT PCR da expressão da proteína A2

Para análise da expressão da proteína A2, que é somente expressa na formas amastigotas (Charest & Matlashewski, 1994), o RNA total de amastigotas axênicas *L. (L.) chagasi* WT foi extraído utilizando-se Trizol[®] (Invitrogen, instruções do fabricante) 24, 48, 72 e 96 após incubação a 37°C. O RNA foi tratado com DNase (Invitrogen) e o cDNA foi gerado de 2 µg do RNA total usando primer oligo dT (15) (Promega) e transcriptase reversa M-MLV (Promega). Os cDNAs foram amplificados com primers gene-específico: A2 (número de acesso GenBank[®] S69693), 5'GACCGAGCACAATGAAGATC3' (*forward*), 5'GTCACCATGCCTCATGGCAT3' (*reverse*); α -tubulina (número de acesso GenBank[®] DQ129864.1), 5'CGTGTGCATGATTGCCAACT3' (*forward*), 5'GAATTGTCCGCTTCGTCTTGAT3' (*reverse*). O mix para PCR foi composto de Taq Platinum DNA polymerase (1 U) (Invitrogen), 200 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.5; 10 pmol de cada primer específico em 25 µL de reação. As condições para PCR foram as seguintes: um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C para o primer A2 e 62°C para o primer α -tubulina por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados gel de agarose 1,5% no tampão de eletroforese TBE (Tris 90mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0) na presença de brometo de etídio.

3.2.3 Geração de *L. (L.) chagasi* deficiente na expressão de *LPGI*

Duas construções gênicas do *LPGI* foram usadas para gerar um homozigoto mutante de *L. (L.) chagasi* (LPG1KO). Para a primeira construção, o gene *LPGI* foi amplificado do DNA genômico de *L. (L.) chagasi* pela técnica de PCR usando o *primer* AD-358 (*forward*) (5'-gtacaagcttccatATGGCGCCGCTCGCTG-3') e AD-359 (*reverse*) (5'-gctactcgagTTAGCTGGGGTCAACAG-3'). Esse fragmento foi digerido com *Hind*III e *Xho*I e ligado ao vetor pBluescript II SK previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando a

construção pBS-*LPG1*. O gene de resistência a Neomicina foi cortado com *NotI* e *EcoRV* do plasmídeo pLeishNeo e inserido no sítio *MscI* do pBS-*LPG1*, dentro do gene *LPG1*. Para a segunda construção, os primeiros 437 nucleotídeos do gene *LPG1* foram amplificados por RT-PCR do mRNA de *L. (L.) chagasi* usando os *primers* AD-53 (*forward*) (5'-cgggatccatATGGCGCCGCTCGCTG-3') e AD-357 (*reverse*) (5'-ggaattcTCGGGGTGGTGAATG-3'). Esse fragmento foi digerido com *EcoRI* e *BamHI* e ligado ao vetor pBluescript II SK previamente digerido com as mesmas enzimas. Um fragmento de 467 pares de base entre os nucleotídeos 781 e 1247 da ORF de *LPG1* foi amplificado por PCR do DNA genômico de *L. (L.) chagasi* usando os *primers* AD-355 (*forward*) (5'-gcaagcttGGCATCTATTACACAGACCACAAGG-3') e AD-356 (*reverse*) (5'-caggtcgacTGGCAGCGAATGTTTTTCACC-3'). Esse fragmento foi digerido com *HindIII* e *SalI* e ligado no mesmo vetor nos sítios de restrição *HindIII* e *SalI*, anteriormente a primeira sequência de *LPG1*. O gene de resistência a higromicina B do vetor pX63-HYG foi cortado com *SalI* e *BamHI* e inserido entre as duas sequências do *LPG1*, no sítio de restrição *EcoRV*. A primeira construção contendo neomicina foi cortada com *HindIII-KpnI* e transfectada em promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT. Promastigotas resistentes a G418 foram clonados por diluição seriada e a heterozigose do locus *LPG1* foi confirmada pela técnica de Southern blot. A segunda construção contendo higromicina B foi cortada com *XbaI-KpnI* e transfectada nas promastigotas heterozigotas de *L. (L.) chagasi* (*lpg1*^{+/−}) resistentes a G418. As promastigotas resultantes, resistente a G418 e higromicina B (*L. (L.) chagasi* LPG1KO), são homozigotas para o gene *LPG1*, resultado confirmado por Southern blot e reação negativa com CA7AE.

Parasitos LPG1KO têm deficiência na adição de uma galactofuranose na região glicana do “core” (Huang & Turco, 1993; Ryan *et al.*, 1993; Spath *et al.*, 2000). Esses mutantes secretam, da mesma forma que a cepa parental, repetidas moléculas contendo Gal β 1-4Man β 1-PO₄, mas perdem a habilidade para montar a parte central (“core”) funcional do LPG, impedindo a síntese dessa molécula.

Os mutantes foram gerados pelo grupo do Dr. Albert Descoteaux, do "Institut Armand-Frappier and Centre for Host-Parasite Interaction", Quebec, Canadá, em projeto de colaboração. Estes dados ainda não foram publicados.

3.2.3.1 Manutenção da cepa mutante *L. (L.) chagasi* LPG1KO

Os parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma) suplementado conforme descrito para os parasitos selvagens no item 3.2.1 e acrescido de 5 μ g/mL de geneticina (G418, Gibco) e 50 μ g/mL higromicina (Sigma). Os parasitos foram mantidos em garrafas para cultivo de

células (em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 ml, estéril, com tampa de rosca e gargalo inclinado) em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 26 °C no Laboratório de Entomologia Médica. Para realização dos experimentos descritos a seguir foram utilizados parasitos com até 10 passagens em cultura.

Neste trabalho, a cepa de *L. (L.) chagasi* BH46 mutante em LPG1 será referida como *L. (L.) chagasi* LPG1KO (do inglês *knock out*, mutante).

3.2.3.2 Morfologia de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO

Para análise da morfologia da linhagem selvagem e mutante, parasitos coletados de cultura em fase log foram examinados em preparações de coloração com Panótico rápido e processados para MEV como descrito no item 3.2.2.3.

3.3 Caracterização do LPG de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO

3.3.1 Caracterização do LPG de *L. (L.) chagasi* WT

3.3.1.1 Extração de LPG de *L. (L.) chagasi* WT

A cultura de *L. (L.) chagasi* WT em fase estacionária foi centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm e o pellet foi lavado uma vez em PBS. Ao pellet foi adicionado 2,5 mL de CHCl₃/MeOH (3:2) e 0,5 mL MgCl₂ 4 mM para a delipidação. O material foi sonificado (50 Hz) e centrifugado a 3000 rpm por 7 minutos. As fases superior e inferior foram descartadas e repetiu-se o procedimento com a fase intermediária.

Para remoção das proteínas foi adicionado a fase sólida 2,5 mL de MgCl₂ 4 mM, seguido de sonicação e centrifugação a 3000 rpm por 7 minutos. Este procedimento foi repetido uma vez. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 3 mL de CHCl₃/MeOH/H₂O (10:10:3) e 0,5 mL de CHCl₃/MeOH (1:1) e o material foi sonificado e centrifugado por 7 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante contendo GPIs foi armazenado.

Ao pellet foram adicionados 2,5 mL de solvente E (água/etanol/etil éter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017), que foi sonificado e centrifugado a 3000 rpm por 7 minutos. O procedimento foi repetido mais três vezes e o sobrenadante contendo o LPG foi retirado e armazenado (Orlandi & Turco, 1987).

3.3.1.2 Purificação do LPG de *L. (L.) chagasi* WT

O LPG obtido na extração foi evaporado com N₂ e dissolvido em 1 mL de solução de ácido acético 0,1N/0,1M NaCl. Em uma coluna Bio-Rad (#731-1550) foi adicionada uma suspensão contendo Octil-Sepharose. Após o empacotamento o volume final da resina ficou próximo a 1 mL. Antes da aplicação da amostra a coluna foi lavada com 6 volumes de ácido acético 0,1N/0,1M NaCl. Após a penetração do último ml da solução de ácido acético/NaCl, a amostra de LPG foi aplicada e em seguida o material foi lavado com 1 mL ácido acético 0,1N, seguido de 1 mL de água destilada e eluído com 6 mL de solvente E. Depois de passar pela coluna, o material foi novamente evaporado com N₂, diluído em água milli-Q e armazenado a 4°C (Orlandi & Turco, 1987).

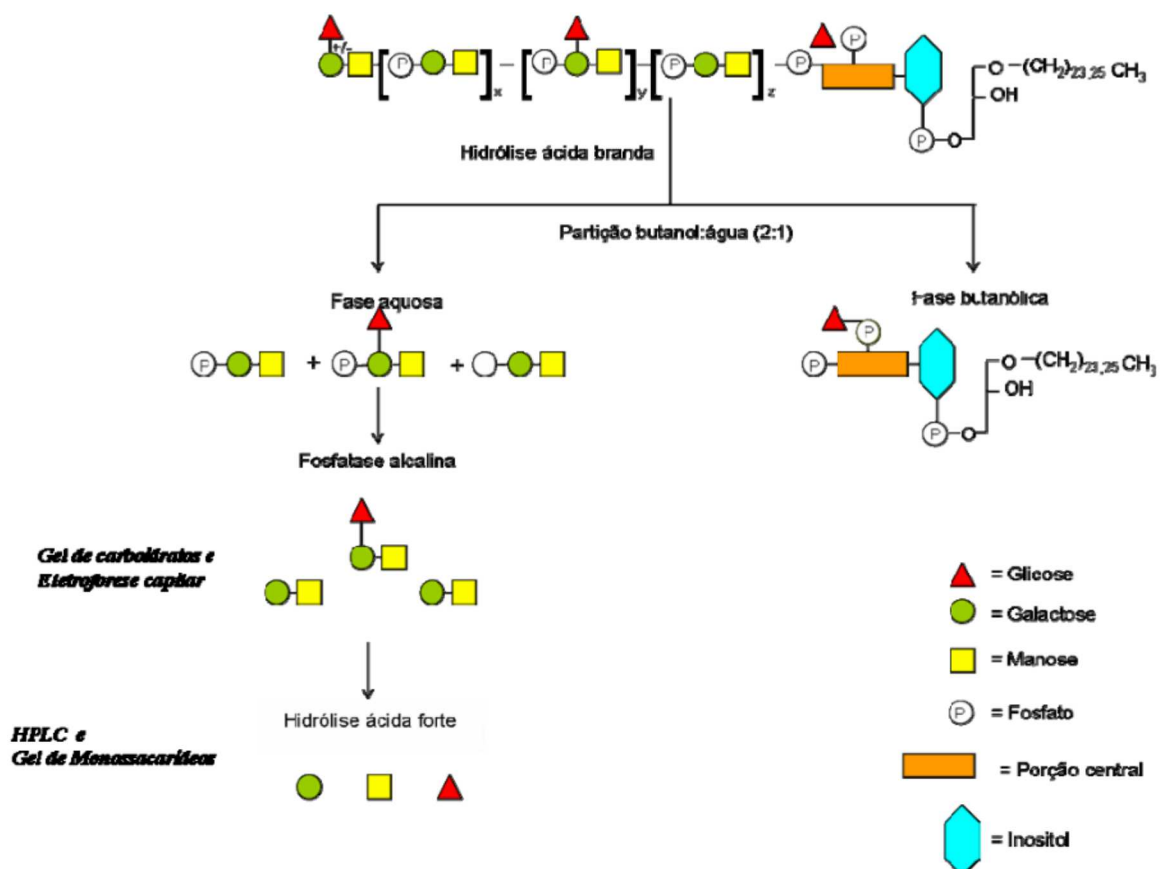
3.3.1.3 Western blot do LPG de *L. (L.) chagasi* WT

Para confirmar a purificação, 10 μ g do LPG foram aplicados em gel de poliacrilamida 12 % (Tabela 1). O material foi submetido à Eletroforese em Tampão 1 x (15 g de glicina, 3,025g Tris-base, pH 8.3, 1 g SDS em água milli-Q qsp 1000 mL) e submetido a uma corrente elétrica constante de 100 V por aproximadamente 1 hora.

A amostra foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (0,45 μ m) com uma corrente constante de 42 mA por 1 h. A membrana foi então bloqueada por uma hora com a solução de caseína 5%, lavada 3 vezes com PBS-Tween (0,05%) e posteriormente incubada com o anticorpo primário CA7AE (1:1000) durante o uma hora. O anticorpo CA7AE reconhece as unidades repetitivas (Gal β 4Man α -PO₄) presentes em todos LPGs (Handman *et al.*, 1984). Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes com PBS-Tween (0,05%) e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Após uma nova etapa de lavagem a membrana foi revelada com Luminol (Soares *et al.*, 2002).

3.3.1.4 Preparação das unidades repetitivas e partição butanol:água

Para a despolimerização do LPG foi utilizada a hidrólise ácida branda. Ao LPG purificado (150 μ g) foi adicionado igual volume de HCl 0,04 N (150 μ g). A amostra foi fervida por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 600 μ g de uma solução saturada butanol e água. A mistura foi agitada por um minuto em vórtex e centrifugada a 14.000 rpm por 8 minutos. As frações solúveis em água (unidades repetitivas e “caps”) foram separadas por partição butanol:água. A fase butanólica superior foi desprezada e a fase aquosa inferior contendo as unidades repetitivas foi evaporada em *Speed-vac* (Figura 6) (Mahoney *et al.*, 1999).



Adaptado de Mahoney *et al.* (1999)

Figura 6: Esquema de fracionamento do LPG. A hidrólise ácida branda (HCl 0,02 N, 5 min, 100 °C) fragmenta o LPG e libera os glicanos neutros, fosforilados e a porção central-âncora lipídica. Essas últimas são separadas dos demais componentes após partição butanol:água (2:1). As unidades repetitivas fosforiladas foram tratadas com fosfatase alcalina. Os perfis foram posteriormente visualizados através de gel de carboidratos e eletroforese capilar. As unidades repetitivas foram submetidas à hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético a 2 N, 100 °C, 3 horas) para fragmentação em monossacarídeos, que foram analisados pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e gel de monossacarídeos.

3.3.1.5 Tratamentos enzimáticos e cromatografia de troca iônica

As unidades repetitivas purificadas foram tratadas com fosfatase alcalina (1 U em 150 μ l de tampão Tris 15 mM pH 9.0) por incubação a 37 °C durante a noite para a retirada dos grupos fosfato. Para a retirada dos sais, as unidades repetitivas desfosforiladas foram aplicadas em uma coluna contendo as resinas DOWEX 50WX8-200 e AG1-X8 (acetato) e eluídas com água. O material foi evaporado em *Speed vac* (Soares *et al.*, 2002).

3.3.1.6 Eletroforese de Carboidratos (FACE)

As unidades repetitivas e o padrão de oligossacarídeos (G1-G7) foram marcados com 1 μ l de solução de ANTS (8-aminoftaleno-1,3,6-trissulfato 0,05 M em 15% de ácido acético) e 1 μ l de solução de cianoborohidreto de sódio 0,05 M em tetrahydrofurano (THF). As amostras foram homogeneizadas e incubadas durante a noite a 37 °C ou por 3 horas a 45 °C. O gel de resolução e o gel de concentração foram feitos de acordo com a Tabela 2 (Soares *et al.*, 2004).

Tabela 2: Soluções para géis de resolução e de concentração para Eletroforese de Carboidratos.

gel de resolução (mL)		gel de concentração (mL)	
Solução de gel de resolução (38% acrilamida, 2% N,N' metilenebisacrilamida)	6,0	Solução de gel de concentração (1,92m glicina, 0,25m Tris-base, pH 8,3)	2,0
Tampão de resolução 8 x (1,5 M Tris-HCl, pH 8.9),	1,0	Tampão de concentração 8 x (1 M Tris-HCl, pH 6.8)	0,5
H ₂ O destilada	1,0	H ₂ O destilada	1,5
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03	10% de persulfato de amônio (APS)	0,02
TEMED  (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,005

Após a incubação, 2 μ l de Tampão de amostra 2 x (0,01% thorin em 20% glicerol) foram adicionados às amostras. O material foi submetido à Eletroforese de Carboidratos. O gel foi corrido em Tampão 1 x (0,192 M de glicina; 0,025 M Tris-base, pH 8.3) e submetido a uma corrente elétrica constante de 20 mA para cada gel por aproximadamente 1 hora, sob gelo. O gel foi visualizado sob luz UV em transluminador e fotografado.

3.3.1.7 Eletroforese Capilar

Unidades repetitivas desfosforiladas foram marcadas com APTS (8 aminopirene-1,3,6-ácido trissulfônico) 0,02 M em 15% de ácido acético e cianoborohidreto de sódio 1 M em THF. Após a incubação a 55 °C por 90 minutos, a injeção da amostra no capilar foi realizada a 5 psi por 10 segundos seguida da eletroforese a 25 kV por 20 minutos. Unidades repetitivas de *L. (L.) donovani* (LD4) foram utilizadas como controle da reação (Soares *et al.*, 2004).

3.3.1.8 Gel de Monossacarídeos

Os monossacarídeos foram obtidos após hidrólise ácida forte do LPG inteiro (ácido trifluoroacético a 2 N, 100 μ l, 3 horas). Para a retirada dos sais, os monossacarídeos foram aplicados em uma coluna contendo as resinas DOWEX 50WX8-200 e AG1-X8 (acetato) e eluídos com água. O material foi evaporado em *Speed vac* (Soares *et al.*, 2002). Em seguida, os monossacarídeos foram marcados com 1 μ l de AMAC (solução 0,1 M de 2-aminoacridone em DMSO contendo 5% de ácido acético) e 1 μ l de cianoborohidreto de sódio 1 M em THF. As amostras foram incubadas por 18 horas a 37 °C ou 3 horas a 40 °C. O gel de resolução e o gel de concentração foram preparados de acordo com a Tabela 3. O gel foi corrido em Tampão 1 x (0,1 M de glicina; 0,12 M Tris-base, 0,1 M ácido bórico, pH 8.3) e submetido a uma corrente elétrica constante de 20 μ A por aproximadamente 1 hora. O gel foi visualizado sob luz UV em transluminador e fotografado. Foi utilizado o padrão de açúcares D-glicose, D-galactose e D-manose (Sigma).

Tabela 3: Soluções para géis de resolução e de concentração para Eletroforese de Monossacarídeos.

gel de resolução (mL)		gel de concentração (mL)	
Solução do gel de resolução	4,0	Solução do gel de concentração	2,0
(10% Acrilamida, 2,5% N,N'-metilenebisacrilamida)		(10% Acrilamida, 2,5% N,N'-metilenebisacrilamida)	
Tampão de resolução 4 x (0,75 M Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 7.0)	2,0	Tampão de concentração 4 x (0,5 M Tris-HCl, 0,5 ácido bórico, pH 6.8)	1,0
H ₂ O destilada	2,0	H ₂ O destilada	1,0
10% de persulfato de amônio (APS)	0,03	10% de persulfato de amônio (APS)	0,015
TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01	TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina)	0,01

3.3.1.9 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Monossacarídeos foram separados usando a coluna CarboPac PA10 (4 x 250 mm) no aparelho DX-500 da Dionex Corp com detecção eletroquímica ED40. Monossacarídeos foram eluídos com NaOH (18 mM) na velocidade de 1 mL/minuto à pressão de 2000 psi. Padrões de D-glicose, D-galactose e D-manose (100 µg/mL) (Sigma) foram utilizados como controle.

O Gel de Monossacarídeos, a Eletroforese Capilar e a HPLC foram realizadas no Laboratório de Glicobiologia de *Leishmania* da Universidade do Kentucky/USA pelo Dr. Rodrigo Soares e pelo doutorando Rafael Ramiro de Assis em colaboração com o Dr. Salvatore Joseph Turco.

3.3.2 Caracterização do LPG de *L. (L.) chagasi* LPG1KO

Para a observação da presença ou ausência das unidades repetitivas de *L. (L.) chagasi* LPG1KO, a extração e purificação do LPG foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente nos itens 3.3.1.1 e 3.3.1.2. A preparação das unidades repetitivas e partição butanol:água foi realizada como o descrito no item 3.3.1.4. As amostras foram marcadas com fluorocromo e a Eletroforese de Carboidratos foi processada como descrito no item 3.3.1.6.

Para análise da região da porção central (cerne), o LPG purificado foi dissolvido em 300 µL de NaNO₂ (0,5 M) e 300 µL de HNO₂ (0,5 M) (pH 4.0) por 16 horas a 37 °C para desaminação pelo ácido nitroso. Em seguida, foi adicionado 600 µL de ácido acético/NaCl à amostra e a porção lipídica foi removida em coluna de fenil sepharose (Sigma). A amostra foi desalinizada em coluna G25 (SEPHADEX) e o material foi evaporado em *Speed vac*. As amostras contendo as unidades repetitivas e a porção central foram marcadas e submetidas à Eletroforese de Carboidratos (como descrito no item 3.4.1.6).

3.4 Infecção experimental dos flebotomíneos em alimentador artificial

3.4.1 Preparo do sangue contendo parasitos

O sangue foi coletado no plexo venoso retroorbital de camundongos anestesiados (Tiopental Sódico via intramuscular) com o auxílio de pipeta de Pasteur de ponta fina heparinizada e centrifugado a 2500 rpm por 8 minutos. O plasma foi isolado e colocado em banho-maria a 57 °C por uma hora para inativação do sistema complemento. As hemáceas

foram lavadas duas vezes em Meio M199 sem SFB, centrifugadas por 8 minutos a 2500 rpm e mantidas no gelo.

As culturas de *L. (L.) chagasi* WT, amastigotas axênicas e LPG1KO foram coletadas em fase log, contadas em câmara de Neubauer e centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm e 4 °C. Os pellets foram dissolvidos em Meio 199 sem SFB e novamente centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm e 4 °C. Para a infecção experimental as promastigotas selvagens e mutantes foram ressuspensas na mistura contendo sangue e plasma inativado na concentração de 4×10^7 parasitos/ml. Para as amastigotas axênicas esta concentração foi 8×10^7 parasitos/ml. Em alguns experimentos, inibidor de tripsina (1 mg/mL) (*soybean trypsin*, Sigma) foi adicionado ao sangue.

3.4.2 Separação dos flebotomíneos

Recipientes plásticos de 50 mL com o fundo substituído por gesso foram utilizados para produção das gaiolas de alimentação. Um pedaço de filó com um orifício no centro foi preso a cada pote plástico através de ligas de elástico. Os insetos foram anestesiados em CO₂ para a seleção quanto ao número e espécie. Fêmeas provenientes do campo que já estavam alimentadas ou apresentavam ovos foram descartadas. Espécies diferentes de *L. (L.) longipalpis* foram excluídas do experimento. Em cada experimento foram utilizados cerca de cinco potes plásticos com cerca de 120-140 fêmeas em cada.

3.4.3 Infecção experimental

Pequenos recipientes de vidro transparente com capacidade de 300-500  semelhantes a funis invertidos, foram conectados através de finas mangueiras (do tipo das usadas em aquários) e utilizados como “alimentadores artificiais” para realização da infecção experimental. Na base inferior de cada recipiente de vidro foi colocada pele fresca recém dissecada da parte ventral de frango jovem (*G. g. domesticus*). Na parte superior do recipiente foi introduzido o sangue de camundongo contendo a concentração desejada de parasitos. A temperatura dos alimentadores foi mantida entre 38 e 40 °C pela circulação de água aquecida nas mangueiras. A parte inferior dos alimentadores foi colocada no orifício do filó, permitindo dessa forma que os flebotomíneos fossem atraídos e se alimentassem com sucesso. O tempo de repasto geralmente foi de 2-3 horas e iniciou-se por volta das 11 horas da manhã (Figura 7).

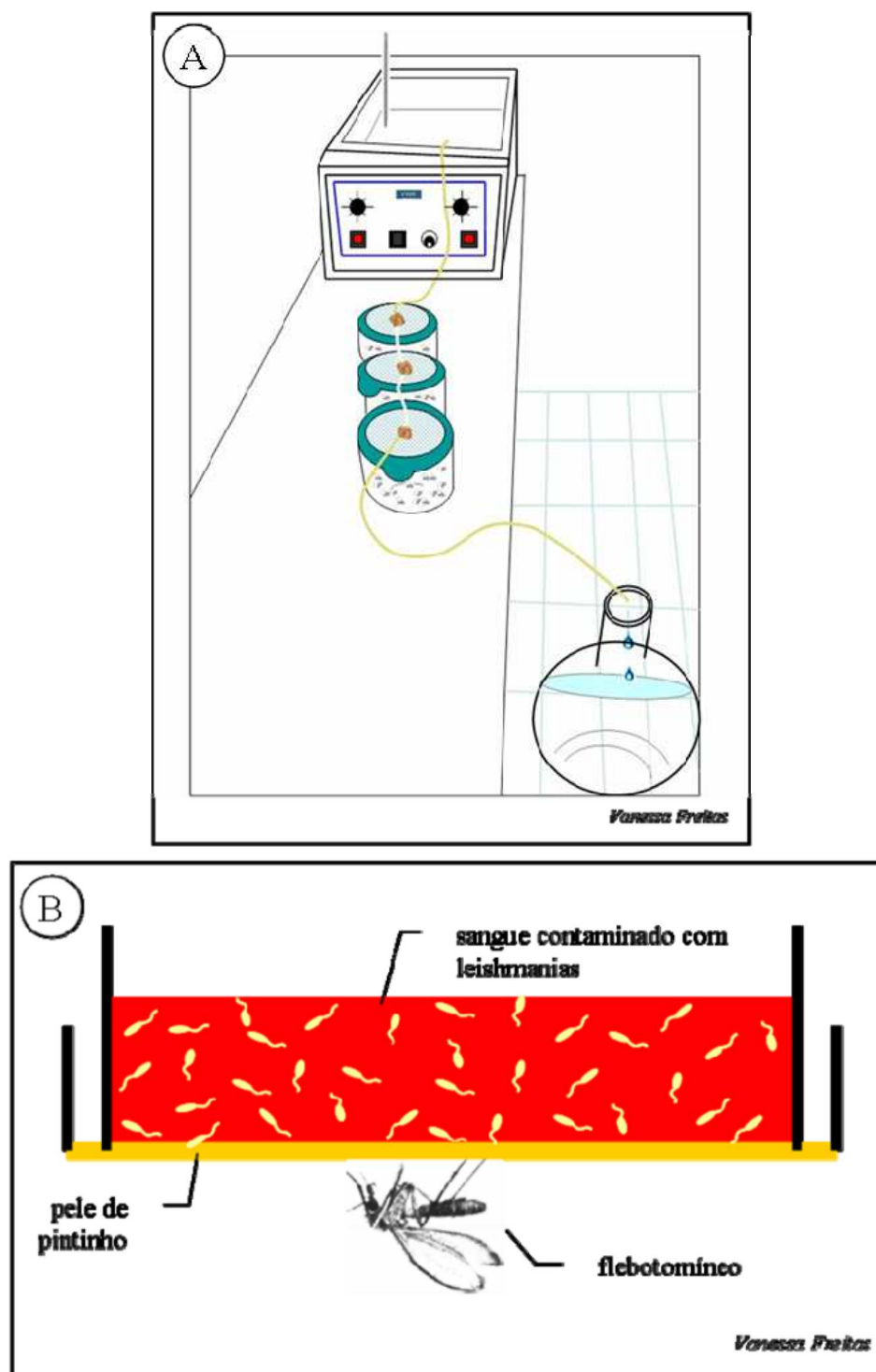


Figura 7: Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral dos recipientes contendo flebotomíneos conectados aos "alimentadores artificiais". (B) Detalhe do alimentador revestido por pele de pintinho (*G. g. domesticus*) contendo sangue e promastigotas de *Leishmania*.

3.4.4 Manutenção dos flebotomíneos infectados

Os flebotomíneos infectados foram mantidos até o momento da dissecação em dieta de solução sacarose 30%, colocada em pequenos chumaços de algodão. As gaiolas foram limpas diariamente e os flebotomíneos mortos retirados. A cada dois dias os insetos foram transferidos para gaiolas limpas.

3.4.5 Dissecação e análise do processo de infecção dos flebotomíneos

As fêmeas alimentadas foram anestesiadas em CO₂ e separadas das que não se alimentaram por aspiração utilizando-se capturador manual (Figuras 8 e 9).



Figura 8: Espécimes de *L. (L.) longipalpis* anestesiados em CO₂ e gelo para triagem.

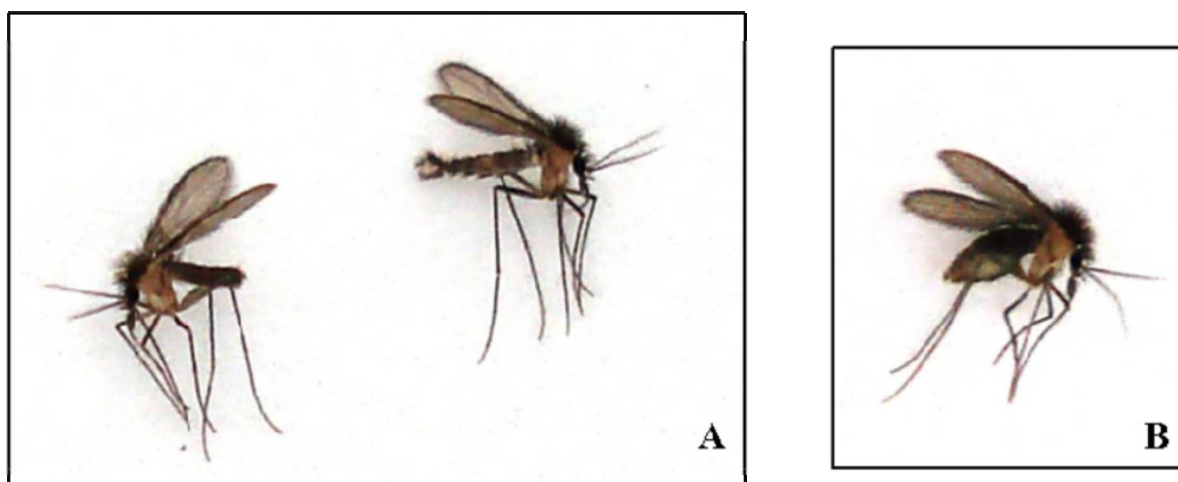


Figura 9: Detalhes da triagem de *L. (L.) longipalpis*. **(A)** fêmea não ingurgitada e macho de *L. (L.) longipalpis* (da esquerda para a direita); **(B)** fêmea de *L. (L.) longipalpis* ingurgitada com sangue.

Em seguida, as fêmeas foram anestesiadas no freezer (-4 °C) por 5 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo PBS, pH 7.2, sobre gelo, de forma que os insetos ficassem imobilizados. As fêmeas foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de PBS e com a ajuda de lupa e estiletes foram dissecadas. Primeiramente a cabeça foi decepada, as asas retiradas e, apoiando-se um estilete no tórax e outro na região abdominal, os últimos tergitos foram puxados com movimentos leves, trazendo o intestino para fora do corpo do flebotomíneo. Nos casos de dúvida quanto à espécie da fêmea analisada foi realizada a identificação específica através da análise da morfologia da espermateca (Young & Duncan, 1994). Cada intestino foi colocado em um tubo tipo Eppendorf contendo 30 μ l de PBS. A densidade e os morfotipos dos parasitos no intestino foram analisados diariamente. O número de promastigotas em cada intestino foi quantificado através de contagem em câmara de Neubauer. O índice de infecção foi representado pela porcentagem de insetos infectados através do exame ao microscópio óptico dos intestinos dissecados. A morfotipagem (nomenclatura de Lawyer *et al.*, 1990) (Figura 2) foi realizada através da análise de lâminas produzidas com 10 μ l de macerado de intestino e coradas pelo método Panótico rápido. Foram contados pelo menos 300 por lâmina. A análise dos intestinos infectados foi realizada do 2º ao 10-11º dia após alimentação sanguínea infectante. Todas as fêmeas analisadas 48 horas após o repasto ainda mantinham o bolo sanguíneo. A partir do 3º dia só foram analisadas fêmeas sem a presença de sangue no intestino médio.

3.5 Análise da susceptibilidade de promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO a lisado de intestinos contendo sangue

Fêmeas de flebotomíneos foram alimentadas em alimentador artificial com sangue de camundongo não infectado como descrito no item 3.4. Os intestinos foram dissecados 24 horas após o repasto e estocados individualmente em tubos tipo Eppendorf a -20 °C. No momento do uso os intestinos foram lisados 1 minuto em gelo seco e um minuto em banho 37 °C, alternadamente, por 10-15 vezes. Dois microlitros de uma suspensão de parasitos contendo 2×10^4 promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT ou LPG1KO, em fase log, foram adicionados a cada intestinos lisado, que foi incubado por 12 horas a 26-27 °C. Em alguns experimentos, inibidor de tripsina (1 mg/mL) (*soybean trypsin*, Sigma) foi adicionado aos parasitos. O mesmo volume de suspensão contendo *L. (L.) chagasi* WT ou LPG1KO foi incubado em tubos tipo Eppendorf nas mesmas condições descritas acima e utilizados como controle. A

suspensão de cada tubo foi diluída em 30  de Meio M199 sem SFB e a densidade de parasitos viáveis foi determinada em câmara de Neubauer e comparada aos controles.

3.6 Morfologia intestinos infectados com *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO

3.6.1 Microscopia Óptica (MO)

3.6.1.1 Processamento dos flebotomíneos e inclusão em historesina

As fêmeas infectadas em diferentes tempos tiveram as asas e patas retiradas e foram fixadas inteiras em formaldeído 2,5% durante pelo menos 24 horas em geladeira. Foram utilizadas fêmeas alimentadas com sangue não infectado como controle. Em alguns casos somente o intestino foi fixado. As amostras foram lavadas 3 vezes em PBS e desidratadas em soluções crescentes de etanol (30-100%) durante 10 minutos em cada banho. Na solução de etanol 100% o banho foi repetido mais duas vezes. O material foi embebido em historesina (Leica) e etanol 100% (1:1) por 5 minutos e depois em historesina pura por, no mínimo, 24 horas, em geladeira. Após embebição em resina, as amostras foram colocadas em moldes que foram preenchidos com historesina contendo endurecedor. Os cortes semi-finos (2 ) foram obtidos em MicrótoMo (Micron) e distendidos em água em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas foram coradas conforme o protocolo a seguir.

3.6.1.2 Coloração com Azul de Toluidina

As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,1% por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, montadas em Enthelan (Merck) e fotografadas em Microscópio Óptico (LSM 510, Zeiss) para posterior análise morfológica.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os intestinos infectados, proveniente de diferentes tempos, foram fixados por pelo menos 24 horas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2. Os intestinos foram lavados em PBS e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% (Pimenta & De Souza, 1985) por 2 horas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a pós-fixação, os intestinos foram lavados em PBS por três vezes, e então desidratados em concentrações crescentes de acetona. Em seguida, os intestinos

foram secos em ponto crítico, montados em suportes (*stubs*) e submetidos à metalização com cobertura de ouro (Pimenta & De Souza, 1986). As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio Jeol® JSM-5600.

3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os intestinos dissecados foram fixados por 24 horas, em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2, lavados em PBS, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% (Pimenta & De Souza, 1985) por duas horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a pós-fixação, os intestinos foram lavados três vezes em tampão PBS e desidratados em concentrações crescentes de acetona. Em seguida, os intestinos foram infiltrados em acetona/Epon 1:1 e, posteriormente em Epon puro, sendo então montados em moldes para MET e colocados na estufa a 57 °C durante 48 horas. Após a polimerização dos blocos, foram obtidos cortes ultrafinos em ultra-micrótomo, que foram coletados em grades de microscopia eletrônica. Os cortes foram contrastados por 30 minutos em acetato de uranila aquoso e por cinco minutos em citrato de chumbo e foram lavadas em água destilada (Pimenta & De Souza, 1986). O material foi observado e fotografado em microscópio Jeol JEM-1011, câmera Gatan Bioscan, modelo 792.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT

Para se conhecer o perfil de crescimento da cepa selvagem e se obter um número máximo de parasitos viáveis para os experimentos foi realizada uma curva de crescimento iniciada com 1×10^5 parasitos/mL. Foi observado que a cepa BH46 WT foi capaz de alcançar a fase estacionária em cerca de 8-9 dias com uma densidade máxima de $4-5 \times 10^7$ parasitos/mL. Por esta razão, foi escolhido o 8º dia de crescimento da cultura para utilização nos experimentos subseqüentes (Figura 10).

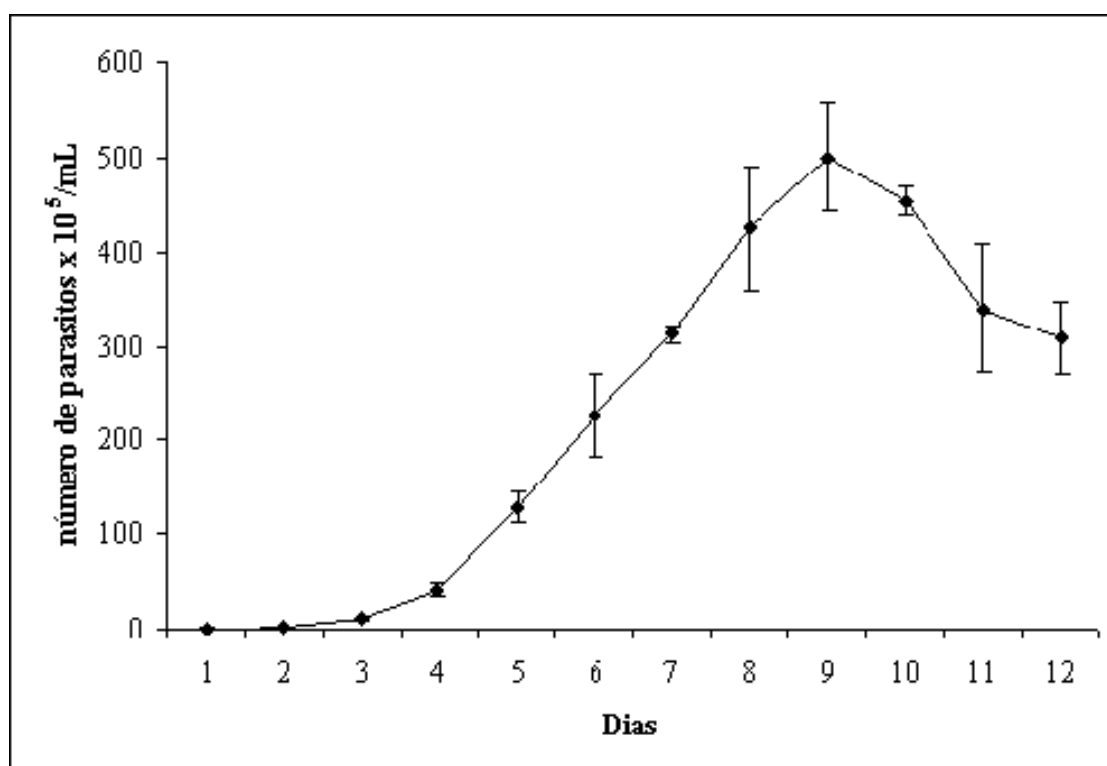


Figura 10: Curva de crescimento de *L. (L.) chagasi* WT em Meio M199 acrescido de 10% de SFB a 26 °C. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

4.2 Geração de amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

4.2.1 Cinética do crescimento

Para validar a indução de amastigotas extracelulares, a cinética de transformação foi utilizada. Assim como observado para as formas promastigotas, a curva de crescimento das amastigotas axênicas apresentou uma fase log chegando à fase estacionária em quatro dias (Figura 11). A densidade da cultura foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Após 3 dias de incubação a maior parte dos parasitos tornou-se completamente imóvel com nenhum flagelo extracelular visível. Embora células individuais estivessem presentes na cultura, muitas das amastigotas axênicas cresceram em grumos. O maior número de formas amastigotas foi encontrado no quarto dia após a incubação e, por esta razão, foram utilizados parasitos provenientes desse dia para infecção experimental. Após esse período, o número total de células diminuiu, indicando mortalidade. Concomitantemente, o número de formas promastigotas decresceu, indicando o sucesso na diferenciação em amastigotas (Figura 11).

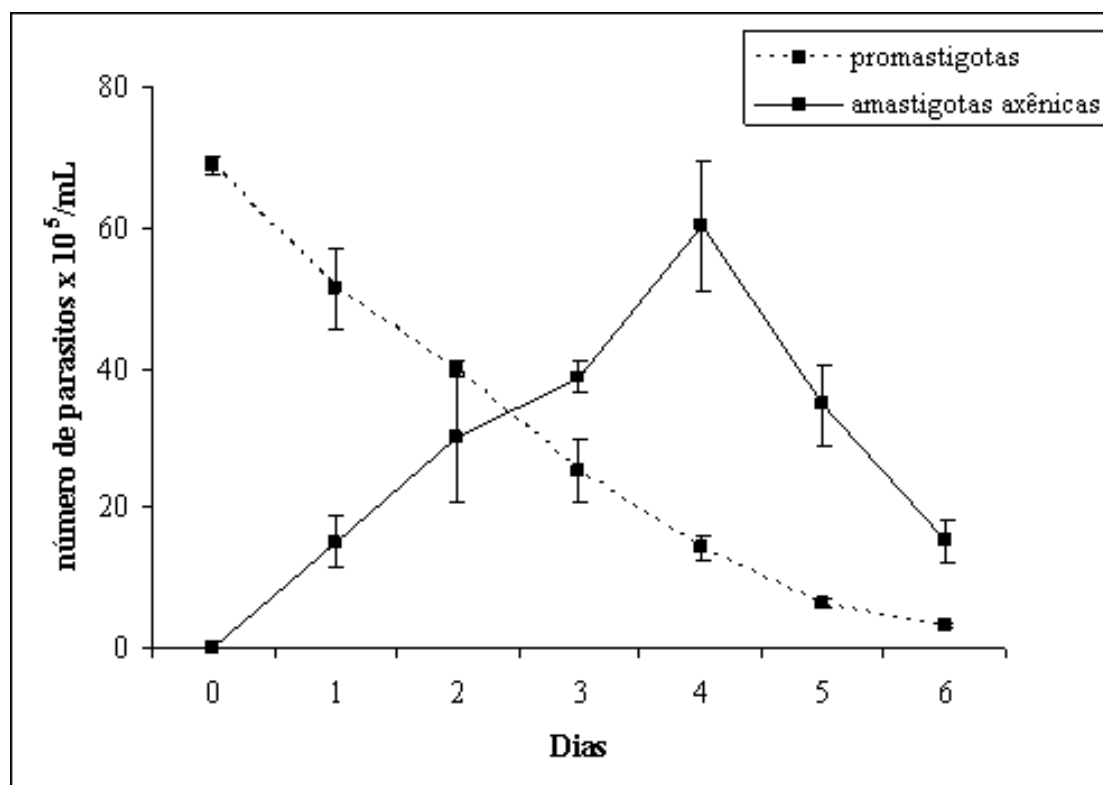


Figura 11: Curva de crescimento e transformação de amastigotas axênicas a partir de promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT em Meio M199 acrescido de 20% SFB e hemina ($25 \mu\text{g}/\text{mL}$) e incubação a 37°C com 5% CO_2 . Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

4.2.2 Morfologia

Em adição a cinética de crescimento, a morfologia das amastigotas extracelularmente induzidas foi avaliada. Em observações por ML e MEV, as amastigotas apresentaram-se claramente distintas das promastigotas após quatro dias de incubação (Figura 12 e 13). Promastigotas são fusiformes, com um longo flagelo (Figura 12A e 13A) e cinetoplasto localizado na porção anterior do corpo (figura 12A). Durante o período de incubação as promastigotas sofreram significativas mudanças morfológicas, tais como redução de tamanho, encurtamento do flagelo extracelular e arredondamento do corpo celular (Figura 12B-D e 13B-D). Tais mudanças não foram sincrônicas no início do período de incubação. Foram observadas algumas formas promastigotas arredondadas, outras longas e móveis e formas intermediárias, que apresentaram uma morfologia típica de promastigota, com o corpo elíptico alongado e algumas vezes com um pequeno flagelo atípico (Figura 13B e C). Amastigotas axênicas apresentaram-se ovóides e com ausência de flagelo externo após 96 horas de incubação (Figura 12B-D e 13D).

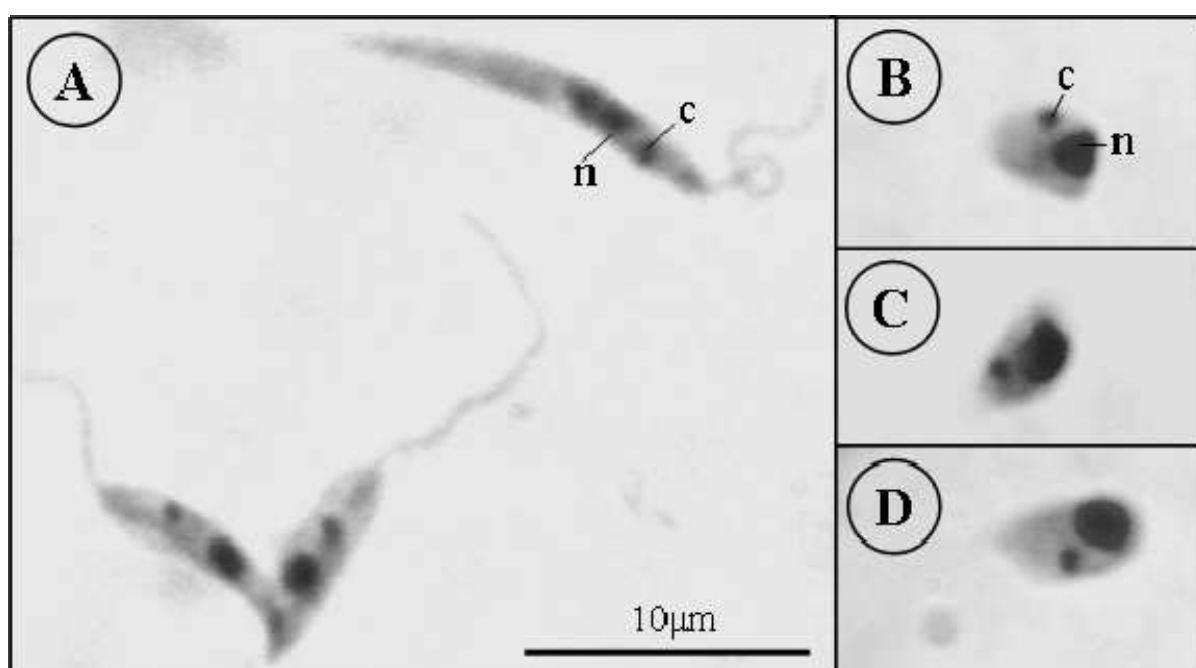


Figura 12: Morfologia de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT coradas pelo método Panótico Rápido e observadas em microscópio óptico. **(A)** Cultura de promastigotas a 26 °C: parasitos fusiformes, com um longo flagelo e um pequeno cinetoplasto localizado na porção anterior do corpo; **(B)-(D)** cultura de amastigotas axênicas a 37 °C após 96 horas de incubação: parasitos ovóides e com ausência de flagelo externo. c=cinetoplasto; n=núcleo.

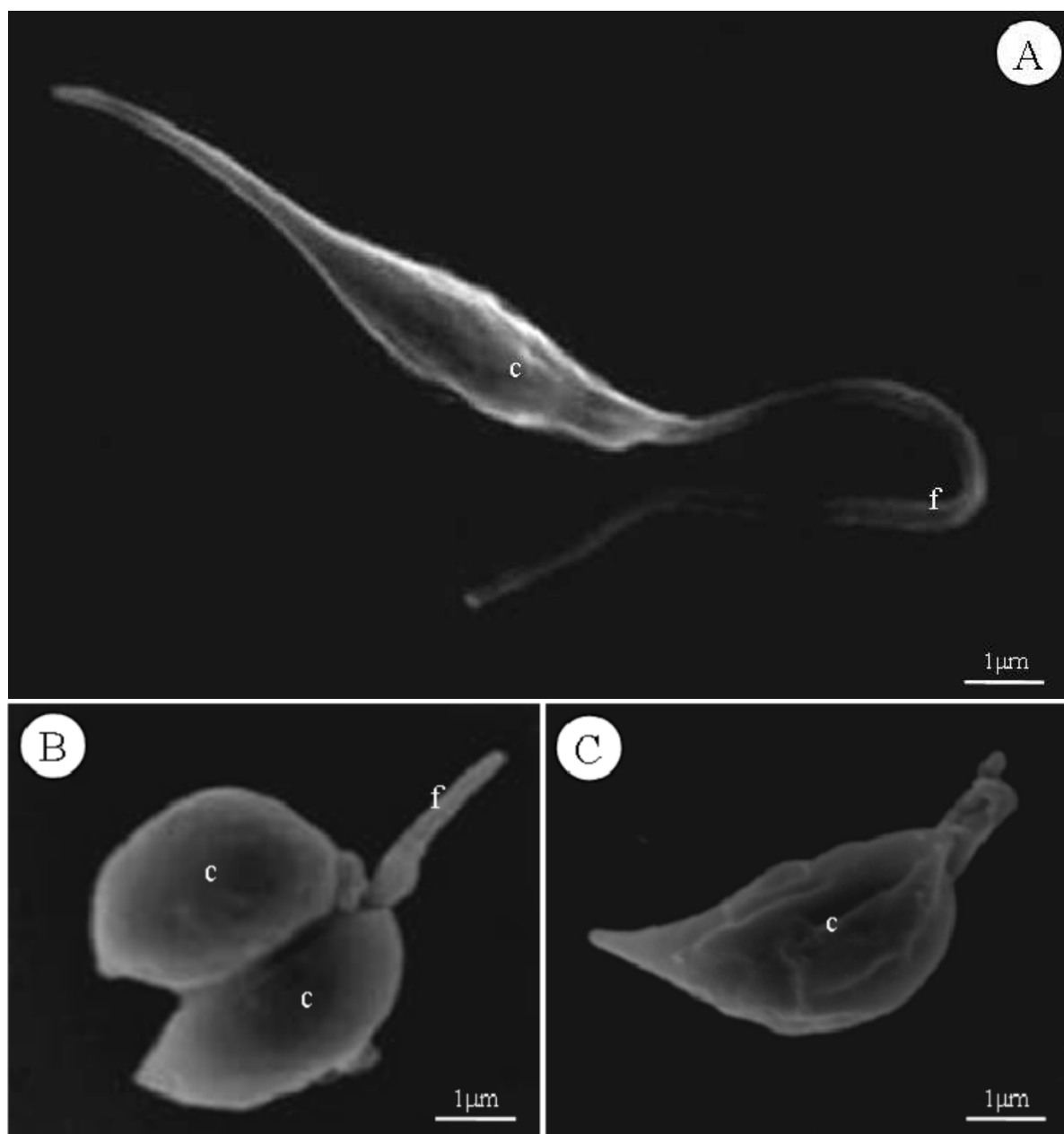


Figura 13: Morfologia de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT observada em Microscópio Eletrônico de Varredura. **(A)** cultura de promastigotas a 26 °C: parasitos fusiformes, com um longo flagelo; **(B)** formas intermediárias presentes em cultura de amastigotas axênicas a 37 °C, 48 horas após incubação; **(C)** parasitos ovóides, com redução do corpo celular e ausência de flagelo externo em cultura de amastigotas axênicas a 37 °C, 96 horas após incubação. c=corpo celular; f=flagelo.

4.2.3 Transformação cíclica

A reversão de amastigotas axênicas em promastigotas foi também avaliada em cultura. Após um dia de incubação, flagelos extracelulares começaram a emergir e formas intermediárias foram observadas em pequena parte da população. Em 6 dias promastigotas alongadas totalizavam 87,4% da população da cultura. Nesse período, formas promastigotas em divisão também foram observadas, indicando o início da fase multiplicativa dessa cultura (Figura 14).

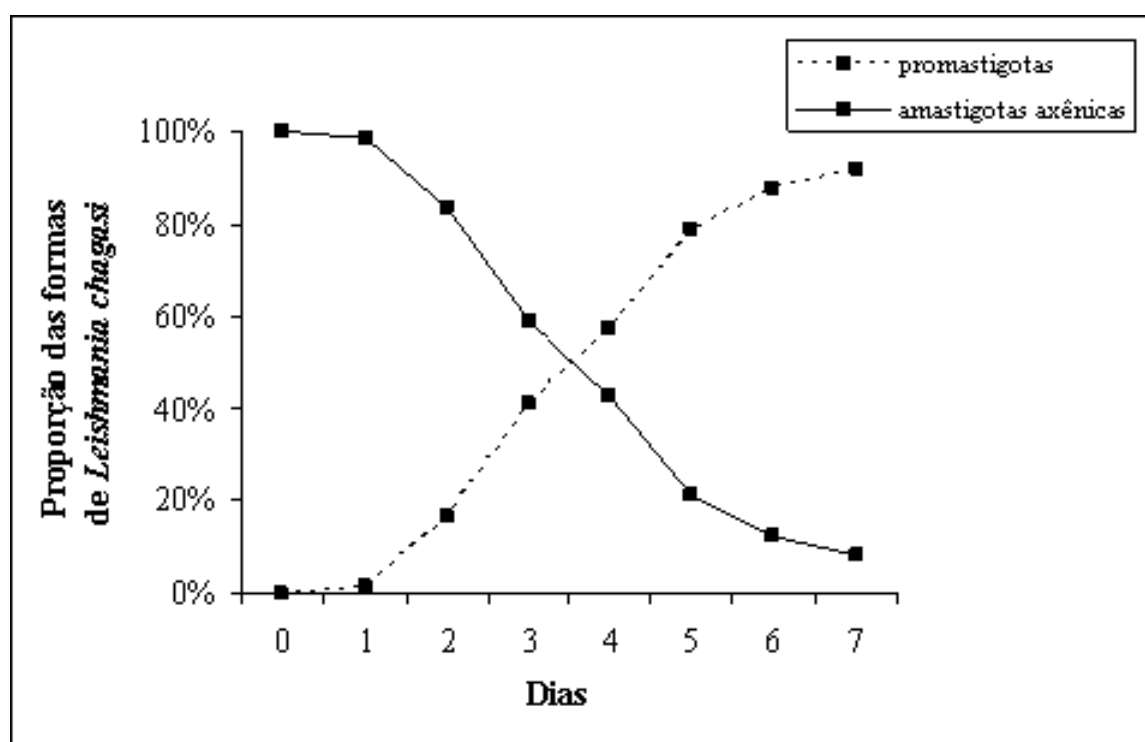


Figura 14: Curva de reversão das formas amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT em formas promastigotas, após adição de Meio M199 (10% SFB) e incubação a 26°C.

4.2.4 Infecção de macrófagos *in vitro*

Para determinar a infecciosidade das amastigotas axênicas foram realizados experimentos de infecção em macrófagos peritoneais murinos. Após 24 horas de interação 80,5% dos macrófagos estavam infectados por amastigotas (setas na figura 15). Após 48 e 72 horas de interação os macrófagos ainda mantiveram taxas de infecção maiores que 60%. Em adição, a replicação das formas amastigotas dentro dos macrófagos foi indicada pela presença de dois núcleos ou dois cinetoplastos por célula (* na figura 15).

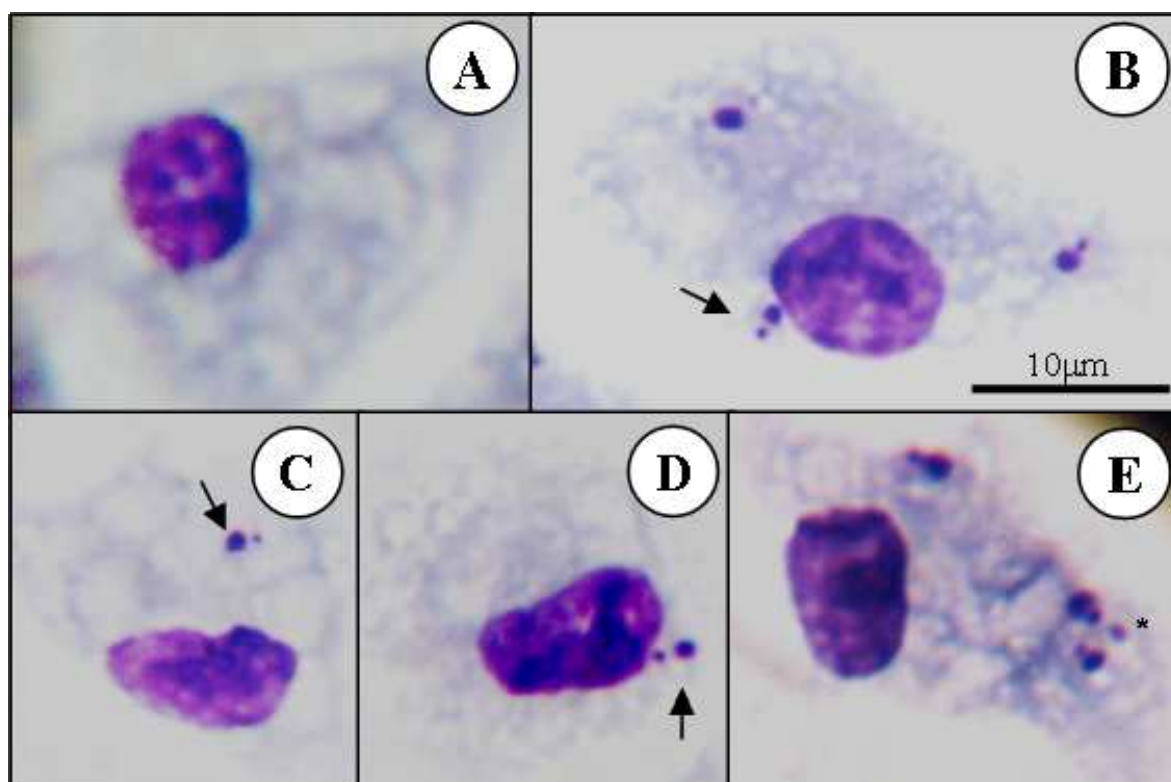


Figura 15: Infecção de macrófagos peritoneais murinos (BALB/c) com *L. (L.) chagasi* WT corados pelo método Panótico Rápido. (A) macrófago não infectado; (B)-(E) macrófagos infectados com amastigotas axênicas. Setas=amastigotas axênicas; asterisco=detalhe de uma amastigota axênica com cinetoplasto duplicado.

4.2.5 SDS-PAGE de proteínas totais de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

Para se avaliar bioquimicamente a expressão diferencial de proteínas nas formas promastigotas e amastigotas axênicas, extratos totais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 16). Foram observadas diferenças qualitativas marcantes no perfil de proteínas totais entre os dois tipos celulares.

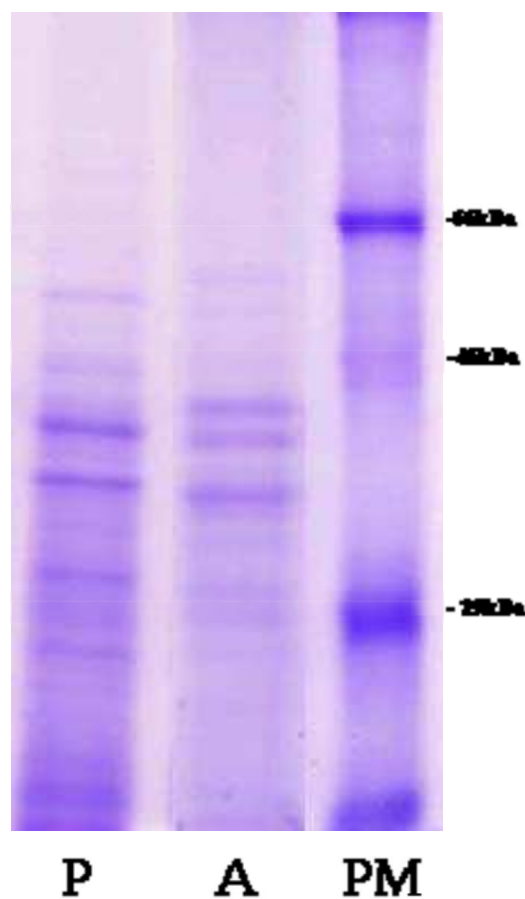


Figura 16: Perfil eletroforético (SDS PAGE 10%) de proteínas totais de promastigotas (P) e amastigotas axênicas (A) de *L. (L.) chagasi* WT corado com solução corante Commassie Blue. O equivalente a 10^7 parasitos foi colocado em cada canaleta. Os pesos moleculares são dados. A=amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT; P=promastigota de *L. (L.) chagasi* WT; PM=peso molecular.

4.2.6 RT-PCR

Para se avaliar a expressão da proteína A2, extratos de cultura de promastigotas e de amastigotas axênicas obtidos em diferentes tempos após incubação a 37°C foram submetidos a RT-PCR. A proteína A2 foi abundantemente expressa em amastigotas axênicas em 96 horas de incubação (Figura 17a), mas foi ausente em promastigotas e nos outros tempos de incubação de amastigotas axênicas (Figura 17a). O *primer* utilizado como normalizador foi o alfa tubulina (Figura 17b).

Todos os resultados descritos acima indicam o sucesso na transformação *in vitro* das amastigotas axênicas e dão suporte aos experimentos de infecção no vetor que são descritos a seguir.

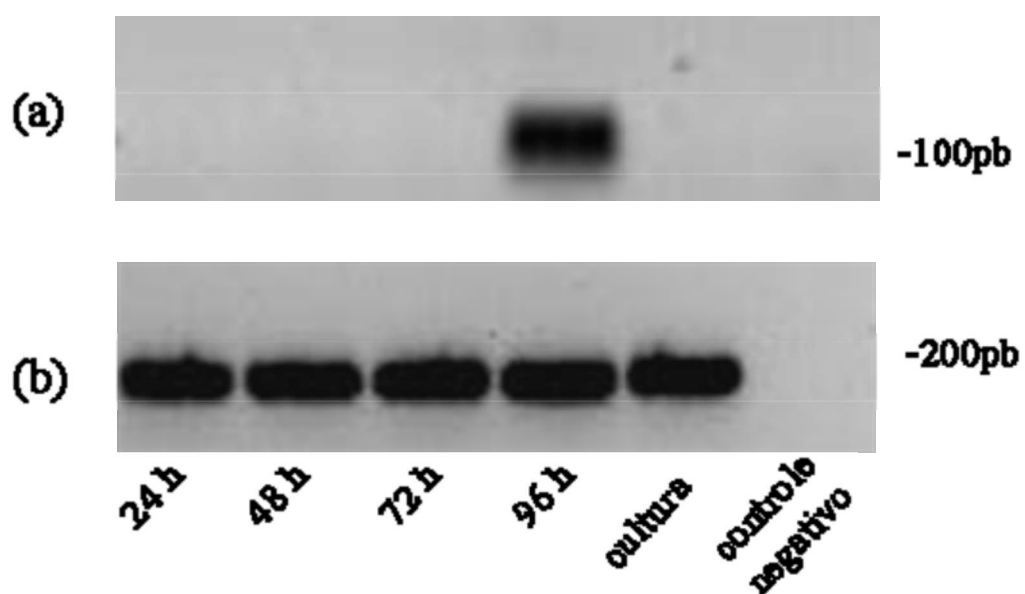


Figura 17: Análise em RT-PCR da expressão da proteína A2 em amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT. *Primer* A2 (a) e *primer* alfa tubulina (b). Colunas 1 a 4: amastigotas axênicas 24, 48, 72, e 96 horas após a incubação *in vitro*; coluna 5: cultura de promastigotas; coluna 6: controle negativo sem DNA.

4.3 Geração de promastigotas de *L. (L.) chagasi* LPG1KO

Para avaliarmos o papel da molécula de LPG na interação *L. (L.) chagasi* / *L. (L.) longipalpis* foi criada uma linhagem de mutantes isogênicos de *L. (L.) chagasi* BH46 deficientes na molécula de LPG por deleção do gene alvo. Parasitos de *L. (L.) chagasi* LPG1KO têm deficiência no passo que envolve a adição de uma galactofuranose para a região glicana do “core” do LPG. Sendo assim, os parasitos perdem a habilidade para finalizar a montagem da parte central (“core”) e dar continuidade a porção de unidades repetitivas do LPG, impedindo assim a síntese dessa molécula (Figura 18).

4.3.1 Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) chagasi* LPG1KO

Para se conhecer o perfil de crescimento da cepa mutante em LPG1 e se obter um número máximo de parasitos viáveis para os experimentos foi realizada uma curva de crescimento. Os parasitos foram semeados a partir de uma cultura de células em fase estacionária, em triplicata, em garrafas para cultivo de células na concentração inicial de 1×10^5 parasitos/mL. Foi observado que LPG1KO foi capaz de alcançar a fase estacionária em 6 dias com uma densidade máxima de 10^7 parasitos/mL. Por esta razão, foi escolhido entre o 5º-6º dia de crescimento da cultura para utilização dos parasitos nos experimentos subsequentes (Figura 19).

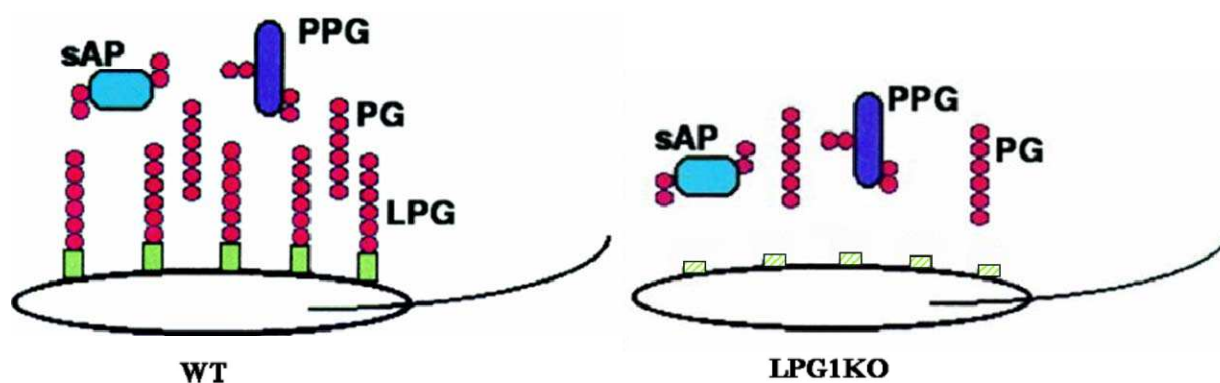


Figura 18: Desenho esquemático da superfície celular de promastigotas de *Leishmania* selvagens (WT) e deficientes no gene *LPG1* (LPG1KO) (modificado de Lodge & Descoteaux, 2005). Promastigotas WT expressam todos os glicoconjugados de superfície; promastigotas LPG1KO são deficientes na síntese de LPG.

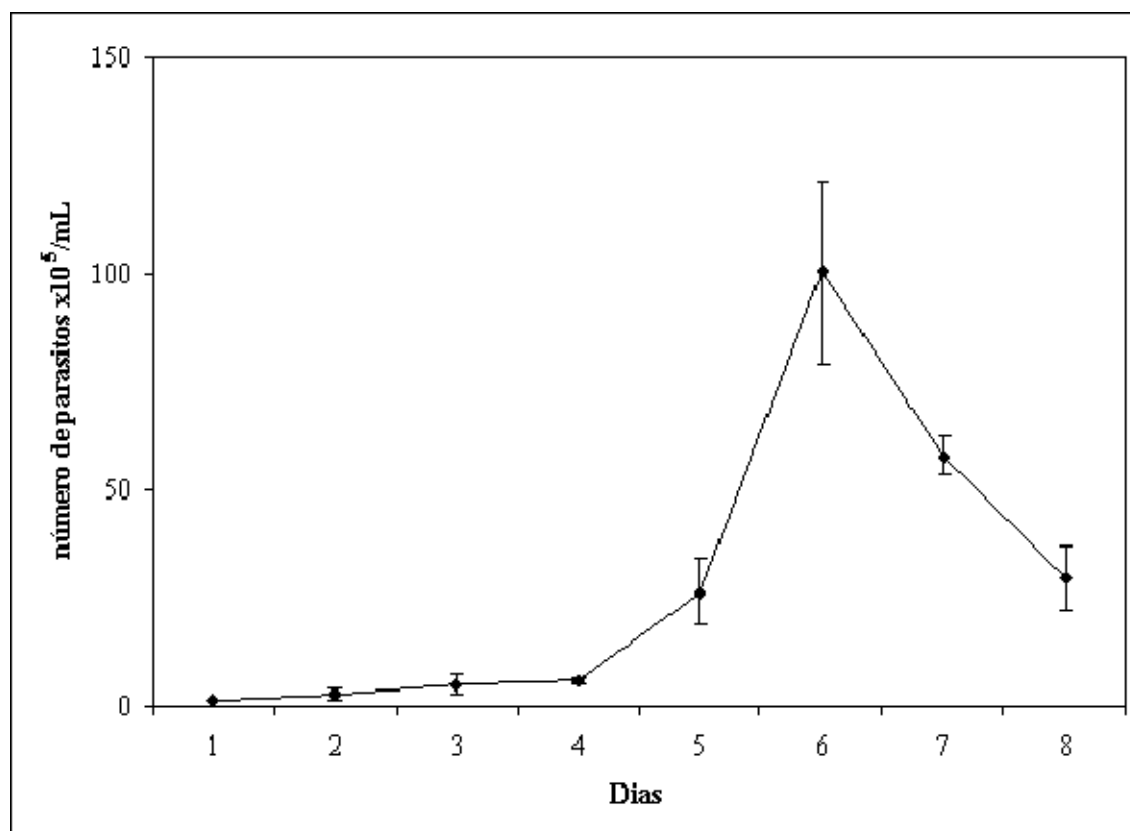


Figura 19: Curva de crescimento de *L. (L.) chagasi* LPG1KO em Meio M199 acrescido de 10% de SFB a 26 °C, 5 µg/mL de gentamicina (G418) e 50 µg/mL de higromicina.

4.3.2 Morfologia de promastigotas de *L. (L.) chagasi* LPG1KO

A linhagem de promastigotas selvagens apresentou parasitos com aspecto fusiformes, com um longo flagelo e que cresceram soltos no meio de cultura (Figura 20A e C). Já a linhagem mutante LPG1KO apresentou parasitos com aspecto mais arredondado (Figura 20B e D), e que cresceram aderidos ao fundo da garrafa de cultivo. Embora células individuais estivessem presentes na cultura, muitos parasitos cresceram em grumos na fase log (detalhe em 20B). Esses grumos foram maiores e mais evidentes na fase estacionária.

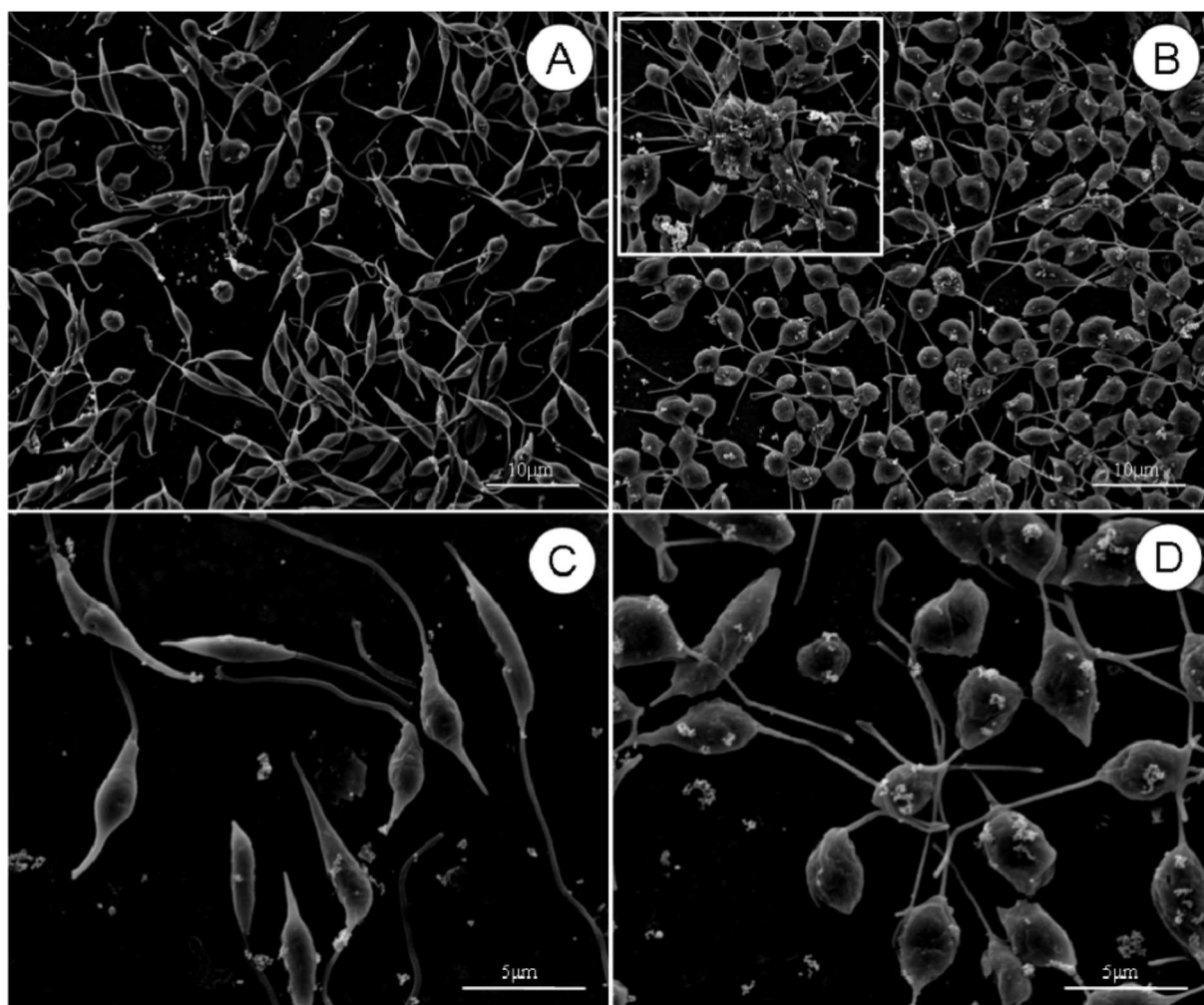


Figura 20: Cultura de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO. Os parasitos foram processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) e (C) promastigotas WT e (B) e (D) promastigotas LPG1KO.

4.4 Caracterização do LPG de *L. (L.) chagasi* WT

4.4.1 Detecção do LPG

Para confirmar o sucesso da extração, uma alíquota contendo LPG foi submetida à eletroforese em Gel de Poliacrilamida, transferida para uma membrana de nitrocelulose e incubada com o anticorpo CA7AE para visualização qualitativa do LPG. O anticorpo CA7AE reconheceu as unidades repetitivas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT, demonstrando assim que o LPG foi extraído e purificado com êxito. O LPG apresentou massa molecular em torno de 50 kDa no ponto médio do arraste (Figura 21).

4.4.2 Caracterização das unidades repetitivas

As unidades repetitivas purificadas e desfosforiladas foram marcadas e submetidas à Eletroforese de Carboidratos (FACE). Foram observadas bandas nas posições G2, G3, G4 e G5. A banda na posição G2 co-migra com o marcador de peso molecular de oligoglicoses (G1-G7) indicando a presença de dissacarídeo Gal-Man presentes em todos os LPGs. As bandas nas posições G3, G4 e G5 indicam a presença de cadeias laterais, porém não é possível determinar neste ponto qual tipo de hexose estaria presente (Figura 22).

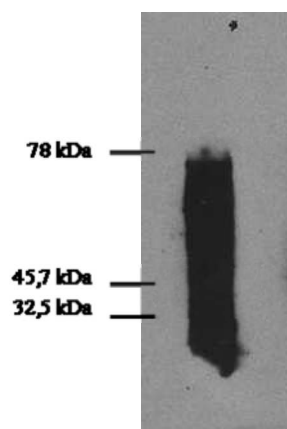


Figura 21: LPG de *L. (L.) chagasi* WT incubado com o anticorpo CA7AE e demonstrado por Western-blot.

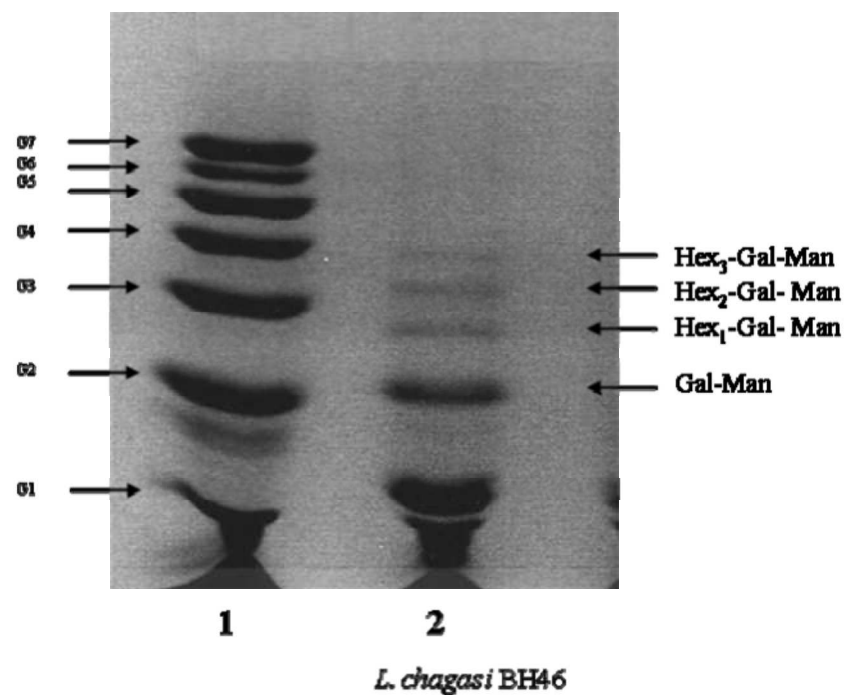


Figura 22: Perfil das unidades repetitivas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT obtido por Eletroforese de Carboidratos (FACE). **Coluna 1**, padrão de peso molecular de oligoglicoses (G1-G7); **coluna 2**, unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT revelando a presença de 4 bandas. Hex = hexose, Gal = galactose, Man = manose.

Para se determinar a real proporção de di, tri, tetra e pentassacarídeos as unidades repetitivas foram submetidas à Eletroforese Capilar, que é uma técnica mais sensível que permite a determinação da proporção de unidades repetitivas. O controle foi representado por *L. (L.) donovani* (LD4), que demonstra 100% de dissacarídeos (Gal-Man) (Figura 23A). As unidades repetitivas da cepa BH46 selvagem apresentaram di, tri, tetra e pentassacarídeos nas proporções de 23, 44 e 17 e 16% respectivamente (picos em 23B).

Para determinar a composição de açúcares nas cadeias laterais, as mesmas foram despolimerizadas em monossacarídeos e foi realizada a Eletroforese de Monossacarídeos e a HPLC. Como esperado, o gel de monossacarídeos mostrou uma banda de galactose e manose para o LPG de *L. (L.) donovani* (LD4) utilizado como controle. Na cepa BH46 selvagem foi observada uma terceira banda que migra junto com a glicose do padrão de açúcares (Figura 24). Estes resultados foram confirmados pela técnica da HPLC (Figura 25) indicando que as unidades repetitivas do LPG da cepa BH46 WT possuem 1 a 3 resíduos de glicose como cadeias laterais. É a primeira vez que se observa em uma cepa de *L. (L.) chagasi* a presença de um LPG poliglicosilado (Figura 26).

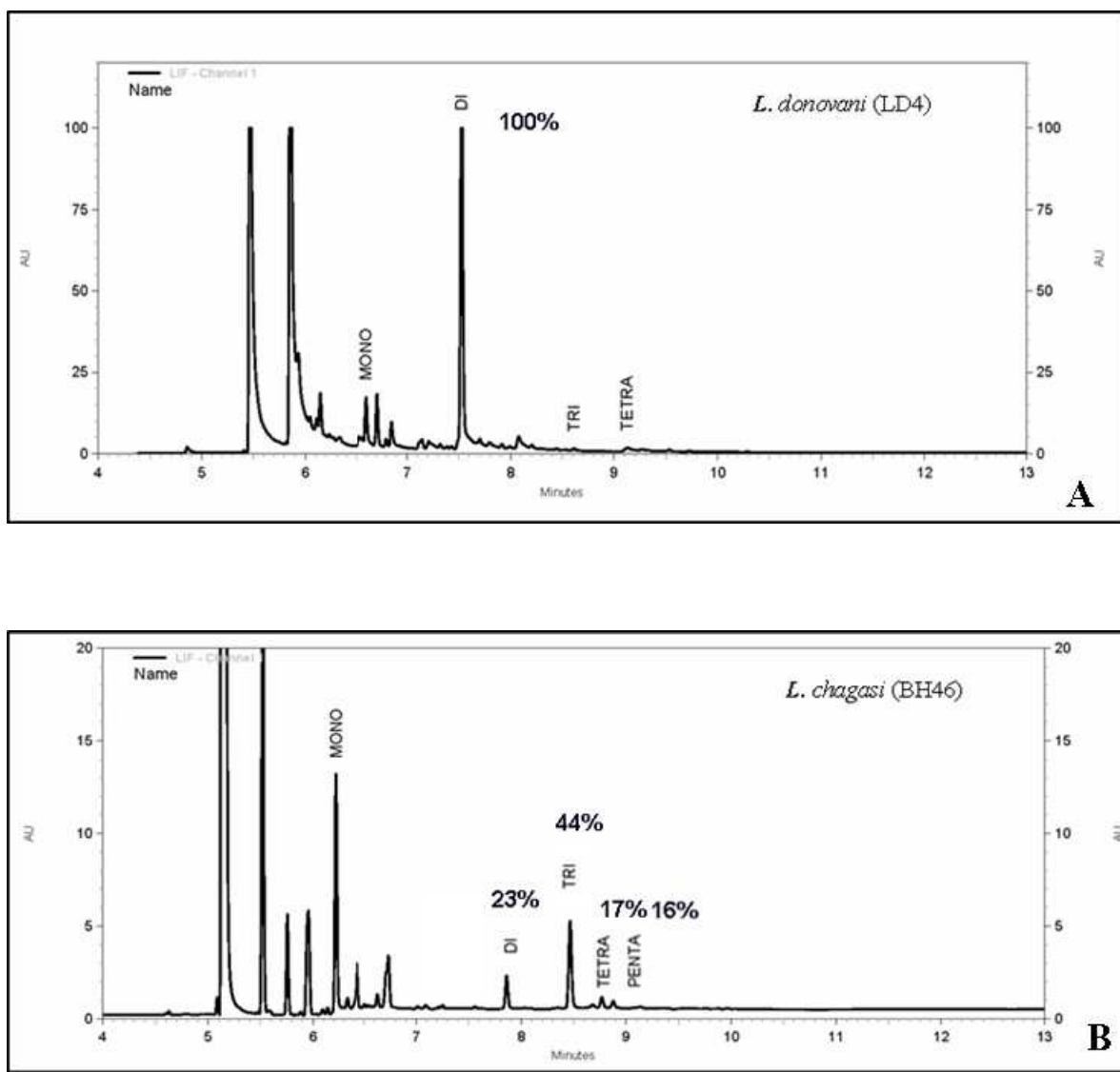


Figura 23: Eletroforese Capilar das unidades repetitivas desfosforiladas de *L. (L.) donovani* (LD4) (A) e *L. (L.) chagasi* WT (B).

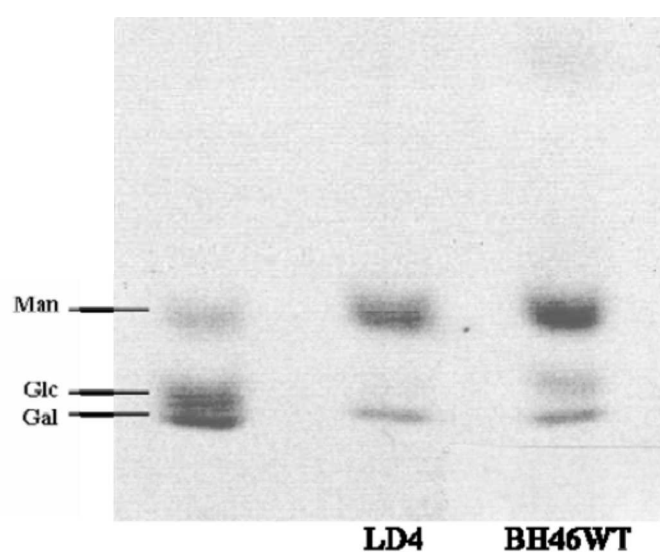


Figura 24: Eletroforese de Monossacarídeos de *L. (L.) chagasi* WT (BH46WT). O controle é representado por *L. (L.) donovani* (LD4), que não apresenta cadeias laterais. Gal=galactose; Glc=glicose; Man=manose.

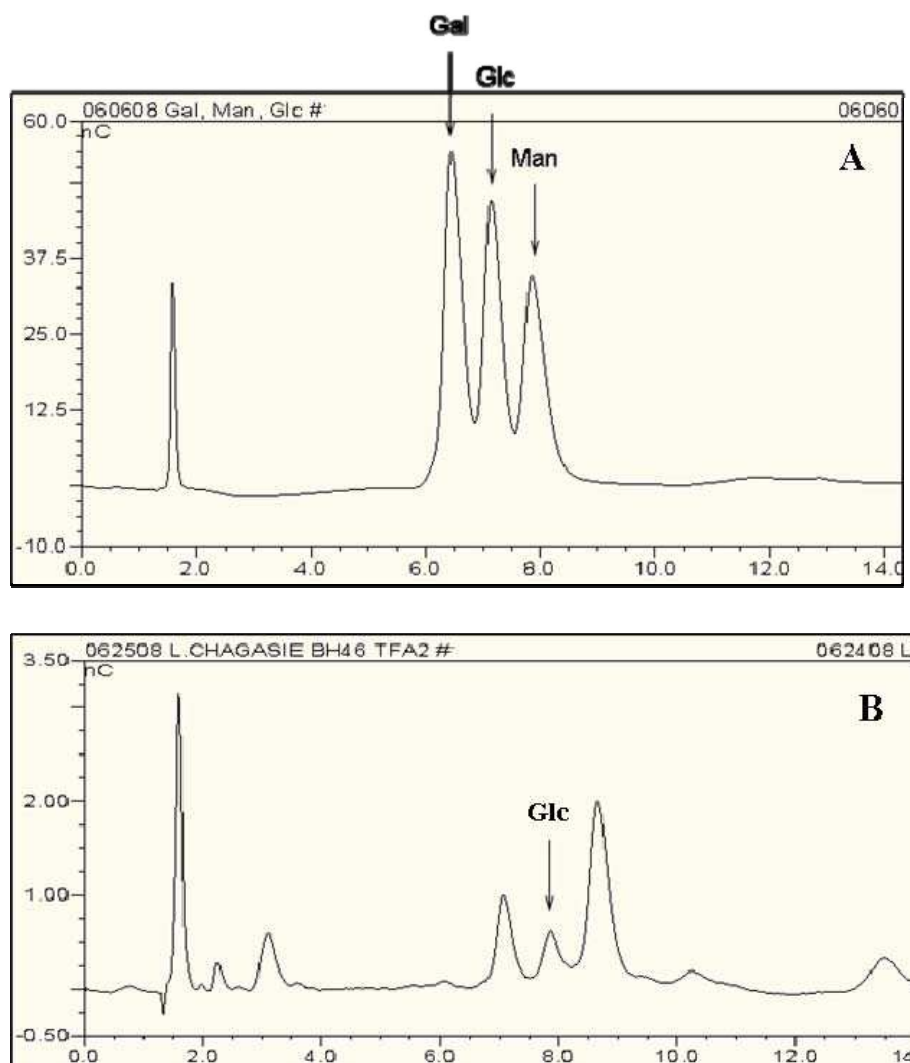


Figura 25: Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de *L. (L.) chagasi* WT. **(A)** Padrão de galactose (Gal), glicose (Glc) e manose (Man); **(B)** Proporção dos monossacarídeos das unidades repetitivas de *L. (L.) chagasi* WT. A seta em (B) aponta para o pico de glicose para *L. (L.) chagasi* WT.

Diante desses resultados, a estrutura proposta para o LPG de *L. (L.) chagasi* (BH46) WT é descrita a seguir na Figura 26.

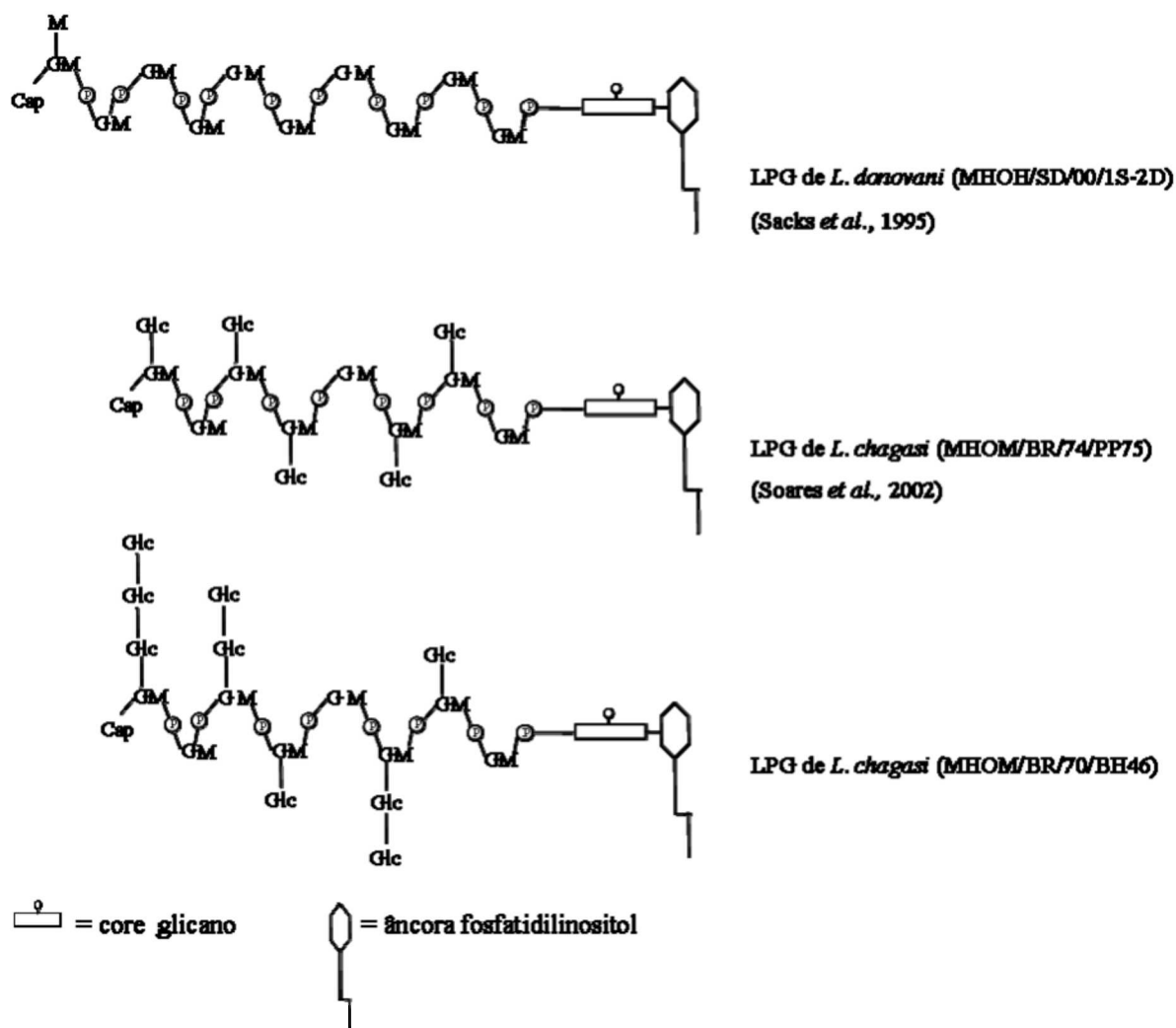


Figura 26: Digrama esquemático do LPG da cepa BH46 de *L. (L.) chagasi* comparado com o LPG já descrito de *L. (L.) donovani* (1S-2D) e da cepa PP75 de *L. (L.) chagasi*. G=galactose; Glc=glicose; M=manose; P=fosfato.

4.5 Caracterização do LPG de *L. (L.) chagasi* LPG1KO

As unidades repetitivas purificadas e desfosforiladas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO foram marcadas e submetidas à Eletroforese de Carboidratos (FACE). Para *L. (L.) chagasi* WT foram observadas bandas nas posições G3, G4 e G5, que indicam a presença das cadeias laterais. Já para *L. (L.) chagasi* LPG1KO não foram observadas bandas, o que indica a ausência completa de unidades repetitivas (Figura 27). Esses resultados confirmam a deficiência dos parasitos mutantes na produção do LPG.

A região do core do LPG de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO também foi analisada. O core de *L. (L.) chagasi* WT apresentou um arraste, correspondente às unidades repetitivas, e uma banda na posição G7, consistente com a região conservada do core glicano de todos os LPGs. Como esperado, o core de *L. (L.) chagasi* LPG1KO apresentou apenas uma banda na posição G3, evidenciando a produção de um core truncado pelos mutantes em LPG1 (Figura 28).

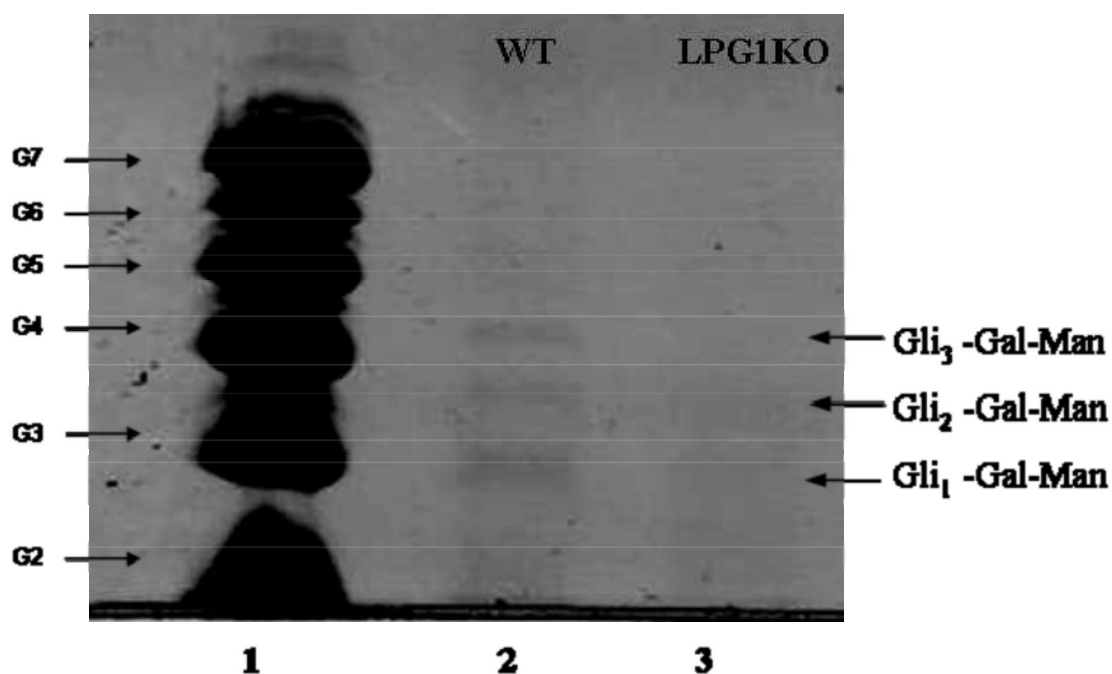


Figura 27: Perfil das unidades repetitivas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO obtido por Eletroforese de Carboidratos (FACE). **Coluna 1**, padrão de peso molecular que vai de 1 glicose até 7 glicoses (G1-G7); **coluna 2**, unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de *L. (L.) chagasi* WT revelando a presença das 3 cadeias laterais de glicose; **coluna 3**, unidades repetitivas desfosforiladas do LPG de *L. (L.) chagasi* LPG1KO revelando a ausência de bandas.

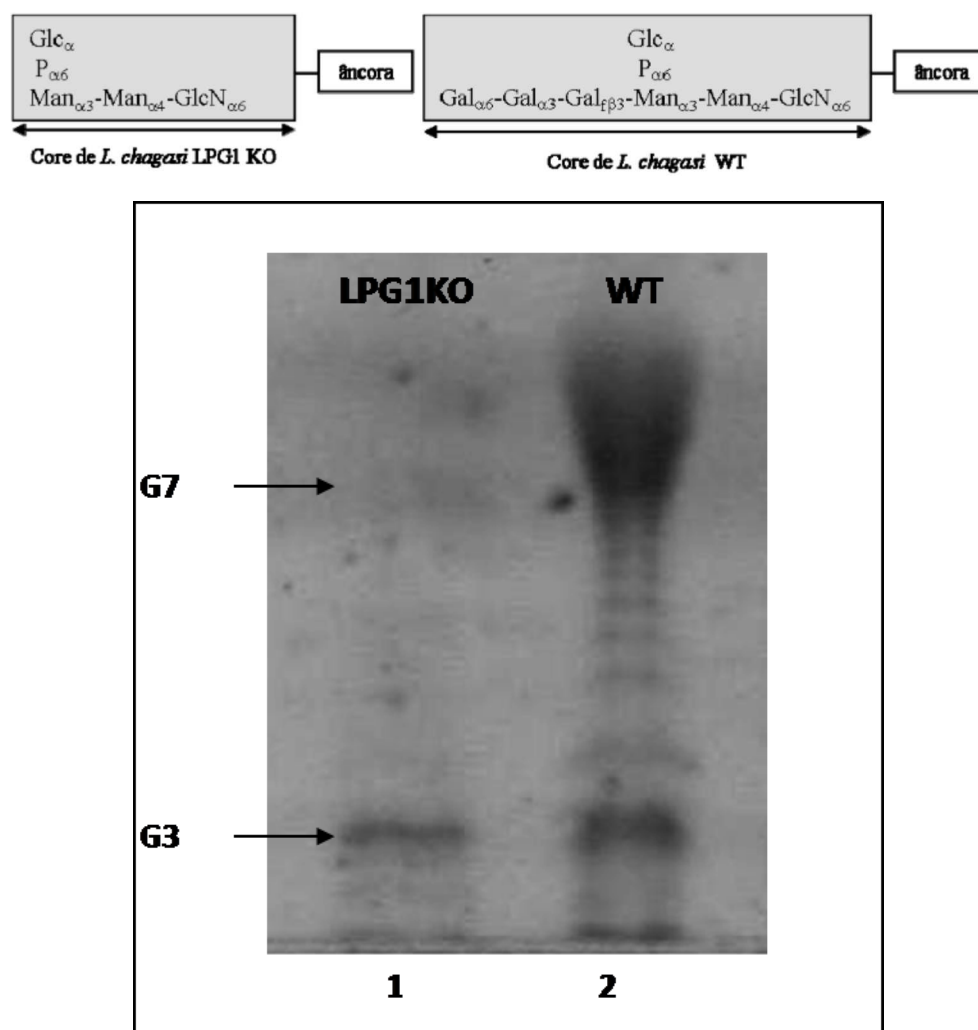


Figura 28: Perfil da região do core do LPG de *L. (L.) chagasi* LPG1KO e WT obtido por Eletroforese de Carboidratos (FACE). **Coluna 1**, core de *L. (L.) chagasi* LPG1KO, revelando a presença de uma banda na posição G3, evidenciando um core truncado; **coluna 2**, core de *L. (L.) chagasi* WT, revelando um arraste e uma banda na posição G7, consistente com a região conservada do core glicano de todos os LPGs.

4.6 Infecção experimental de *L. (L.) longipalpis* com de *L. (L.) chagasi*

4.6.1 Análise da infecção experimental iniciada com promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

A infecção experimental utilizando sangue infectado com promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT resultou em 47,9% (834/1741) e de 58,5% (1517/2591) de flebotomíneos alimentados respectivamente. Esse número de insetos alimentados permitiu a análise do desenvolvimento da infecção até o 10^o dia nos insetos infectados com promastigotas e até o 11^o dia naqueles infectados com amastigotas axênicas.

No total foram dissecados 197 flebotomíneos para os experimentos iniciados com promastigotas e 240 para os experimentos com amastigotas axênicas.

Os quatro experimentos de infecção iniciados com promastigotas foram analisados pelo teste estatístico Kruskal Wallis ($p>0,05$) e não apresentaram diferença significativa entre si, permitindo assim que fossem agrupados para análise final. A mesma análise foi realizada para infecções iniciadas com amastigotas axênicas e o mesmo resultado foi obtido, permitindo também que esses experimentos fossem agrupados para análise final.

4.6.1.1 Índice de infecção dos flebotomíneos

O índice de infecção de *L. (L.) longipalpis* por *L. (L.) chagasi* WT nos dias analisados variou de 79 a 94% nas infecções iniciadas com promastigotas e de 83 a 100% nas infecções iniciadas com amastigotas axênicas, sendo esses índices considerados altos (Tabela 4). A queda observada no quarto dia (79% e 83% respectivamente) pode ser resultante da excreção do bolo alimentar ao final da digestão. Em seguida, a infecção se restabeleceu ficando acima de 83% até o final dos experimentos.

Os dados referentes aos índices de infecção dos flebotomíneos apresentaram distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov, $p>0,05$) e foram comparados pelo teste Tukey. Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de infecção de *L. (L.) longipalpis* após alimentação artificial com formas promastigotas ou amastigotas axênicas ($p>0,05$).

Tabela 4: Comparação entre os índices de infecção de *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi* WT após alimentação artificial com formas promastigotas e amastigotas axênicas.

Dias após infecção	Flebotomíneos examinados		Flebotomíneos positivos		Flebotomíneos negativos		% de Flebotomíneos positivos	
	pro	ama	pro	ama	pro	ama	pro	ama
2	24	24	22	24	2	0	92%	100%
3	24	24	21	24	3	0	88%	100%
4	24	24	19	20	5	4	79%	83%
5	24	24	22	22	2	2	92%	92%
6	24	24	20	21	4	3	83%	88%
7	23	24	21	24	2	0	91%	100%
8	18	24	15	21	3	3	83%	88%
9	18	24	17	21	1	3	94%	88%
10	18	24	17	22	1	2	94%	92%
11	-	24	-	23	-	1	-	96%
Total	197	240	174	222	23	18	88,4% $\pm 4,5$ *	92,7% $\pm 6,1$ *

pro=infecção iniciada com promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT

ama=infecção iniciada com amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

* média $\pm$ desvio padrão

4.6.1.2 Densidade dos parasitos

O número de parasitos nos intestinos de *L. (L.) longipalpis* foi alto nos primeiros dias de infecção (5×10^4) para ambas as infecções iniciadas com promastigotas e amastigotas axênicas. Foi observado um decréscimo de 4-5 vezes no número de parasitos do segundo dia para o terceiro dia. O número de parasitos voltou a aumentar a partir do quarto dia como resultado da colonização do intestino e um pico foi observado no sexto e sétimo dia, respectivamente. Em seguida, houve uma tendência à manutenção da densidade até o último dia de análise (Tabela 5 e Figura 29A e B).

Os dados referentes às densidades dos parasitos no intestino do flebotomíneo apresentaram distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$). Semelhante aos índices de infecção, o teste de Tukey demonstrou que não houve diferença significativa entre as densidades nos intestinos de *L. (L.) longipalpis* após alimentação artificial com formas promastigotas ou amastigotas axênicas em cada dia analisado ($p > 0,05$), com exceção do sexto dia (Tabela 5).

Um plug de uma substância amorfa tipo gel, semelhante ao PSG (*promastigote secretory gel*) descrito em detalhes por Roger e colaboradores (2002), foi observado no intestino de *L. (L.) longipalpis* nas infecções iniciadas tanto com promastigotas quanto com amastigotas axênicas. O aparecimento desse gel ocorreu após o quarto e quinto dia respectivamente (Figura 42).

Tabela 5: Densidade de parasitos no intestino de *L. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) chagasi* WT após alimentação artificial com formas promastigotas e amastigotas axênicas.

Dias após a infecção	nº de flebotomíneos		Média (nº) de parasitos por flebotomíneo (± erro padrão)	
	pro	ama	pro	ama
2	22	24	23860 (± 4353)	20850 (± 3862)
3	21	24	6071 (± 1508)	3600 (± 1312)
4	19	20	7942 (± 1376)	3000 (± 995,1)
5	22	22	13800 (± 2063)	6600 (± 1531)
6	20	21	24230 (± 2617)	5100 (± 1709)
7	21	24	18070 (± 2923)	12300 (± 1928)
8	15	21	12480 (± 3013)	7800 (± 1280)
9	17	21	12670 (± 2832)	10500 (± 2376)
10	17	22	11950 (± 2051)	15750 (± 1929)
11	-	23	-	10500 (± 2628)

pro=infecção iniciada com promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT

ama=infecção iniciada com amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

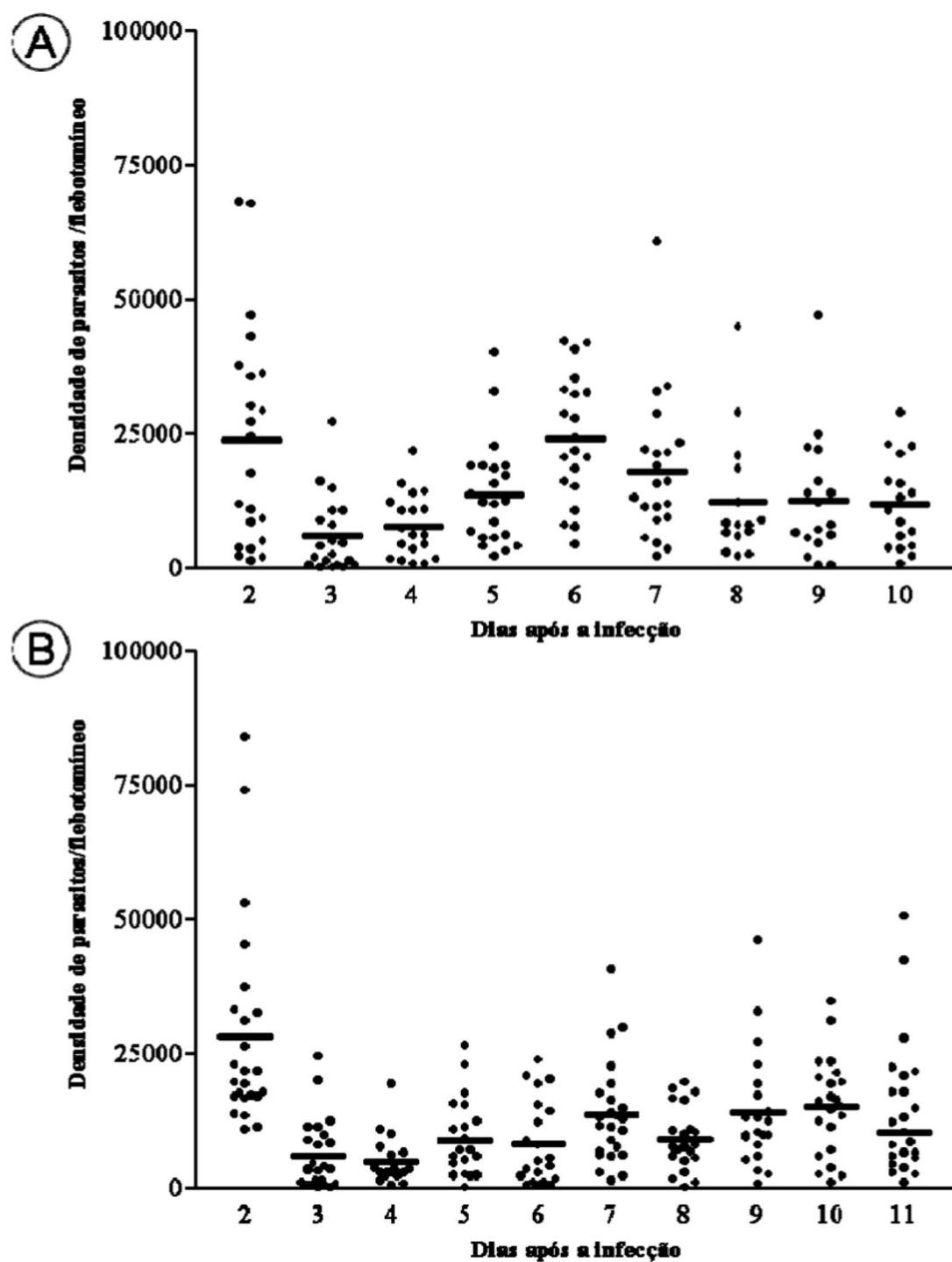


Figura 29: Densidade de parasitos no intestino médio de *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* WT após alimentação artificial com formas promastigotas **(A)** e amastigotas axênicas **(B)**. Análise representativa de quatro experimentos para cada gráfico.

4.6.1.3 Morfotipos de promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT presentes em *L. (L.) longipalpis* durante o curso da infecção

Todas as formas de promastigotas, segundo a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) (Figura 30A), foram encontradas no intestino de *L. (L.) longipalpis* durante a evolução da infecção iniciada tanto com promastigotas quanto com amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT (Figura 30B-F). Entretanto, a presença e a porcentagem das formas variaram conforme essa evolução.

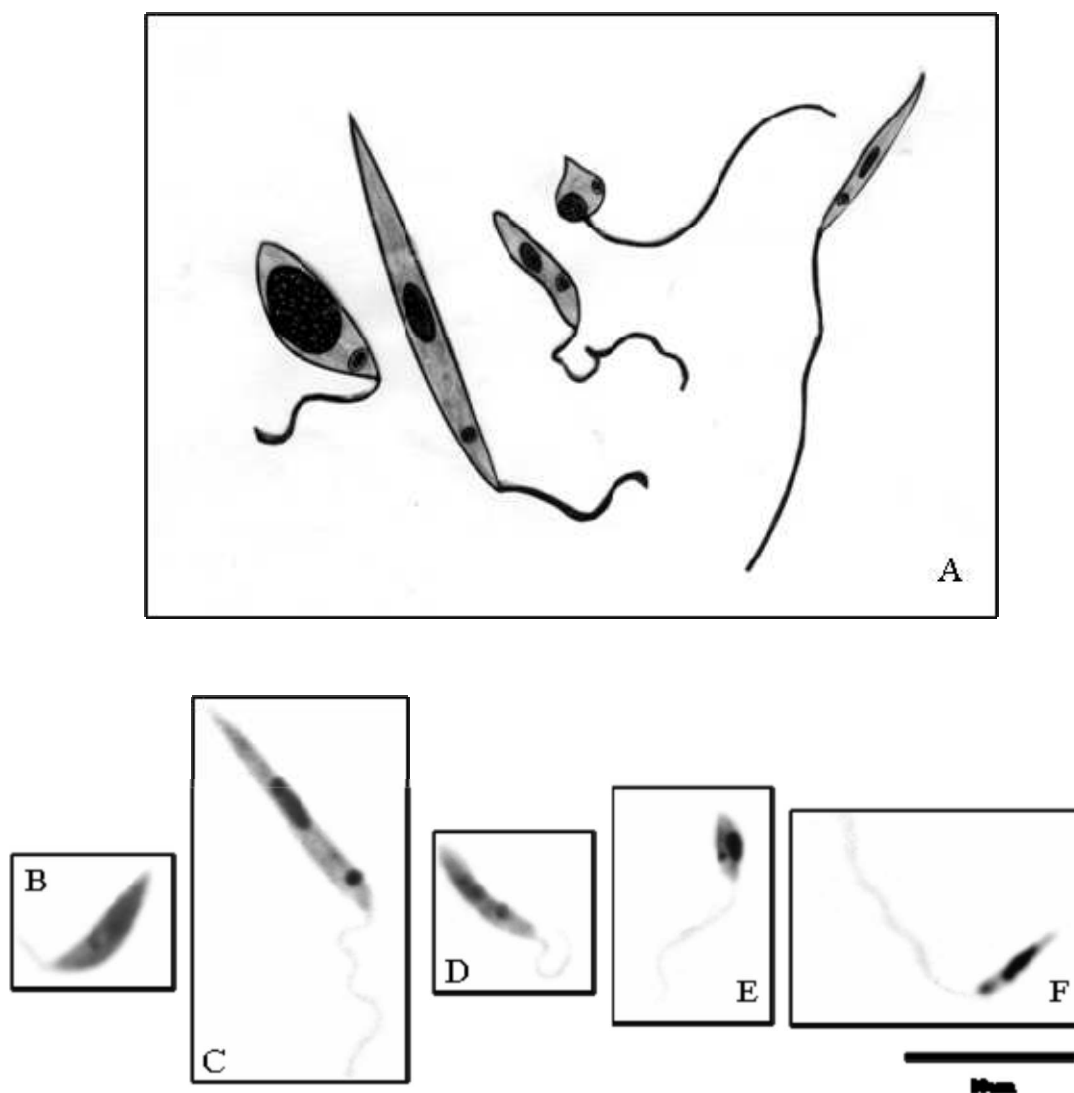


Figura 30: Morfotipos de *L. (L.) chagasi* WT encontrados em intestino infectados de *L. (L.) longipalpis*. **(A)** Desenho esquemático dos morfotipos de acordo com a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) (Desenho de Paulo Pimenta); **(B)** a **(F)** Fotos dos morfotipos encontrados em intestinos infectados de *L. (L.) longipalpis*. As lâminas foram produzidas com 10  de macerado de intestino diluído em PBS e posteriormente coradas pelo método Panótico Rápido. **(B)** promastigota procíclica, **(C)** promastigota nectomona, **(D)** promastigota haptomona, **(E)** promastigota paramastigota e **(F)** promastigota metacíclica.

Em infecções iniciadas com promastigotas, formas procíclicas estiveram presentes desde o segundo dia após o repasto, entretanto, em porcentagem muito baixa (4,7%). Até o quarto dia procíclicas representaram em média 5% da população, mas a partir do sexto dia tiveram sua porcentagem diminuída (3,7%), e esse decréscimo continuou até o último dia de análise (2%). As nectomonas apareceram desde o segundo dia e representaram 92,2% das formas, constituindo um pico de parasitos coincidente com o período pós defecação. Nectomonas sofreram uma pequena queda gradativa até o décimo dia (81,3%), mas não deixaram de ser as formas predominantes durante toda a infecção. Paramastigotas apareceram esporadicamente durante o desenvolvimento da infecção, sempre em baixíssima porcentagem. Elas apresentaram formato ovalar e um cinetoplasto justaposto característico desse morfotipo. As haptomonas também apareceram desde o segundo dia de análise (2,8%), mas não aumentaram consideravelmente em número, mantendo valores menores que 4% até o último dia. As metacíclicas foram raramente detectadas até o quarto dia. Entretanto, a partir do quinto dia (3,3%) essas formas apresentaram um crescimento lento e gradativo e no 10º dia de infecção representavam 13,5% da população (Figura 31A e Tabela 6).

Em infecções iniciadas com amastigotas axênicas, 5,9% dessas formas ainda estavam presentes no intestino do inseto 48 horas (segundo dia) após a o repasto, indicando que nesse momento grande parte dessa população já teria se transformado em formas procíclicas. No terceiro dia as amastigotas tinham desaparecido completamente. Procíclicos (81,7%) representaram a população predominante no segundo dia, enquanto formas nectomonas representaram nesse dia 12,3% da população. O aparecimento desse primeiro pico de formas procíclicas coincidiu com o período de desenvolvimento do parasito que ocorre dentro do bolo sanguíneo no espaço peritrófico e indica que a transformação foi seguida pelo início da replicação. No terceiro dia a porcentagem de procíclicas cai drasticamente para 2,1% e continua em baixa proporção até o último dia de análise. Duas outras formas foram observadas no terceiro dia de análise: formas haptomonas em baixa prevalência (1,7%) e as formas predominantes desse dia, as nectomonas (96,2%), que compõem um segundo pico de promastigotas. Nesse momento a liberação do bolo fecal já ocorreu. Nectomonas foram as formas predominantes (>90%) durante todo o curso da infecção. Assim como nas infecções iniciadas com promastigotas, as formas paramastigotas constituíram a menor população encontrada. Haptomonas aumentaram em proporção no quarto dia (6,4%), mas permaneceram em porcentagens abaixo de 7% até o 11º dia. Diferente do que foi observado na infecção iniciada com promastigotas, as formas metacíclicas só foram encontradas a partir do quinto dia (0,2%) e atingiram densidade máxima de 2,7% no 10º dia (Figura 31B e Tabela 6).

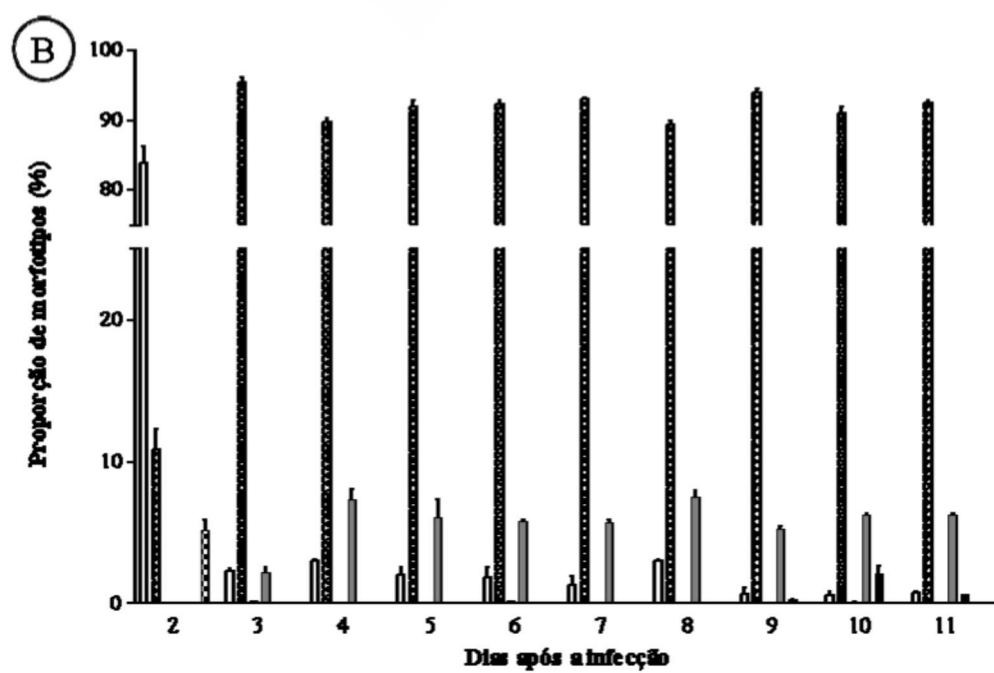
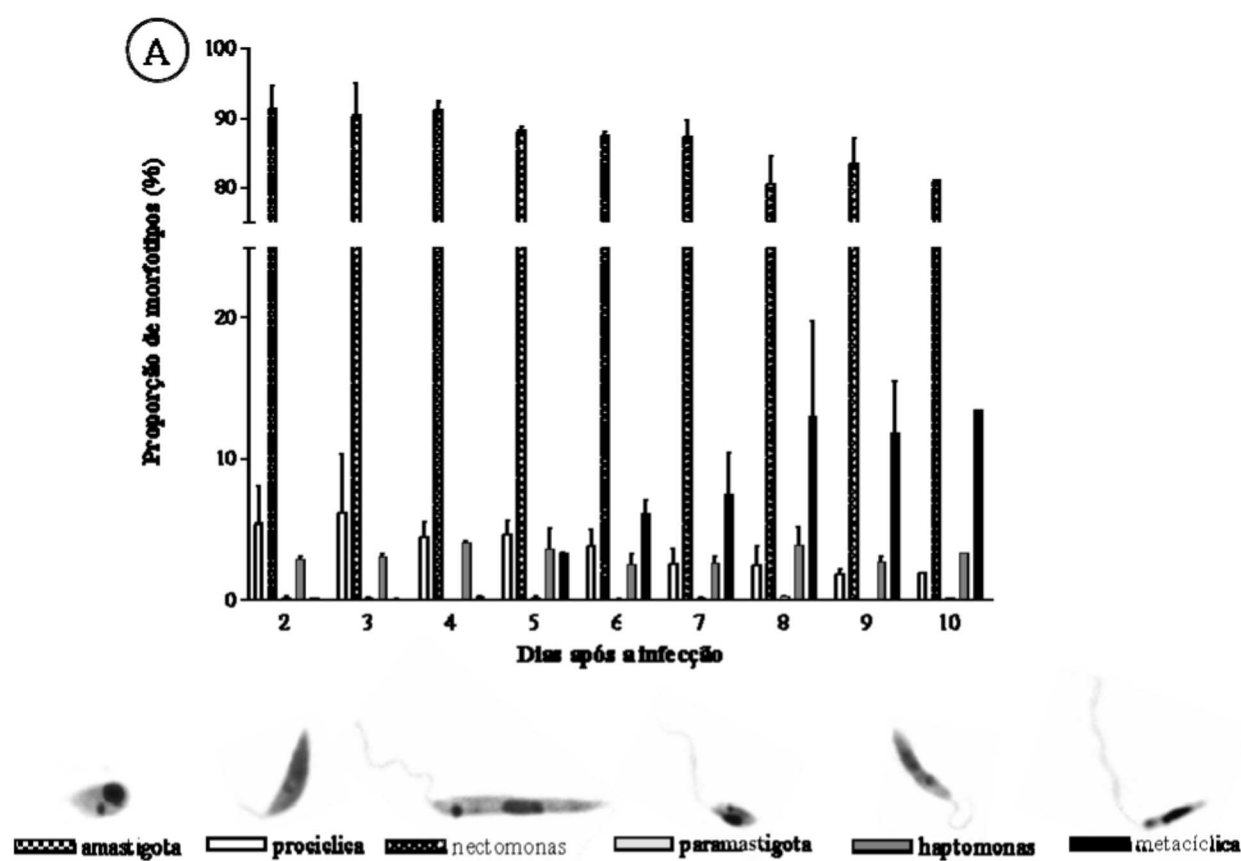


Figura 31: Padrão de desenvolvimento de infecções iniciadas com promastigotas **(A)** e amastigotas axênicas **(B)** de *L. (L.) chagasi* WT. Amostras foram preparadas para análise morfológica e um mínimo de 300 parasitos foi analisado por flebotomíneo. A relativa proporção de amastigotas, promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigota, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas são demonstradas (consultar a Figura 30 para as definições). A média aritmética encontrada no intestino de 12 insetos provenientes de dois experimentos diferentes é representada em cada gráfico. O conjunto de dados de cada gráfico representa a análise de aproximadamente 30000 parasitos individuais.

Tabela 6: Porcentagem dos morfotipos de *L. (L.) chagasi* WT em *L. (L.) longipalpis* durante o curso de infecções iniciadas com promastigotas e amastigotas axênicas. O preparo das amostras e a análise dos dados foram realizados como descrito na figura 31.

Dias após a infecção	Morfotipos											
	Amastigotas		Procíclicos		Nectomonas		Paramastigotas		Haptomonas		Metacíclicas	
	(%)		(%)		(%)		(%)		(%)		(%)	
	pro	ama	pro	ama	pro	ama	pro	ama	pro	ama	pro	ama
2	-	5,9%	4,7%	81,7%	92,2%	12,3%	0,1%	0,0%	2,8%	0,0%	0,2%	0,0%
3	-	0,0%	5,3%	2,1%	91,5%	96,2%	0,1%	0,1%	3,0%	1,7%	0,1%	0,0%
4	-	0,0%	4,6%	3,1%	91,2%	90,4%	0,0%	0,0%	4,0%	6,4%	0,2%	0,0%
5	-	0,0%	4,7%	2,5%	88,3%	92,7%	0,1%	0,1%	3,6%	4,7%	3,3%	0,0%
6	-	0,0%	3,7%	2,6%	87,4%	91,8%	0,1%	0,1%	2,6%	5,5%	6,2%	0,0%
7	-	0,0%	2,5%	1,9%	87,5%	92,8%	0,0%	0,0%	2,5%	5,3%	7,4%	0,0%
8		0,0%	2,5%	3,0%	80,8%	90,1%	0,1%	0,0%	3,9%	6,9%	12,7%	0,0%
9	-	0,0%	1,9%	1,2%	83,5%	93,2%	0,0%	0,0%	2,7%	5,4%	11,9%	0,2%
10	-	0,0%	2,0%	0,9%	81,3%	90,4%	0,0%	0,2%	3,3%	5,9%	13,5%	2,7%
11	-	0,0%	-	0,7%	-	92,7%	-	0,0%	-	5,9%	-	0,6%

pro=infecção iniciada com promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT

ama=infecção iniciada com amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* WT

4.6.2 Análise da Infecção Artificial com *L. (L.) chagasi* LPG1KO

A infecção experimental utilizando sangue infectado com promastigotas *L. (L.) chagasi* WT e *L. (L.) chagasi* LPG1KO resultou em 65,2% (1220/1872) e de 60,8% (1193/1963) de flebotomíneos alimentados respectivamente. Nas alimentações em que foi utilizado o inibidor de tripsina, a porcentagem de flebotomíneos alimentados foi 54,4% (292/537) e 55,5% (284/512), respectivamente.

No total foram dissecados 263 flebotomíneos para cada grupo de experimentos com promastigotas selvagens ou mutantes e 70 flebotomíneos para cada grupo de experimentos com promastigotas selvagens ou mutantes em presença de inibidor de tripsina.

4.6.2.1 Desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* LPG1KO em *L. (L.) longipalpis*

Os dados referentes às densidades dos parasitos selvagens e mutantes no intestino do flebotomíneo não apresentaram distribuição normal (teste Anderson-Darling, $p < 0,05$). No segundo dia de infecção, a densidade de parasitos por intestino nos insetos infectados com LPG1KO foi 4,5 vezes menor do que naqueles infectados com WT (análise de variância não paramétrica seguida do teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Não foram encontrados flebotomíneos infectados nos grupos alimentados com LPG1KO a partir do quinto dia. Mais de 95% dos insetos alimentados com WT foram encontrados infectados até o sétimo dia e apresentaram uma média de $1,9 \times 10^4$ parasitos viáveis por intestino (Figura 32).

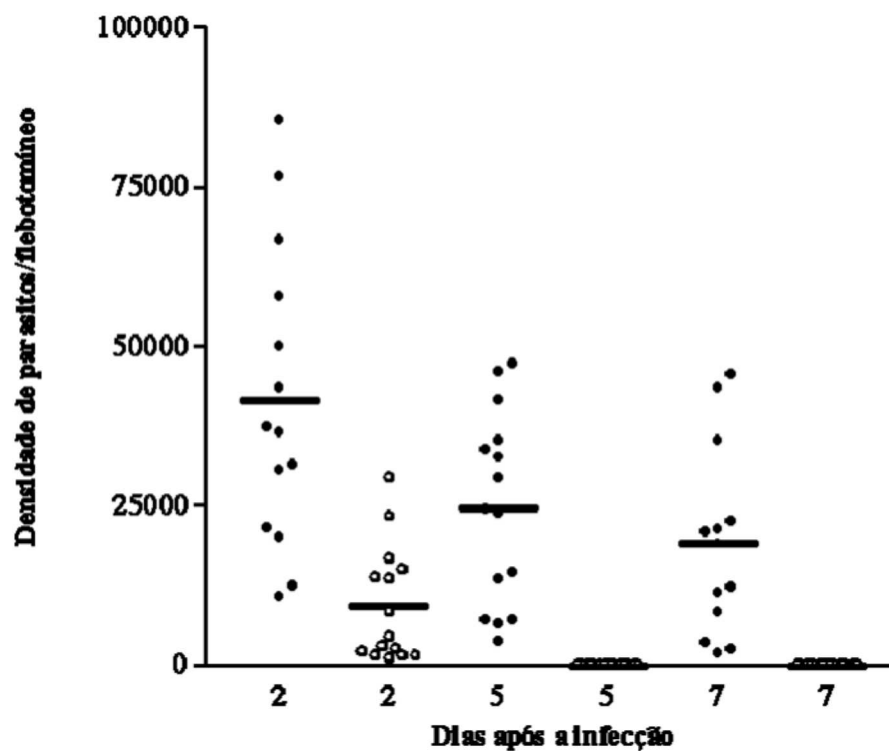


Figura 32: Densidade de parasitos no intestino médio de *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após infecção experimental. Análise representativa de dois experimentos independentes.

Para se saber o momento em que a infecção dos flebotomíneos por parasitos mutantes é perdida, antes ou após a liberação do bolo fecal, a interação *L. (L.) longipalpis* / *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi analisada em intervalos de 12 horas.

Nas primeiras 12 horas de infecção, 100% dos flebotomíneos infectados tanto com *L. (L.) chagasi* WT quanto LPG1KO apresentaram-se positivos. Nos dois casos foi observada uma média de $1,2 \times 10^4$ parasitos viáveis por intestino (Tabela 7 e Figura 33). No entanto, o efeito da ausência do LPG foi claro após 48 horas, tempo no qual a infecção foi totalmente ausente em cerca de 27% dos insetos alimentados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO e, naqueles flebotomíneos que ainda encontravam-se infectados, poucos parasitos viáveis foram observados. Após 60 horas nenhum flebotomíneo alimentado com *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi encontrado infectado. Dessa forma, a cepa mutante foi perdida antes da liberação do bolo fecal, que, em *L. (L.) longipalpis* acontece, em geral, após 72 horas do repasto sanguíneo infectante ou não. Em contraste, mais de 90% dos flebotomíneos alimentados com *L. (L.) chagasi* WT continuaram infectados durante todo o período analisado (Tabela 7 e Figura 33). Promastigotas mutantes falharam em sobreviver no ambiente hidrolítico encontrado nos períodos iniciais de digestão dentro do flebotomíneo.

Tabela 7: Densidade de parasitos no intestino de *L. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes.

Tempo após a infecção (horas)	Porcentagem de flebotomíneos positivos (%)		Média (nº) de parasitos por flebotomíneo (± erro padrão)	
	WT	LPG1KO	WT	LPG1KO
0	100%	100%	10320 (± 992,3)	9560 (±1452)
12	100%	100%	12600 (±1847)	12333 (±1812)
24	100%	93,3%	39820 (±6002)	17271 (±3362)
36	100%	86,7%	50700 (±7741)	13638 (±4874)
48	93,3%	73,3%	55692 (±8917)	9545 (±3217)
60	100%	6,7%	22000 (±4692)	1800
72	100%	0%	16340 (±3411)	0
84	93,3%	0%	23400 (±4032)	0
96	93,3%	0%	25221 (±3368)	0
108	93,3%	0%	20400 (±4233)	0

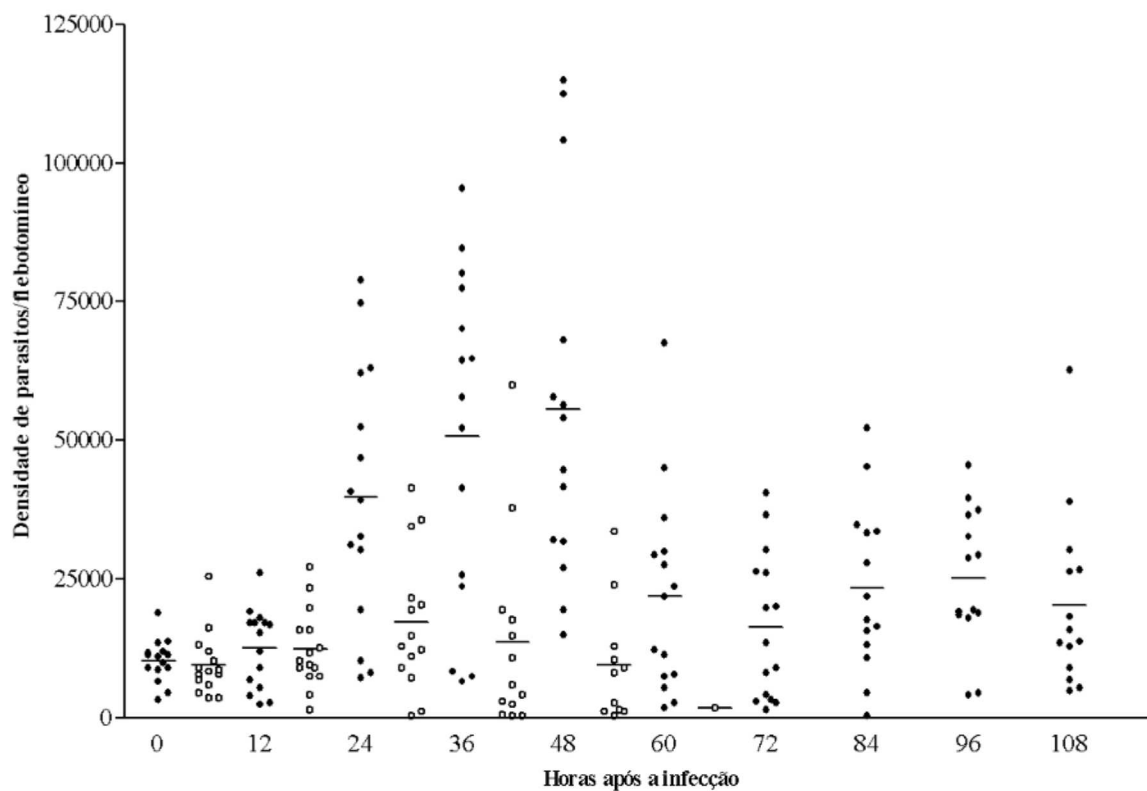


Figura 33: Densidade de parasitos no intestino médio de *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes.

Os dados referentes às densidades dos parasitos selvagens e mutantes no intestino do flebotomíneo, na ausência e presença de inibidor de tripsina, não apresentaram distribuição normal (teste Anderson-Darling, $p < 0,05$). Também foi realizada uma análise de variância não paramétrica seguida de um teste de Kruskal-Wallis.

Inibidor de tripsina foi adicionado ao sangue da alimentação dos flebotomíneos para avaliação do papel das proteases do intestino na mortalidade de *L. (L.) chagasi* LPG1KO. A adição de inibidor de tripsina ao sangue aumentou o número médio de parasitos viáveis nas infecções com *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO ($p < 0,05$) (Figura 34). No primeiro dia após o repasto sanguíneo infectante a densidade de parasitos do grupo alimentado com *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi equivalente a cerca de 27% da população do grupo alimentado com *L. (L.) chagasi* WT ($p < 0,05$). No grupo alimentado com *L. (L.) chagasi* LPG1KO tratado com inibidor de tripsina a densidade foi aumentada para mais de 87% em relação a população do grupo alimentado com *L. (L.) chagasi* WT ($p < 0,05$) (Figura 34A). No segundo dia houve um aumento na densidade de parasitos nos grupos alimentados com *L. (L.) chagasi* WT, provavelmente devido à multiplicação dos parasitos, mas, embora o inibidor de tripsina tenha protegido ($p < 0,05$), pelo menos parcialmente, os parasitos mutantes, essa proteção não foi suficiente para que houvesse um aumento no número de parasitos desse grupo comparável àquele observado nos grupos alimentado com *L. (L.) chagasi* WT ($p < 0,05$) (Figura 34B).

Após o segundo dia do repasto sanguíneo infectante nenhum flebotomíneo infectado foi encontrado nos grupos alimentados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO (Figura 34C), suportando a idéia de que o intestino com sangue é um ambiente potencialmente hostil para o desenvolvimento dos parasitos e que a camada de LPG pode protegê-los durante esse estágio inicial da infecção. Apesar do inibidor de tripsina ter promovido a sobrevivência significativa de parasitos nos grupos infectados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO até o segundo dia ($p < 0,05$) (Figura 34B), os parasitos não foram capazes de permanecer no intestino de *L. (L.) longipalpis* e foram perdidos com a excreção dos restos de sangue digerido (Figura 34C). Nos flebotomíneos alimentados com *L. (L.) chagasi* WT os parasitos continuaram seu desenvolvimento até o último dia analisado (Figura 34C-E).

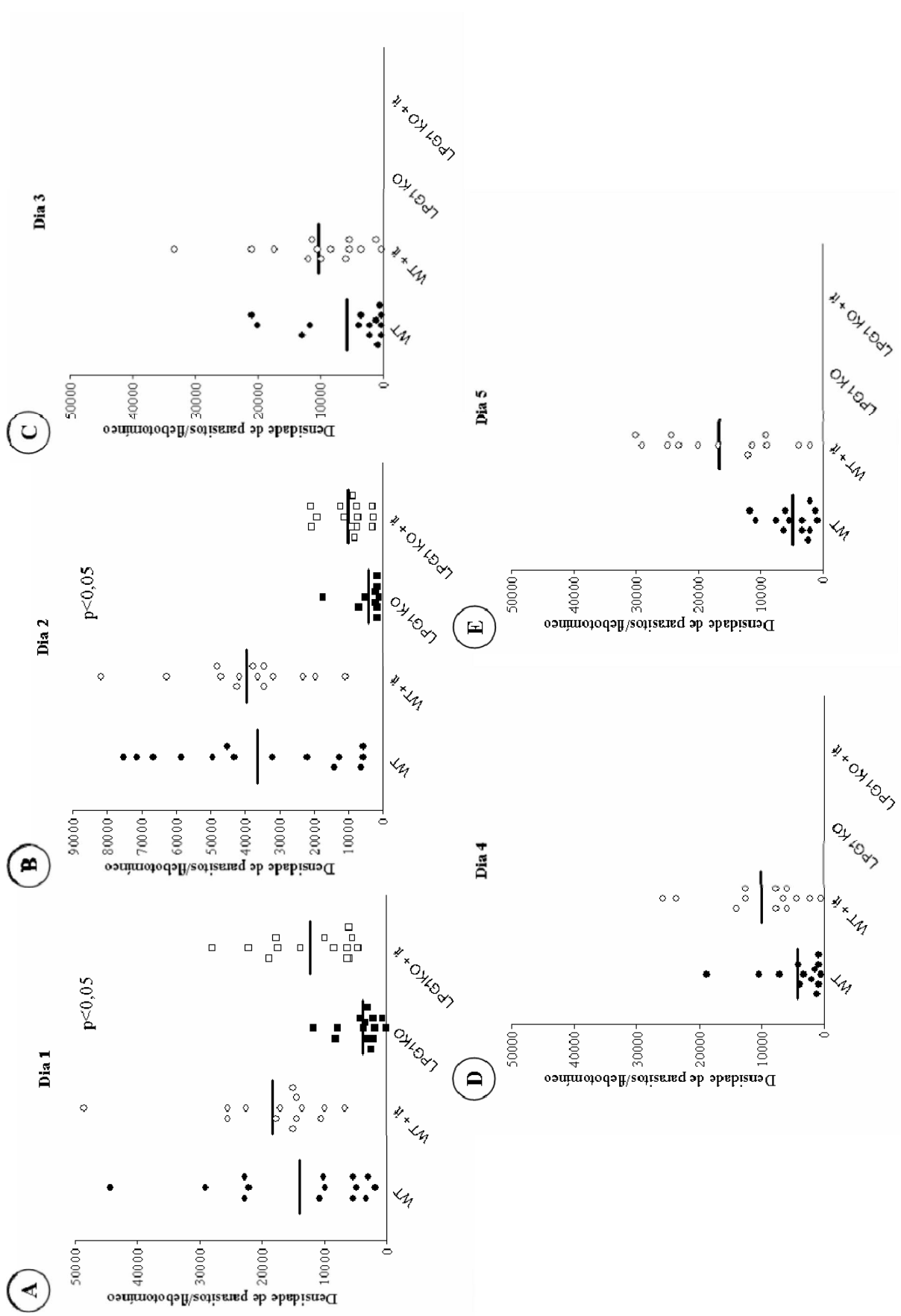


Figura 34: Densidade de parasitos no intestino de *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* WT (círculos fechados) e LPG1KO (quadrado fechado) após infecção experimental com inibidor de tripsina (it). WT (círculos fechados); WT na presença de inibidor de tripsina (círculos abertos); LPG1KO (quadrado fechado); LPG1KO na presença de inibidor de tripsina (quadrado aberto). Análise representativa de dois experimentos independentes.

4.6.2.2 Desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* LPG1KO em *P. (P.) duboscqi*

Os dados referentes às densidades dos parasitos selvagens e mutantes no intestino de *P. (P.) duboscqi* não apresentaram distribuição normal (teste Anderson-Darling, $p < 0,05$). Também foi realizada uma análise de variância não paramétrica seguida de um teste de Kruskal-Wallis.

Phlebotomus duboscqi, espécie de flebotomíneo capaz de se infectar somente com *L. (L.) major*, foi infectada experimentalmente com *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO. No segundo dia após o repasto sanguíneo infectante, a densidade de parasitos nos flebotomíneos infectados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi mais de 11 vezes menor do que nos flebotomíneos infectados com *L. (L.) chagasi* WT ($p < 0,05$), indicando grande mortalidade dos parasitos mutantes. No terceiro dia poucos flebotomíneos continuaram infectados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO e apresentaram densidade de parasitos bem menores que *L. (L.) chagasi* WT ($p < 0,05$). Após o terceiro dia, infecções foram totalmente ausentes nos flebotomíneos infectados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO, entretanto, naqueles infectados com *L. (L.) chagasi* WT a infecção só foi perdida no momento da excreção do bolo fecal, que em *P. (P.) duboscqi* ocorre entre o quarto e quinto dia após o repasto (Figura 35). Novamente, promastigotas de *L. (L.) chagasi* deficientes em LPG1 falharam em sobreviver no ambiente hidrolítico do intestino nos períodos iniciais de digestão sanguínea.

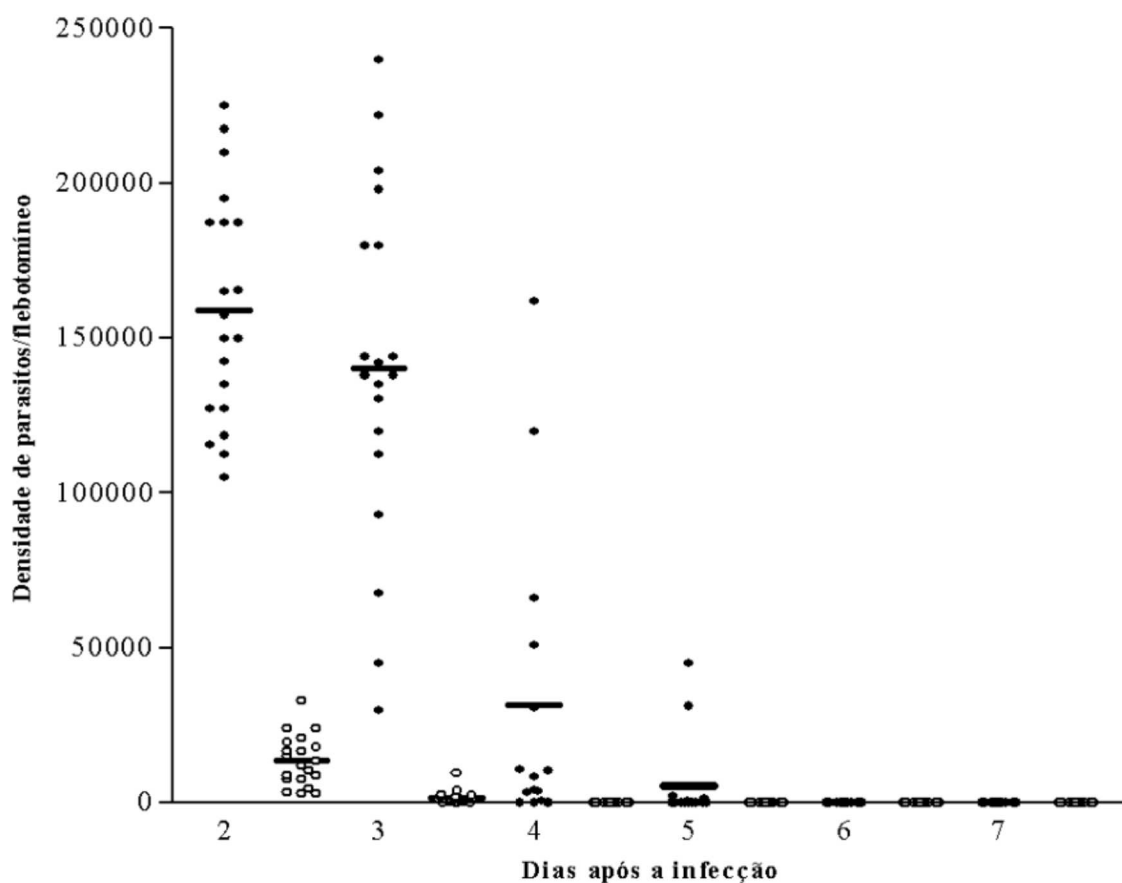


Figura 35: Densidade de parasitos no intestino de *P. (P.) duboscqi* infectados com *L. (L.) chagasi* WT (círculos fechados) e LPG1KO (círculos abertos) após alimentação artificial. Análise representativa de dois experimentos independentes.

4.6.3 Análise da susceptibilidade de promastigotas de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO a lisado de intestinos contendo sangue

A susceptibilidade dos promastigotas de *L. (L.) chagasi* LPG1KO a ação do conteúdo do intestino de *L. (L.) longipalpis* contendo sangue foi investigada pela exposição *in vitro* dos parasitos a lisado de um único intestino retirado 24 horas após repasto por meio de alimentação artificial utilizando sangue não infectado de camundongo (Figura 36A e B). Os dados apresentaram distribuição normal (Anderson Darling, $p=0,07$) e foram analisados pelo teste de Tukey.

As culturas de *L. (L.) chagasi* WT ou LPG1KO incubadas sem intestino e nas mesmas condições descritas acima foram utilizadas como controle. Não foram observadas diferenças significativas no número de células viáveis obtido nos controles WT e LPG1KO após a incubação ($p>0,05$) (Figura 36A). No entanto, tanto os intestinos incubados com *L. (L.) chagasi* WT quanto com LPG1KO tiveram reduções significativas no número de células viáveis quando comparados aos seus respectivos controles ($p<0,05$) (Figura 36A). Após 12 horas de interação com o intestino 74% dos parasitos de *L. (L.) chagasi* LPG1KO foram mortos (Figura 36B), enquanto, para o mesmo período, a mortalidade de *L. (L.) chagasi* WT não excedeu 35% quando esses valores foram comparados à média de células que permaneceram viáveis nos controles (Figura 36B). Tais resultados confirmam a susceptibilidade desses parasitos aos componentes da digestão sanguínea no intestino de *L. (L.) longipalpis*. Novamente foi observada maior mortalidade de *L. (L.) chagasi* LPG1KO quando comparada à mortalidade de WT ($p<0,05$), resultados consistentes com aqueles encontrados nos ensaios *in vivo*.

Como observado nas interações *in vivo* (Figura 34), a adição do inibidor de tripsina conferiu proteção aos parasitos selvagens e mutantes na presença de lisado do intestino ($p<0,05$) (Figura 36A). Em presença desse inibidor, a mortalidade de *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi reduzida para cerca de 49% da população de parasitos e a de *L. (L.) chagasi* WT para 12% (Figura 36B).

No caso de *L. (L.) chagasi* WT, não foram observadas diferenças significativas na média de parasitos viáveis após a adição do inibidor de tripsina ao lisado do intestino quando comparada à média do controle WT (sem intestino) ($p>0,05$), mostrando que a presença do inibidor reduz drasticamente a morte dos parasitos causada pelos componentes da digestão. Ao contrário, no caso de *L. (L.) chagasi* LPG1KO, a adição do inibidor de tripsina ao lisado

do intestino não foi suficiente para restaurar a média de sobrevivência dos mutantes para os valores encontrados no controle LPG1KO (sem intestino) ($p < 0,05$) (Figura 36A).

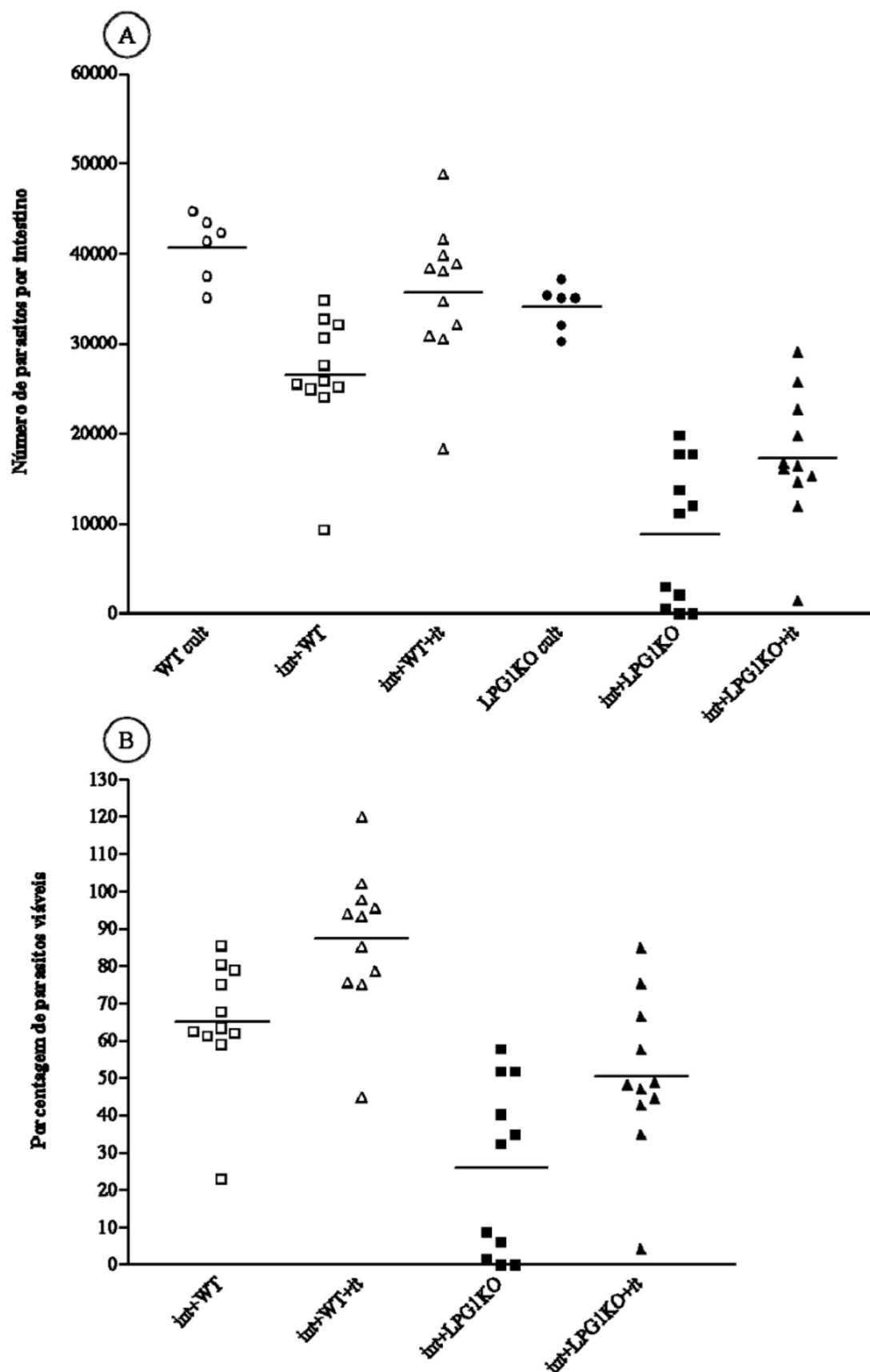


Figura 36: Análise *in vitro* da susceptibilidade a morte de *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO em presença de lisados de intestinos de *L. (L.) longipalpis* contendo sangue. **(A)** densidade de promastigotas após exposição por 12 horas a lisados de intestinos individuais contendo sangue (24 horas após repasto sanguíneo não infectante). **(B)** Porcentagem de promastigotas viáveis. A barra representa a média do número de parasitos viáveis nos intestinos analisados. Cultura de *L. (L.) chagasi* WT (círculos aberto) e LPG1KO (círculo fechado); cultura de *L. (L.) chagasi* WT (quadrado aberto) e LPG1KO (quadrado fechado) na presença de lisado de intestino; cultura de *L. (L.) chagasi* WT (triângulo aberto) e LPG1KO (triângulo fechado) na presença de lisado de intestino e inibidor de tripsina. Análise representativa de dois experimentos independentes.

4.7 Aspectos morfológicos dos intestinos infectados com *L. (L.) chagasi* WT e LPG1KO

4.7.1 Morfologia geral de fêmeas de *L. (L.) longipalpis* não alimentadas

Fêmeas não alimentadas de *L. (L.) longipalpis* foram processadas para análise morfológica por microscopia óptica das características gerais do inseto. Assim como outros insetos, os flebotomíneos apresentam revestimento externo formado por epiderme e cutícula (Figura 37). O corpo gorduroso preenche os espaços entre os órgãos e é encontrado por todo o inseto (Figura 37). A musculatura estende-se pela parede do corpo do inseto e também envolve o intestino (Figura 37). A anatomia do intestino de *L. (L.) longipalpis* pode ser visualizada na Figura 38. O intestino é formado por três regiões principais: intestino anterior, médio e posterior (Figuras 37 e 38). A região da válvula do estomodeu (Figuras 37 e 38) liga o intestino anterior ao médio, evita que o alimento seja regurgitado e controla o destino dos alimentos. Durante a alimentação o sangue é direcionado ao intestino médio enquanto o açúcar é estocado no divertículo. O intestino médio é composto por duas partes: uma estreita região torácica e uma larga região abdominal. A região do piloro separa o intestino médio e o posterior, local onde estão inseridos os túbulos de Malpighi, que ficam livres na hemocele (Figura 38).

4.7.2 O intestino de fêmeas infectadas com *L. (L.) chagasi* WT

A morfologia de intestinos infectados de fêmeas de *L. (L.) longipalpis* em diferentes tempos após o repasto foi analisada em detalhes por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

Características gerais do epitélio intestinal

O epitélio intestinal de *L. (L.) longipalpis* é formado por uma camada simples de células colunares típicas (Figura 39A-E, 45A, 47A), geralmente com núcleo evidente (Figura 39D-E, 47A-B). Esse epitélio é rodeado por uma rede de fibras musculares circulares longitudinais e transversais (Figuras 44C, 45C; 47A e C, 50A). Uma complexa rede de invaginações denominada labirinto basal é encontrada na região basal das células, onde também são encontradas mitocôndrias (Figura 47C). Uma fina lâmina basal separa o epitélio intestinal da hemocele (Figura 47A e C; 50A). Lateralmente, as células do epitélio intestinal são ligadas apicalmente por complexos juncionais elétron-densos do tipo tight (junções oclusivas) (Figura

47B, 48E). O citoplasma da região apical das células é mais elétron-denso do que o restante da célula (Figura 47A). Uma densa camada de microvilosidades cobre a região apical voltada para o lúmen (Figuras 39D-E; 43A-D; 44D-E; 45A; 47A-B; 48A-C, E e F; 49A-B; 50A-C).

48 horas após o repasto

Após 48 horas do repasto, fêmeas alimentadas com sangue não infectado (Figura 39A-B) e fêmeas alimentadas com sangue infectado (Figura 39C-E) ainda não haviam liberado totalmente o bolo fecal e o intestino ainda continha sangue. A matriz peritrófica já havia praticamente desaparecido e a liberação do bolo fecal, ocorreu, na maior parte das fêmeas, 72 horas após o repasto. Os aspectos morfológicos dos intestinos infectados foram similares aos observados em flebotomíneos não infectados sob ML (Figura 39). A região da válvula do estomodeu forma um anel de células epiteliais cilíndricas que são cobertas por uma cutícula relativamente espessa (Figura 39). Nos intestinos infectados foram encontrados parasitos distribuídos por todo o órgão (* na Figura 39C-E), inclusive na válvula do estomodeu (* na Figura 39D-E), demonstrando que em 48 horas os parasitos já tinham iniciado a sua migração para a porção anterior do trato digestivo.

O uso da MEV para análise de intestinos infectados 48 horas após o repasto não gerou informações adicionais, pois a técnica não permitiu a adequada identificação desses parasitos entre as hemáceas (dados não demonstrados).

3 dias após o repasto

Após a liberação do bolo fecal, intestinos de fêmeas com 3 dias de infecção foram observados por MEV. Grande quantidade de formas alongadas, semelhantes à nectomonas, foi encontrada no intestino médio após a defecação das fêmeas (Figura 43A-D). A grande maioria dos parasitos permaneceu livre no lúmen intestinal (Figura 43A e B) e ocupava grande porção desse espaço, enquanto somente alguns parasitos pareciam ter seu corpo e flagelo aderido nas microvilosidades do epitélio intestinal (setas na Figura 43C e D). Alguns sinais deixados pela possível inserção do flagelo dos parasitos no epitélio intestinal puderam ser observados entre as microvilosidades (* nas Figuras 43C e D), similares aos sinais observados quando o flagelo dos parasitos ainda está inserido (cabeça de seta na Figura 43C e D). Não foram observados parasitos na região do intestino médio torácico e do intestino anterior.

Infecções tardias

Intestinos de fêmeas com infecção tardia (mais de 5 dias após o repasto infectante) também foram observados por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

Em intestinos de fêmeas com 5-6 dias de infecção os parasitos já haviam migrado para a região anterior do intestino. Grande quantidade de promastigotas foi encontrada na região da válvula do estomodeu (Figura 40A-C), e muitos ainda estavam presentes na região do intestino médio abdominal (Figura 40A e 44A-D). As promastigotas encontravam-se dispostas sobre as microvilosidades, entretanto, sem aparente inserção do flagelo (Figura 44 D e E).

Sob dissecção, o aparecimento do gel semelhante ao PSG pôde ser observado no período que coincidiu com o processo de colonização do intestino pelos parasitos (Figura 42). A colonização da região da cárdia por um grande número de parasitos embebidos nesse gel pôde ser observada e em muitos casos uma dilatação da região da válvula do estomodeu foi observada em infecções com mais de cinco dias (desenho esquemático da Figura 42A). Nesses casos, cuidadosa dissecção dos flebotomíneos foi necessária para que o intestino fosse retirado intacto. O gel isolado teve seu tamanho expandido quando liberado do confinamento do intestino torácico (Figura 42B e C). Os parasitos embebidos nesse gel frequentemente pareciam imóveis em preparações *in vivo* e permaneciam unidos a esse plug de gel por um longo tempo.

Após 7 dias do repasto infectante, grande quantidade de parasitos ainda estava presente na região da válvula do estomodeu, que muitas vezes apresentou-se dilatada (Figuras 41A-C; 46A-C). Grande quantidade da substância tipo gel, que observada em MEV apresentou-se sob forma de rede, envolvia as promastigotas presente na válvula do estomodeu (seta na Figura 46C). Como foi descrito anteriormente, sob dissecção essa rede formada pelo gel aparentemente unia os parasitos (Figura 46C). Em quantidade bem menor do que a encontrada na válvula, parasitos ainda foram encontrados na região do intestino médio abdominal (Figuras 45A-C; 48A-C) embebidos na mesma substância tipo gel (Figuras 45B e C). Ultraestruturalmente, o gel aparece como uma rede de fibras elétron-densas entre os parasitos (Figuras 49A-E). Na maioria das vezes foram observados parasitos sem aparente inserção do flagelo entre essas microvilosidades (Figuras 44D-E; 48A-E). Entretanto, ocasionalmente foi observada, a presença de parasitos aderidos às microvilosidades do epitélio intestinal via corpo do parasito (Figura 48F).

Os parasitos presentes no interior do intestino médio dos flebotomíneos infectados apresentaram, em linhas gerais, suas características ultraestruturais típicas (Figuras 48B-F;

49B-E). Promastigotas apresentaram-se como células alongadas rodeadas por membrana plasmática (Figuras 48E e F). O flagelo, que tem posição anterior (Figura 48E e F; 49B e C), emerge concentricamente de uma bolsa flagelar (Figuras 48E e 49B). As características estruturais do axonema que compõe o flagelo (Figuras 48C; 49B-E) podem ser observadas em detalhe na Figura 48D: nove pares de microtúbulos periféricos que formam uma coroa que circunda um par de microtúbulos central. Abaixo da membrana plasmática e ao longo do eixo longitudinal do parasito encontram-se um conjunto de microtúbulos subpeliculares disposto em fileiras (Figuras 48B; 49B e C), responsáveis pela sustentação do corpo celular. O núcleo é pouco condensado, com aspecto alongado (Figuras 48E; F) ou esférico (Figuras 48B; 49B). O cinetoplasto foi observado próximo a região da bolsa flagelar, anterior ao núcleo (Figura 48F).

Observações de cortes ultrafinos em MET mostraram que em infecções tardias o epitélio intestinal constitui-se de uma camada simples de células colunares com núcleo oval (Figuras 47A e 48A). Mitocôndrias foram encontradas por toda a célula, com maior concentração na região apical (Figuras 47A-B). O retículo endoplasmático rugoso frequentemente apresentou forma concêntrica (Figuras 47A, B e D), característica de intestinos de fêmeas não alimentadas ou que já liberaram o bolo fecal, e raramente apresentou forma de cisternas (Figuras 47D). Ribossomos livres ocorreram em grande quantidade (Figura 47D) e zonas de Golgi raramente foram encontradas (Figura 47D). Estruturas semelhantes a lisossomos (Figura 47B) e corpos multivesiculares (Figura 49A) foram encontrados distribuídos pelas células.

Alterações morfológicas decorrentes da presença de parasitos na válvula do estomodeu e intestino médio não foram observadas nos intestinos analisados.

4.7.3 O intestino de fêmeas infectadas com *L. (L.) chagasi* LPG1KO

A morfologia de intestinos de fêmeas de *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi analisada por MET. Como descrito anteriormente, a infecção com mutantes é completamente perdida antes de 60 horas de infecção e, por essa razão, a ultraestrutura do intestino de fêmeas infectadas com esses mutantes foi realizada 30 horas após o repasto sanguíneo. Nesse período, que antecede a liberação do bolo fecal, os parasitos encontraram-se envolvidos por sangue parcialmente digerido, fato que dificultou a identificação dos mesmos. Além disso, como ocorre uma grande mortalidade nas primeiras horas de desenvolvimento, poucos parasitos podem ser encontrados no intestino das fêmeas.

Dessa forma, o uso das técnicas de ML e de MEV não gerou informações relevantes sobre essa interação (dados não demonstrados).

Após 30 horas do repasto, o epitélio intestinal consiste de uma camada de células ainda levemente achatadas por causa da distensão causada pela ingestão do sangue. Esse epitélio é circulado por lâmina basal (Figura 50A) e rodeado por fibras musculares circulares longitudinais e transversais (Figura 50A). Grande quantidade de vacúolos não elétron-densos foi observada por toda a célula (Figura 50A) e o epitélio ainda apresentava grande atividade secretora (Figura 50D). A matriz peritrófica, com espessura irregular (cerca de 1-2 μm), separava o bolo alimentar do intestino médio (Figura 50B e C). Foi observado o início de desintegração da matriz peritrófica alguns pontos (dados não demonstrados). Intensa deposição de pigmentos tipo heme foi observada na porção da matriz voltada para as microvilosidades (setas na Figura 50B-C). Células sanguíneas parcialmente lisadas foram frequentemente observadas na periferia do bolo alimentar (Figura 50B) e produtos da digestão sanguínea foram observados no interior do bolo (Figura 50E). Não foram encontrados parasitos no material analisado.

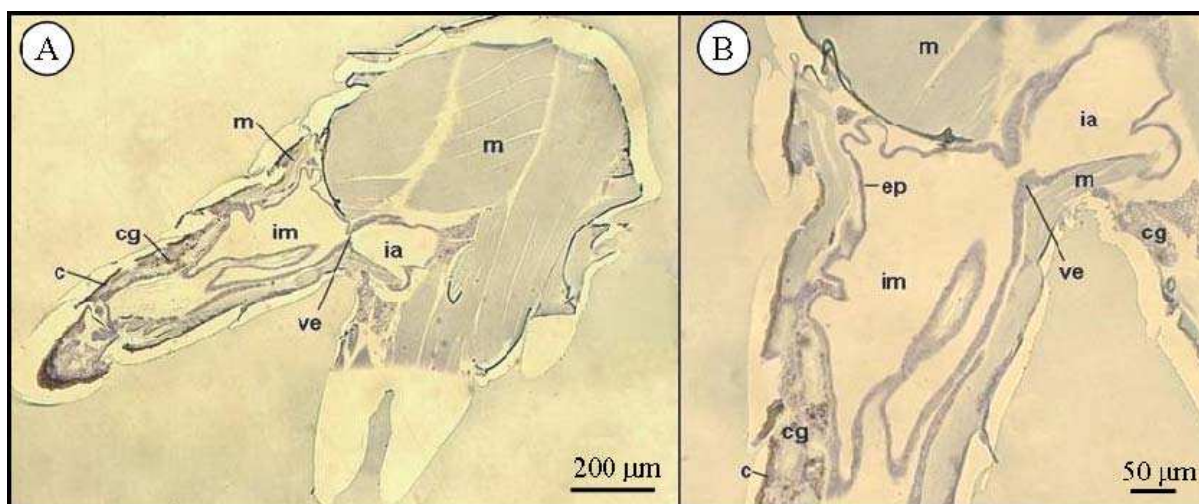


Figura 37: Secções histológicas longitudinais de fêmea de *L. (L.) longipalpis* sem alimentação sanguínea. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. **(A)** visão geral do flebotomíneo mostrando a localização do intestino; **(B)** detalhe da localização do intestino. c=cutícula; cg=corpo gorduroso; ep=epitélio intestinal; ia=intestino anterior; im=intestino médio; m=musculatura; ve=válvula do estomodeu.

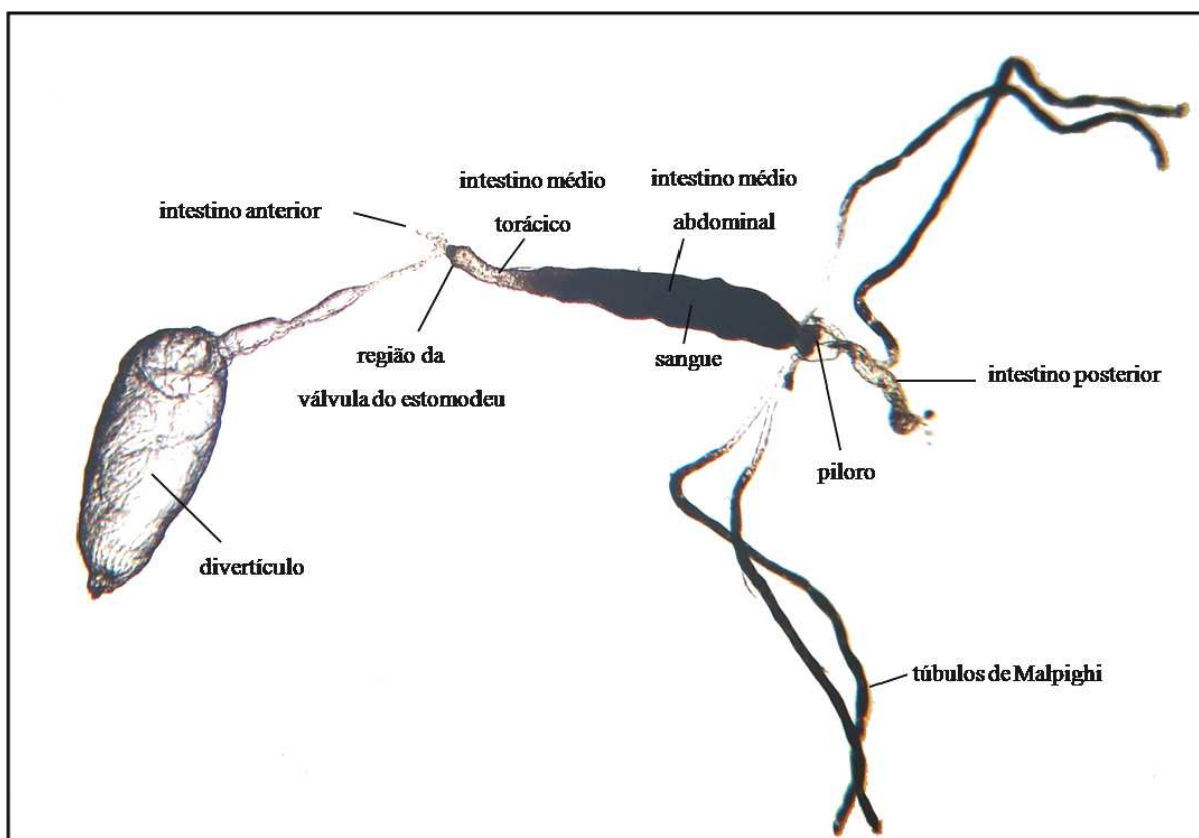


Figura 38: Intestino de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 48 horas após o repasto com sangue de camundongo não infectado. O intestino foi dissecado e fotografado sob lupa.

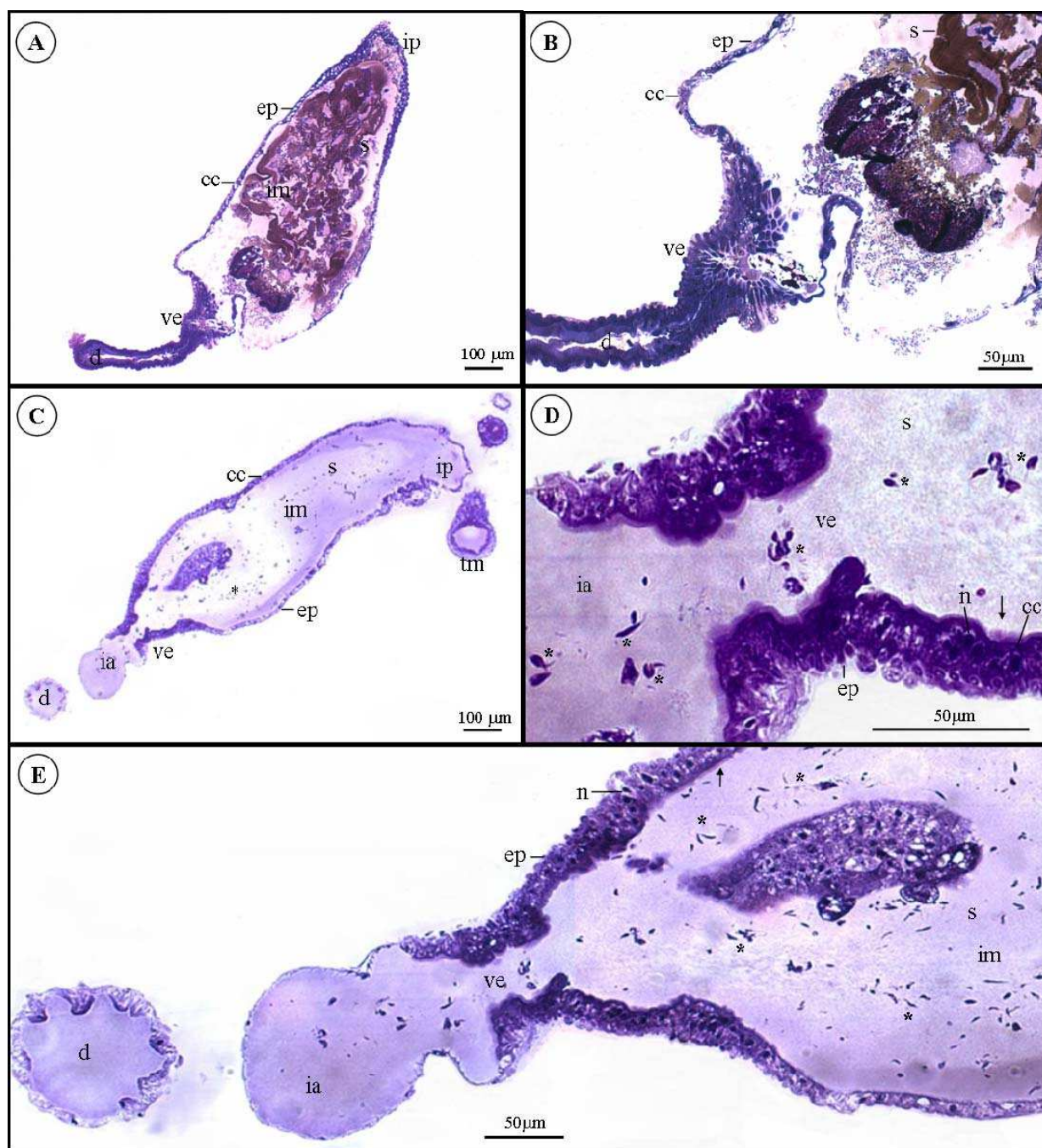


Figura 39: Secções histológicas longitudinais do intestino de fêmea de *L. (L.) longipalpis* alimentadas com sangue de camundongo não infectado (A-B) e infectado com *L. (L.) chagasi* WT (C-E). Os intestinos foram dissecados 48 horas após o repasto sanguíneo e antes da liberação total do bolo fecal. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. (A) e (C) visão geral do intestino; (B), (D) e (E) detalhe do intestino médio e da região da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; cc=célula colunar, d=divertículo, ep=epitélio, ia=intestino anterior, im=intestino médio, ip= intestino posterior; n=núcleo das células colunares, s=sangue, tm=túbulos de Malpighi, ve=válvula do estomodeu, setas=microvilosidades.

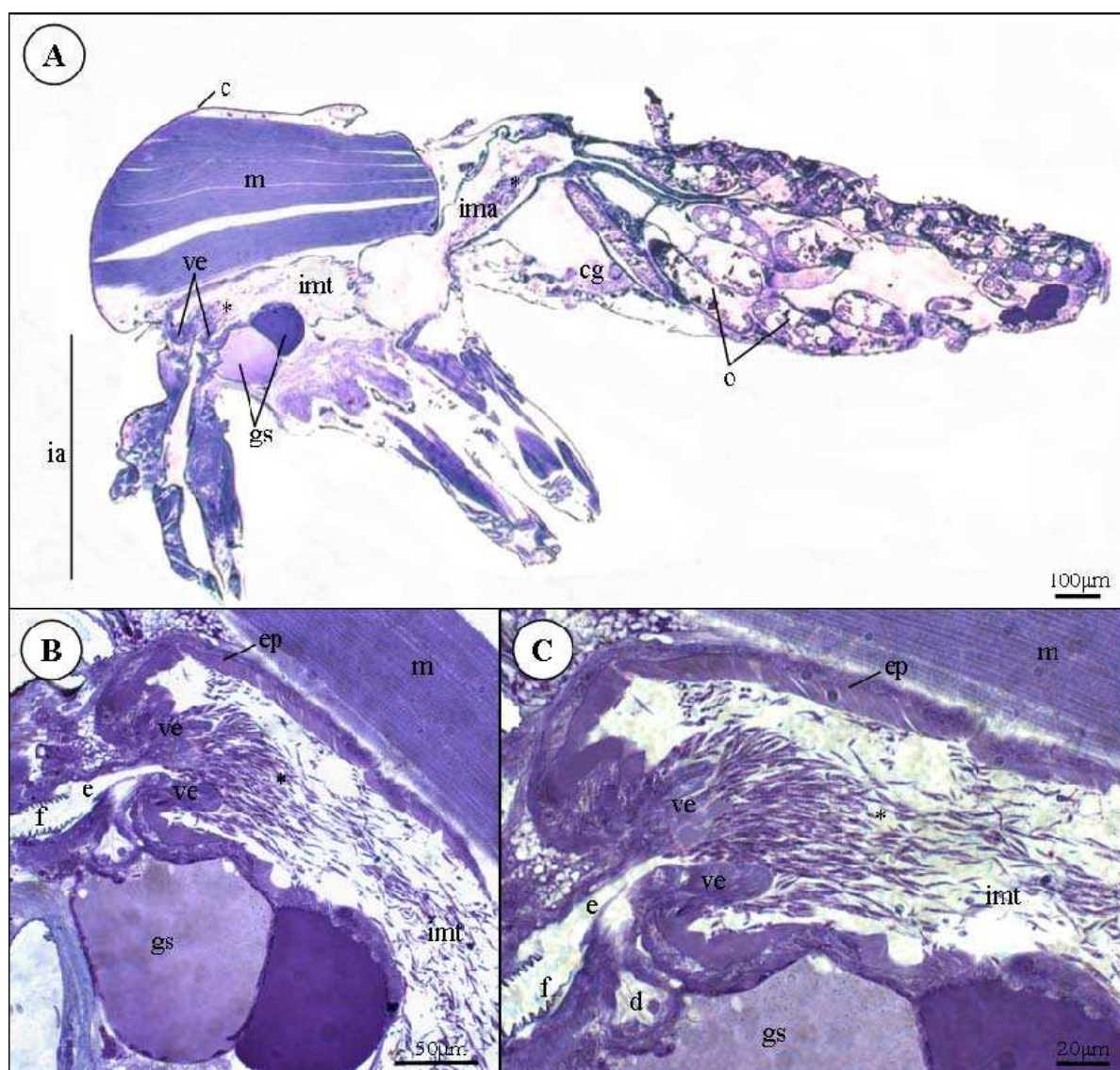


Figura 40: Secções histológicas longitudinais de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os insetos foram processados 5 dias após o repasto sanguíneo infectante. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina. **(A)** visão geral do flebotomíneo; **(B)** detalhe da válvula do estomodeu, do intestino médio torácico e dos parasitos; e **(C)** detalhe de leishmanias obstruindo o lúmen intestinal e contribuindo para o bloqueio da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; c=cutícula, cg=corpo gorduroso, d=divertículo, e=esôfago, ep=epitélio, f=faringe, gs=glândula salivar, ia=intestino anterior, ima=intestino médio abdominal, imt= intestino médio torácico, m=musculatura, o=ovos, ve=válvula do estomodeu.

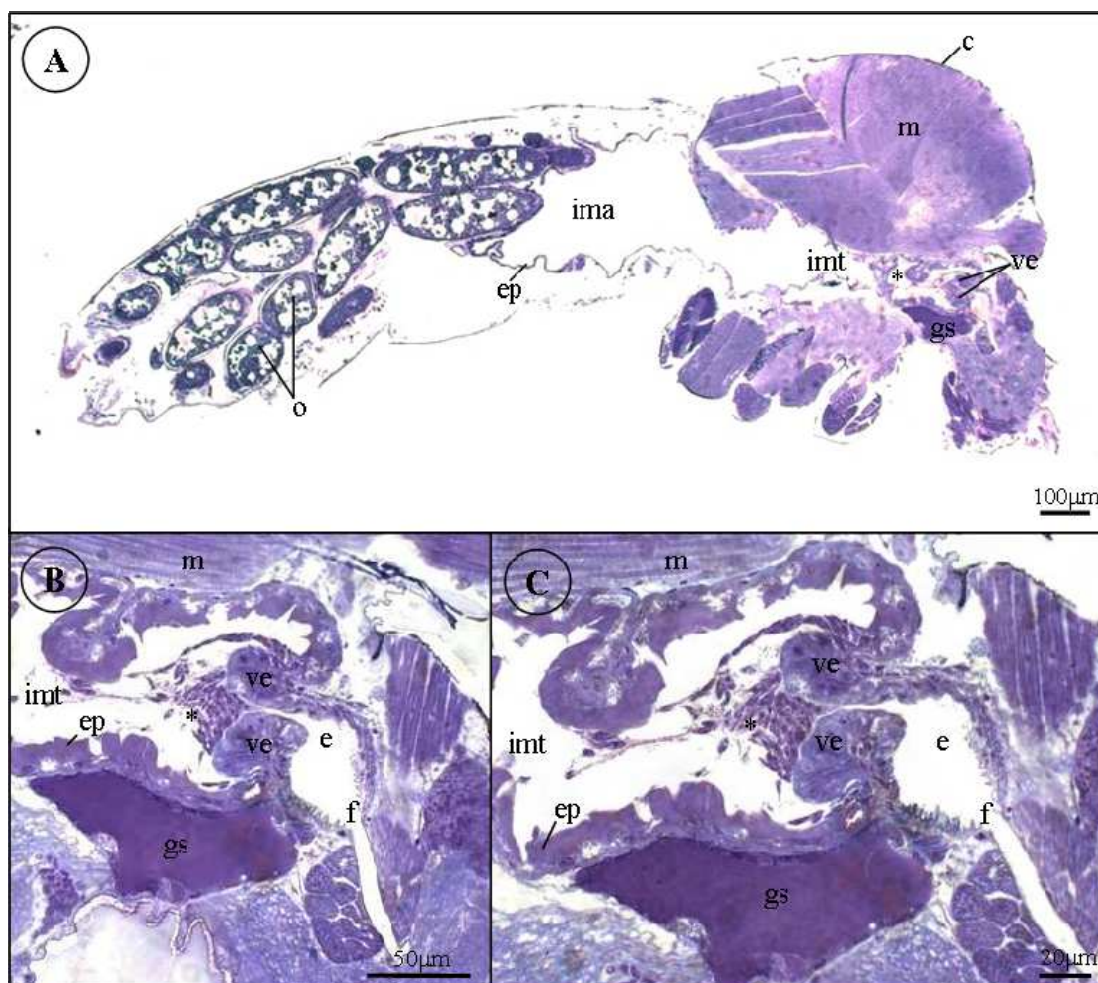


Figura 41: Secções histológicas longitudinais de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os insetos foram processados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante. Os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina (A) Visão geral do flebotomíneo; (B) detalhe da válvula do estomodeu, do intestino médio torácico e dos parasitos; e (C) detalhe de promastigotas obstruindo o lúmen intestinal e contribuindo para o bloqueio da válvula do estomodeu. asteriscos=promastigotas; c=cutícula, e=esôfago, ep=epitélio, f=faringe, gs=glândula salivar, ima=intestino médio abdominal, imt=intestino médio torácico, m=musculatura, o=ovos, ve=válvula do estomodeu.

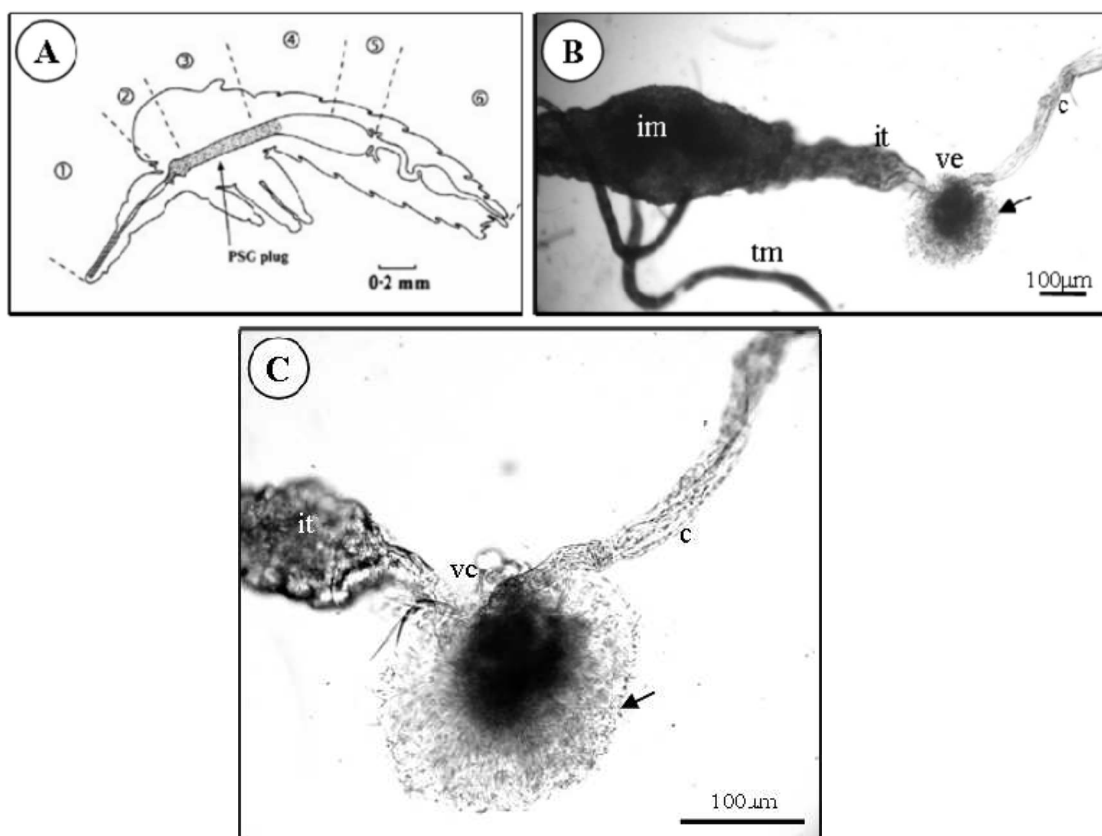


Figura 42: Plug de gel tipo PSG secretado por promastigotas de um intestino de *L. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) chagasi* WT (infecção tardia iniciada com formas promastigotas). **(A)** Secção sagital de uma fêmea de flebotomíneo demonstrando a distensão do intestino torácico e a posição típica do plug de gel (seta) (extraído de Rogers *et al.*, 2002, com modificações). O diagrama mostra o intestino dividido em: 1, intestino anterior; 2, região da cárdia; 3, intestino médio torácico; 4 e 5, intestino médio abdominal e 6, intestino posterior. **(B)** e **(C)** Aparência do gel intacto do intestino torácico dissecado sob microscópio óptico. c=crop; im=intestino médio; it=intestino torácico; seta=promastigotas embebidos no gel; tm=túbulos de Malpighi; ve=válvula do estomodeu.

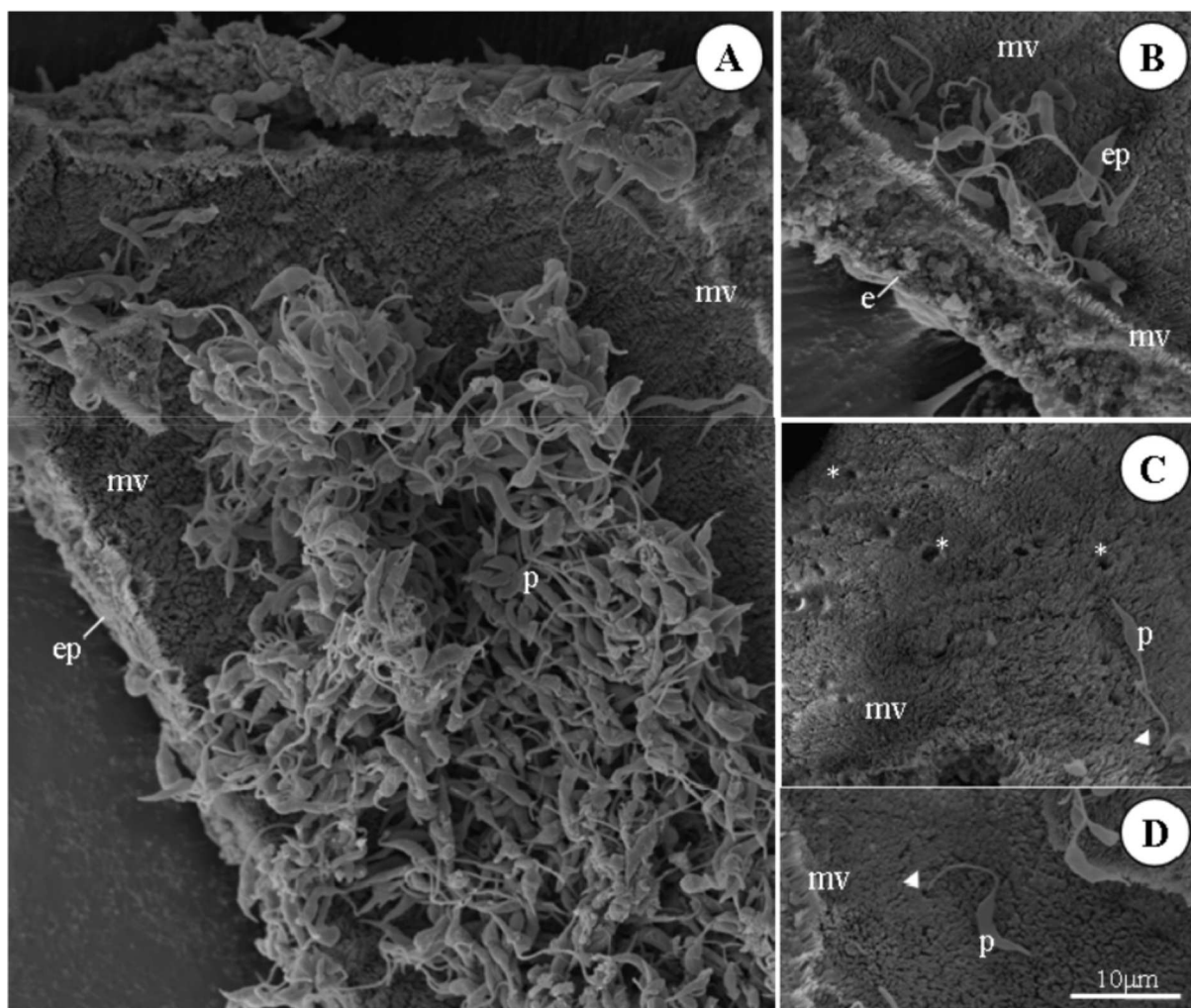


Figura 43: Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 3 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** Vista geral do intestino; **(B)-(D)** detalhe de (A). asteriscos=sinais deixados pela possível inserção do flagelo dos parasitos; cabeça de seta=detalhe da adesão dos parasitos; ep=epitélio intestinal; mv=microvilosidades; p=promastigotas.

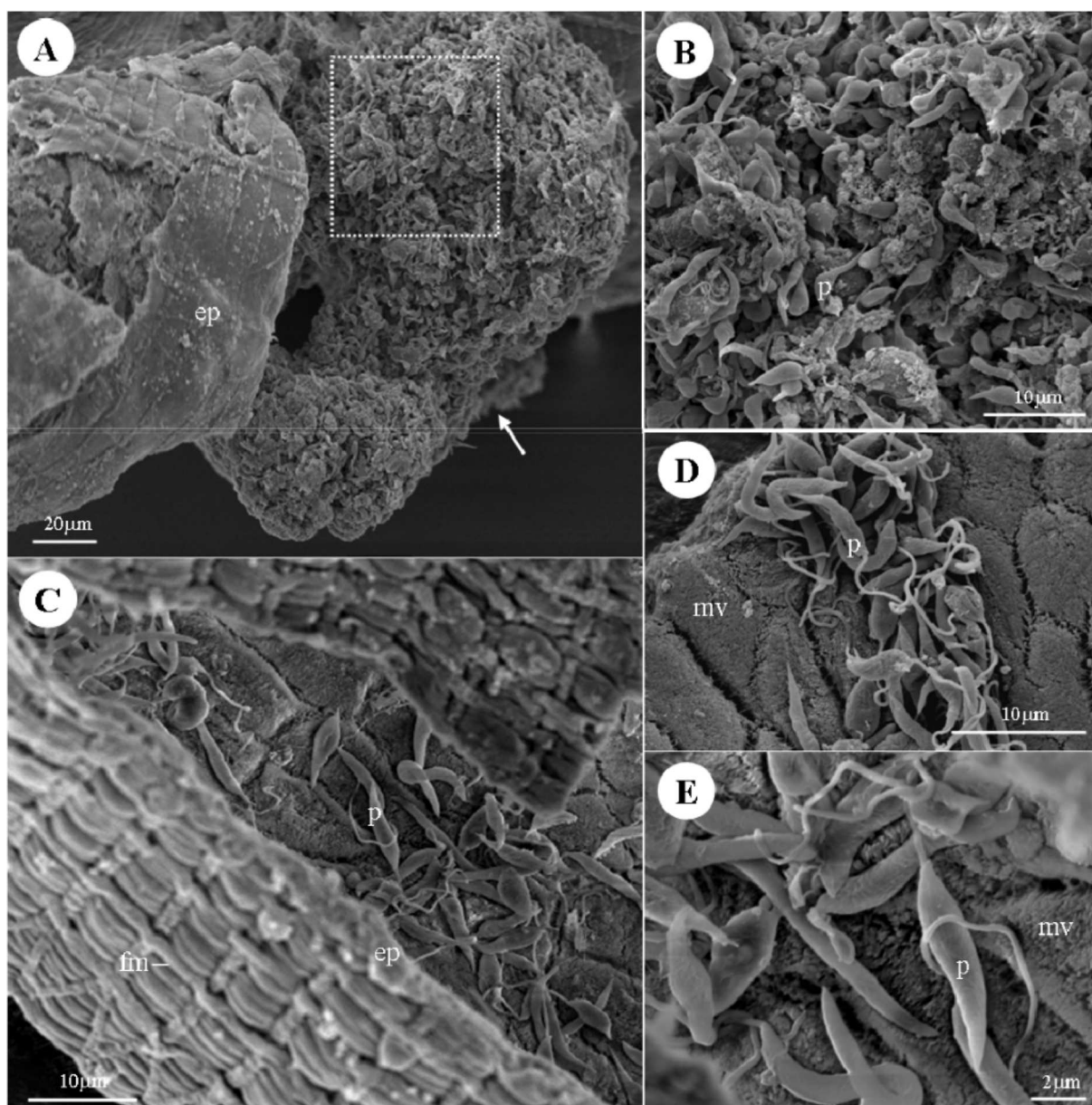


Figura 44: Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 6 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** bolo de parasitos no intestino médio (seta); **(B)** detalhe da área tracejada em **(A)**; **(C)** vista geral do intestino médio aberto e contendo parasitos; **(D)** e **(E)** detalhe de **(C)**. ep= epitélio intestinal; fm=fibras musculares; mv=microvilosidades; p=promastigotas.

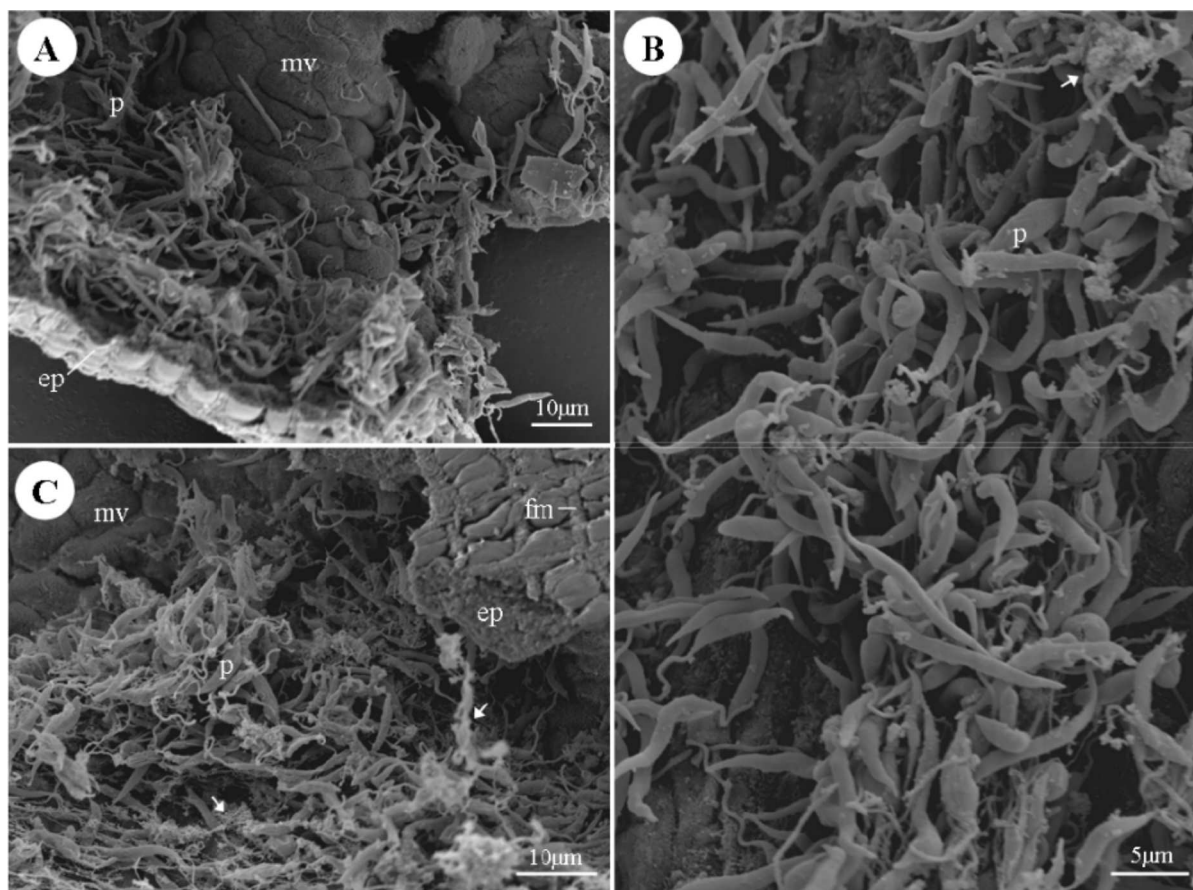


Figura 45: Intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** vista geral do intestino médio; **(B)-(C)** detalhe dos parasitos e do gel tipo PSG. ep=epitélio intestinal; fm=fibras musculares; mv=microvilosidades; p=promastigotas; setas= filamentos do gel.

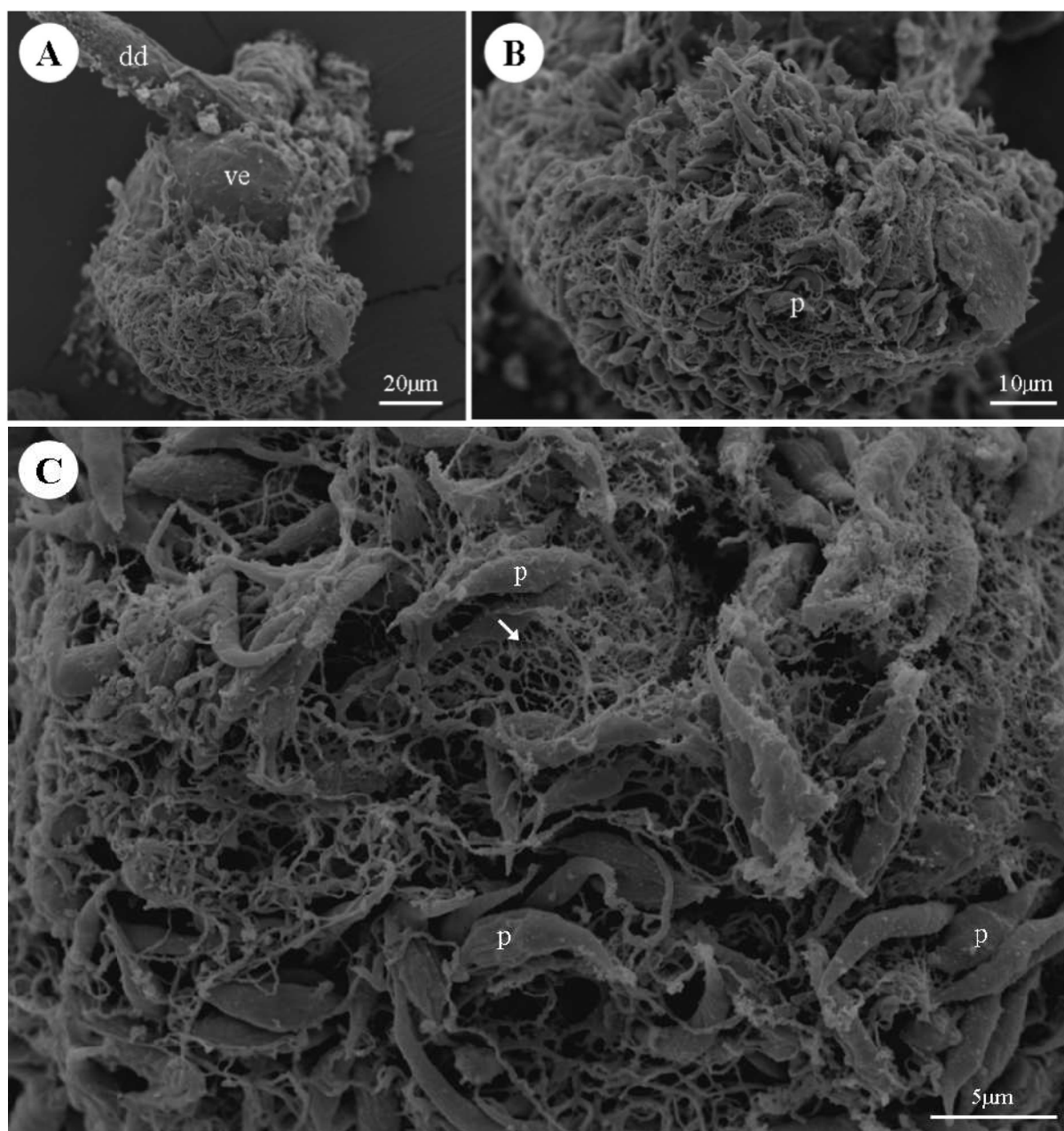


Figura 46: Trato digestivo aberto na região da válvula do estomodeu de uma fêmea de *L. (L.) longipalpis* infectada com *L. (L.) chagasi* WT. Os intestinos foram dissecados 7 dias após o repasto sanguíneo infectante e processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. **(A)** Vista geral mostrando a região da válvula do estomodeu repleta de parasitos e o ducto do divertículo; **(B)** detalhe de (A); **(C)** detalhe da densa rede de filamentos de gel tipo PSG que envolve os parasitos. dd=ducto do divertículo; p=parasitos; seta= rede de filamento do gel; ve=válvula do estomodeu.

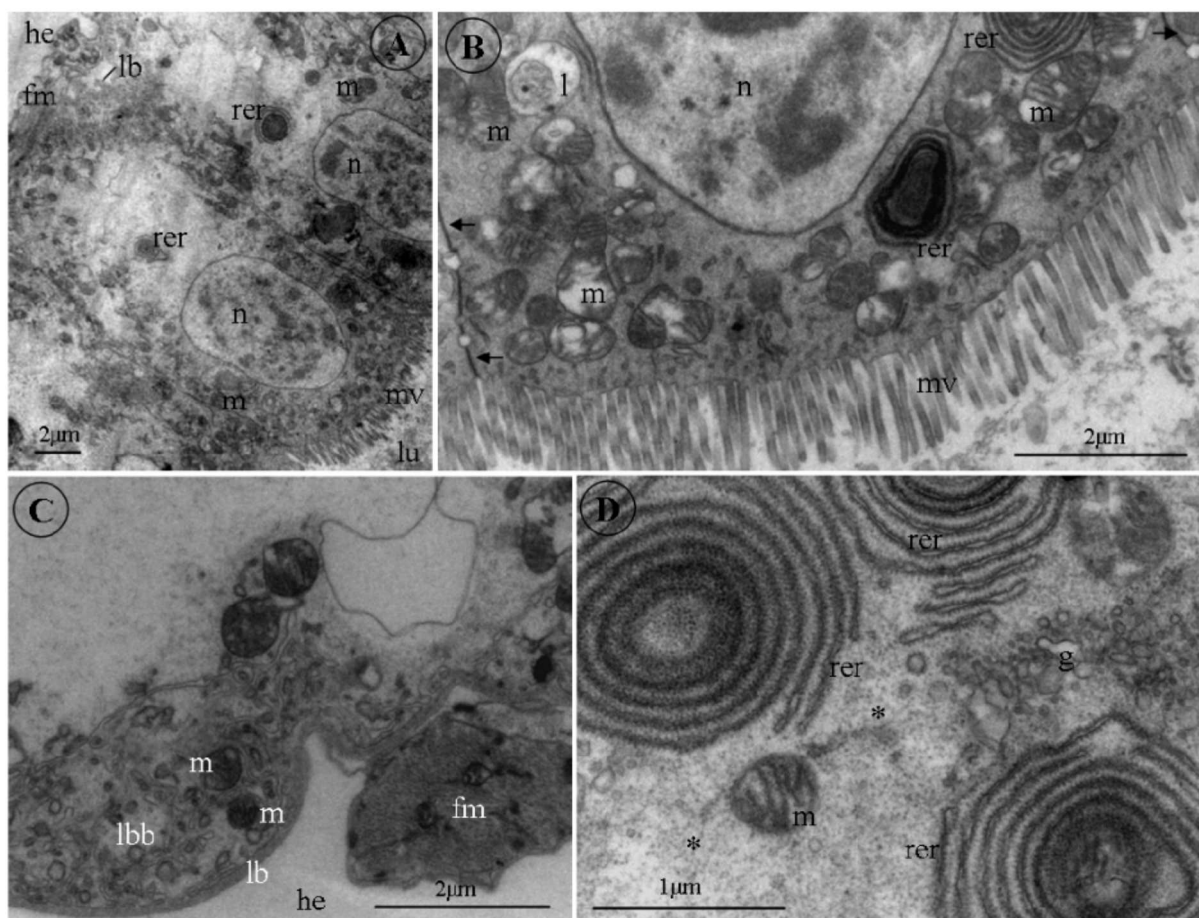


Figura 47: Ultraestrutura do epitélio celular do intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após a o repasto sanguíneo com *L. (L.) chagasi* WT. **(A)** visão geral das células epiteliais; **(B)** detalhe da região apical de uma célula epitelial; **(C)** detalhe da região basal do epitélio intestinal; **(D)** retículo endoplasmático rugoso com formação concêntrica, mitocôndria e zona de Golgi presentes na região apical do epitélio intestinal. asterisco=ribossomos livres; fm=fibras musculares; g=zonas de Golgi; he=hemocoel; l=estruturas semelhantes à lisossomos; lb= lâmina basal; lbb=labirinto basal; lu=lúmen; m=mitocôndria; mv=microvilosidades; n=núcleo; rer=retículo endoplasmático rugoso; setas=complexos juncionais tipo tight.

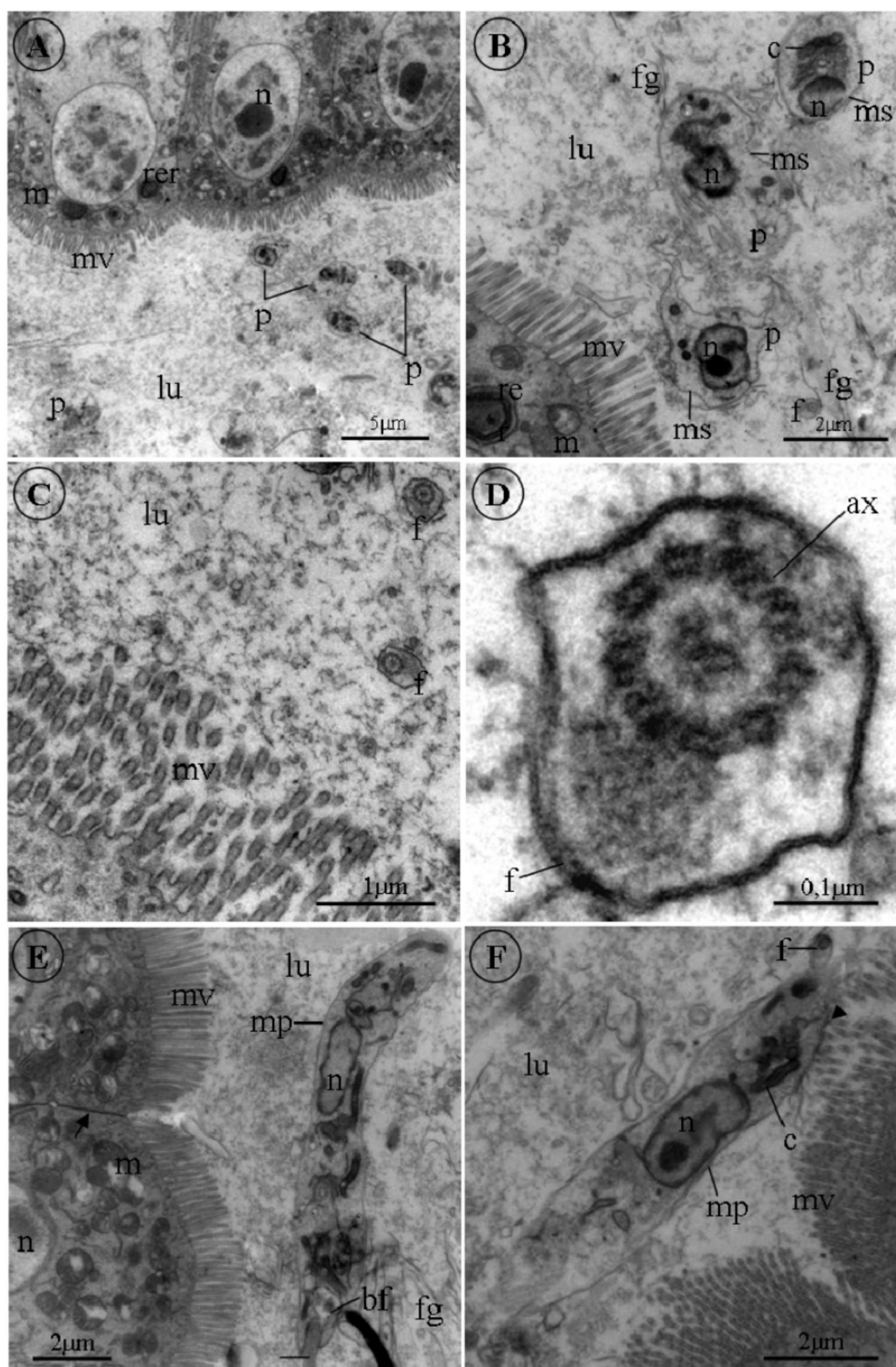


Figura 48: Ultraestrutura de *L. (L.) chagasi* WT no intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após o repasto sanguíneo. **(A)**, **(B)** e **(E)** promastigotas livres no lúmen do intestino médio; **(C)** corte transversal dos parasitos na altura do flagelo; **(D)** detalhe do axonema do flagelo; **(F)** detalhe da ligação do parasito às microvilosidades. ax=axonema do flagelo; bf=bolsa flagelar; c=cinetoplasto; cabeça de seta=associação do parasito às microvilosidades; f=flagelo; fg=filamentos de gel (fPPG); lu=lúmen; m=mitocôndria; ms=microtúbulos subpeliculares; mp=membrana plasmática do parasito; mv=microvilosidades; n=núcleo; rer=retículo endoplasmático rugoso; p=promastigotas; seta=complexos juncionais tipo tight.

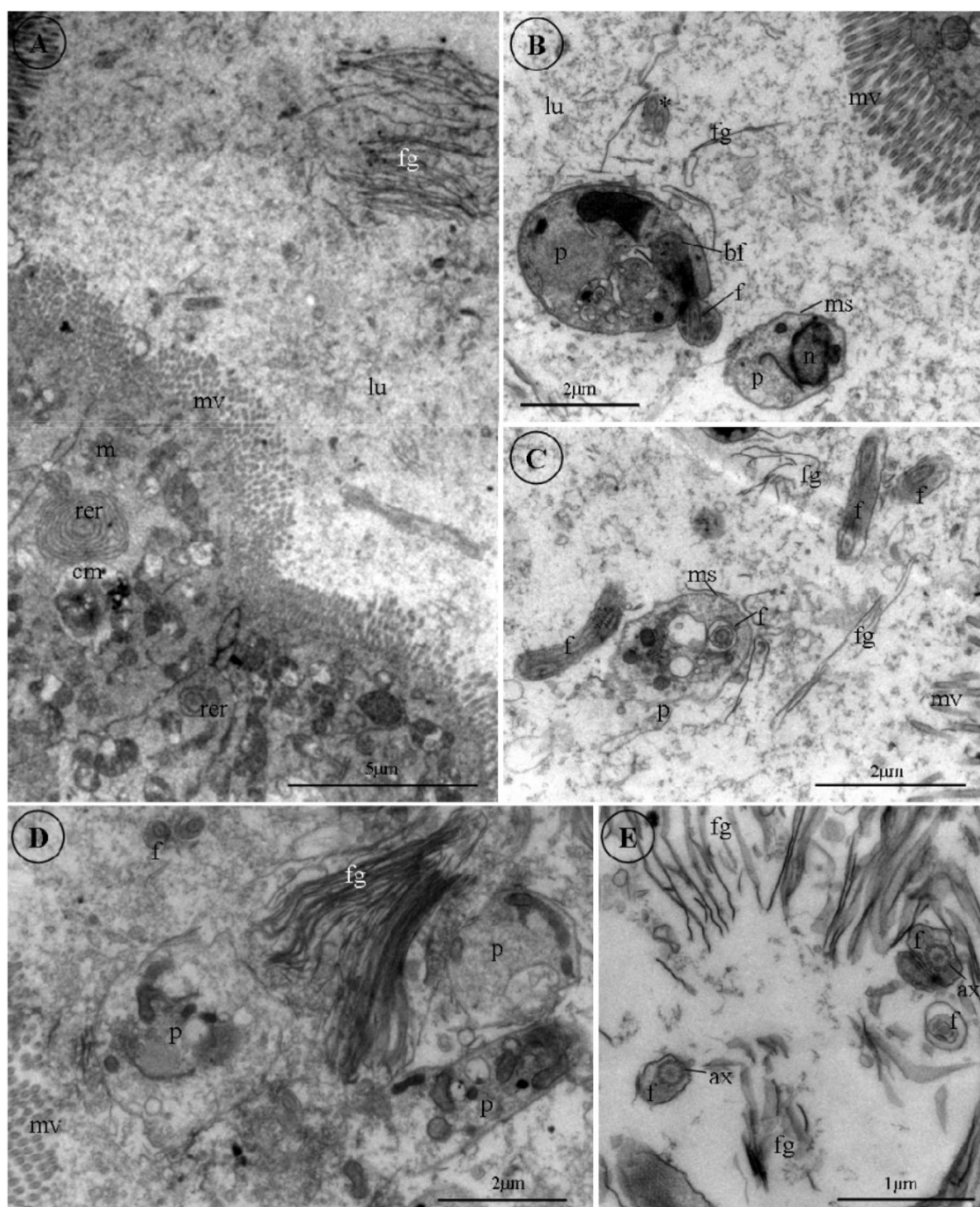


Figura 49: Ultraestrutura de *L. (L.) chagasi* no intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 7 dias após a o repasto sanguíneo. **(A)** Localização dos filamentos de gel tipo PSG; **(B)-(E)** detalhe das promastigotas em associação com filamentos de gel tipo PSG. asterisco=promastigotas em divisão; ax=axonema do flagelo; bf=bolsa flagelar; c=cinetoplasto; cm=corpos multivesiculares; f=flagelo; fg=filamentos de gel; lu=lúmen; m=mitocôndria; ms=microtúbulos subpeliculares; mv=microvilosidades; n=núcleo; p=promastigotas; rer=retículo endoplasmático rugoso.

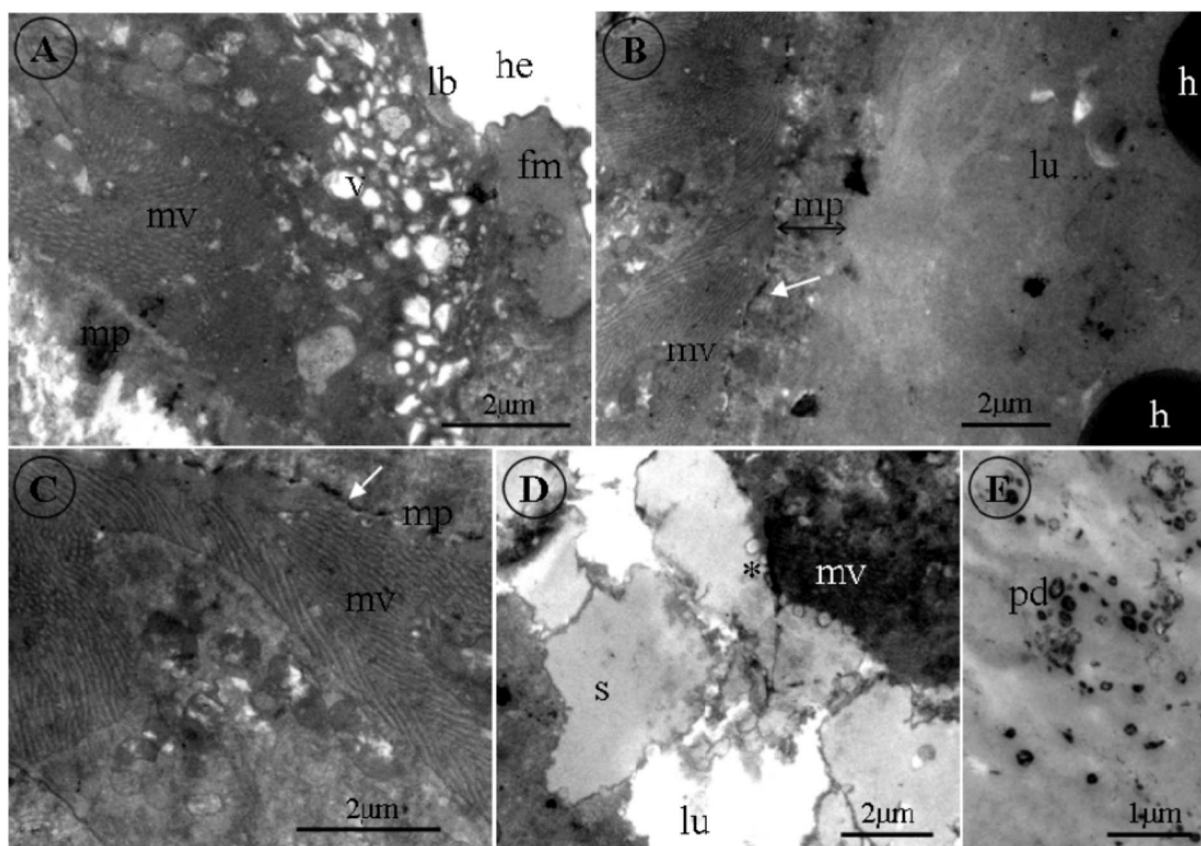


Figura 50: Ultraestrutura do intestino médio de fêmea de *L. (L.) longipalpis* 30 horas após o repasto sanguíneo com *L. (L.) chagasi* BH46 LPG1KO. **(A)** visão geral do epitélio intestinal mostrando a formação da matriz peritrófica; **(B)-(C)** detalhe da incrustação de pigmentos tipo heme (um produto da digestão das hemáceas) na matriz peritrófica e de hemáceas parcialmente lisadas; **(D)** vesículas de secreção sendo liberadas pelo epitélio intestinal; **(E)** produtos da digestão. asterisco=secreção de vesículas; fm=fibras musculares; h=hemáceas parcialmente lisadas; he=hemocoel; lb=lâmina basal; lu=lúmen; mp=matriz peritrófica; mv=microvilosidades; pd= produtos da digestão; s=secreção; seta=incrustação de pigmentos tipo heme; v=vesículas.

5 DISCUSSÃO

Formas amastigotas utilizadas em diversos tipos de experimento têm sido isoladas de lesões animais (Walters *et al.*, 1989a; Pimenta *et al.*, 1997; Nieves & Pimenta, 2000, 2002; Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003) ou cultivadas *in vitro* em macrófagos humanos ou murinos (Bates *et al.*, 1992; Warburg, 2008). Entretanto, o isolamento de amastigotas consome muito tempo, a qualidade do material obtido é limitada pela preparação e pode não ser livre de contaminantes derivados do hospedeiro. Sendo assim, o cultivo *in vitro* de amastigotas pode possibilitar uma excelente e ilimitada fonte de organismos viáveis que são livres de contaminantes do hospedeiro e podem ser efetivamente utilizados em estudos de testes de drogas, clonagem molecular, identificação de novos genes regulados pelo estágio de desenvolvimento da *Leishmania*, produção de vacinas (Gupta *et al.*, 2001) e interação parasito-vetor.

Durante o ciclo evolutivo, parasitos do gênero *Leishmania* experimentam condições adversas. No fagolisossomo, as amastigotas encontram um pH entre 4.5-6.0 (Zilberstein & Shapira, 1994), enquanto no intestino de *L. (L.) longipalpis* formas promastigotas encontram um pH entre 5.5-6.0 (Gontijo *et al.*, 1998). Além da variação de pH, mudanças na temperatura representam outra condição adversa aos parasitos. Os parasitos desenvolvem-se em temperaturas que variam entre 22 e 28 °C no flebotomíneo e em torno de 37°C no hospedeiro mamífero (Zilberstein & Shapira, 1994). As transições dos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito são induzidas principalmente por essas variações de pH e de temperatura, e cada estágio é altamente adaptado para sobrevivência extra ou intracelular em ambos hospedeiros (Zilberstein & Shapira, 1994; revisado por Opperdoes & Coombs, 2007). Dessa forma, condições que mimetizem o ambiente do fagolisossomo *in vitro*, tais como diminuição de pH e elevação de temperatura e CO₂, podem induzir a diferenciação de promastigotas em amastigotas (Barak *et al.*, 2005).

Doyle e colaboradores (1991) foram os primeiros a diferenciar com sucesso promastigotas em amastigotas axênicas, utilizando *L. (L.) donovani*. Desde então, diversos laboratórios obtiveram sucesso na produção de amastigotas axênicas apenas pela elevação da temperatura, sua combinação com um pH ácido e uso de diferentes tipos de meios de cultura (Bates, 1992, 1993; Charest & Matlashewski, 1994; Zilberstein & Shapira, 1994; Hodgkinson *et al.*, 1996; Balanco *et al.*, 1998; Ismaeel *et al.*, 1998; Saar *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1999; Somanna *et al.*, 2002; Debrabant *et al.*, 2004; Barak *et al.*, 2005; Leifso *et al.*, 2007; Habibi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2008; Dias Costa *et al.*, 2009; Neserreddin *et al.*,

2010). Entretanto, as condições que promovem a transformação de promastigotas em amastigotas em uma dada espécie podem não ser apropriadas para outra. Por isso, as condições de cultivo devem ser determinadas para cada espécie ou cepa de *Leishmania* (Gupta *et al.*, 2001).

A transformação de promastigotas em amastigotas em resposta a elevação de temperatura com ou sem redução do pH do meio de cultura tem sido relatada para diversas cepas de *Leishmania* (revisado por Pan *et al.*, 1993; Gupta, 2001). No caso de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, a diferenciação para amastigota ocorreu após 4 dias de incubação a 37 °C e sem a necessidade de acidificação do meio de cultura. Saar e colaboradores (1998) já haviam notado que promastigotas de *L. (L.) donovani* também não se transformavam em amastigotas em temperaturas abaixo de 37 °C. Tem sido relatado que apenas o aumento de temperatura pode ser capaz de provocar as mudanças morfológicas no parasito e que essa mudança reflete no seu metabolismo (Darling & Blum, 1987; Doyle *et al.*, 1991).

Uma validação cuidadosa das amastigotas cultivadas extracelularmente é fundamental para que essa cultura seja considerada amastigotas *bona fide*. Dentre vários critérios utilizados para essa validação, podemos citar: a) análise de aspectos morfológicos: uma caracterização morfológica inicial pode ser feita em microscópio óptico ou microscopia eletrônica de transmissão; b) análise bioquímica: comparadas às promastigotas, as amastigotas apresentam aumentada atividade de proteinase e nuclease, diminuição do conteúdo de proteínas totais, diminuição da secreção de fosfatases ácidas, incorporação de timidina, diminuição na produção de LPG e mudanças na aglutinação mediada por lectinas; c) análise da infecciosidade: pode ser realizada *in vitro* pela infecção de macrófagos em cultura ou *in vivo* pela infecção de hamsters; d) análise da transformação cíclica: a transformação cíclica ocorre quando amastigotas axênicas reverterem sua forma para promastigotas pela mudança de temperatura para 26 °C; e) análise imunocitoquímica: ocorre pelo reconhecimento diferencial por anticorpos monoclonais estágio-específico e; (f) caracterização molecular: identificação da produção de proteínas estágio-específico, sendo a mais conhecida delas a proteína A2 (revisado por Gupta, 2001). No presente estudo nós utilizamos os seguintes marcadores específicos da diferenciação de promastigota em amastigota: morfologia, transformação cíclica (reversão), infecção de macrófagos murinos, perfil de proteínas e expressão da proteína A2.

Observações em microscopia óptica e eletrônica de varredura foram utilizadas para a caracterização inicial dos parasitos e revelaram similaridades entre amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* e amastigotas intracelulares. Amastigotas axênicas apresentaram-se ovóides e

sem flagelo aparente. O acompanhamento da sua morfologia, quando as mesmas foram incubadas novamente a 26 °C, revelou que elas também foram capazes de retornar à forma promastigota.

Foram observadas altas porcentagens de macrófagos murinos infectados por amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi*. Após 24 horas, mais de 80% dos mesmos apresentaram infecção. A capacidade de replicação das amastigotas dentro dos macrófagos foi indicada pela presença de dois núcleos ou dois cinetoplastos (* na figura 15). Altas taxas macrófagos infectados por amastigotas axênicas também foram encontradas por outros autores (Debrabant *et al.*, 2004; Dias Costa *et al.*, 2009; Nasereddin *et al.*, 2010) e padrões similares de desenvolvimento e virulência também foram observados em macrófagos infectados por amastigotas intracelulares e amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum* (Dias Costa *et al.*, 2009).

A análise das proteínas totais de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* revelou diferenças qualitativas no padrão de bandas entre os dois tipos celulares. Tem sido proposto que, além das diferenças qualitativas, amastigotas também apresentem uma diminuição no conteúdo de proteínas quando comparadas com promastigotas (revisado por Gupta *et al.*, 2001).

As bases moleculares para a regulação da diferenciação de promastigotas em amastigotas ainda são pouco entendidas, entretanto, prévios estudos demonstraram que a fosforilação de tirosina tem um significativo papel na diferenciação de *Leishmania* (Nascimento *et al.*, 2003), regulando direta ou indiretamente a expressão da proteína A2. Essa proteína foi primeiramente identificada em *L. (L.) donovani* como uma família de proteínas estágio-específico de amastigota (Charest & Metlashewski, 1994). Elas são compostas predominantemente por cópias múltiplas e, dependendo do número de repetições dentro de cada proteína, seu tamanho pode variar de 45 a 100 kDa (Zhang *et al.*, 1996). A análise de cariótipos tem revelado que os genes de A2 são conservados em *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e espécies do complexo mexicana (Ghedin *et al.*, 1997). A expressão de A2 é dependente do aumento de temperatura e diminuição de pH, que resulta em um aumento da estabilidade do mRNA de A2 em amastigotas (Charest & Metlashewski, 1994). Em nosso trabalho, nós detectamos a expressão da proteína A2 em amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* utilizando a técnica de RT-PCR. A expressão da proteína A2 foi observada após 96 horas de incubação dos parasitos a 37 °C, período coincidente tanto com a produção máxima de amastigotas axênicas (Figura 11) quanto com o aparecimento de características morfológicas típicas de amastigotas nas amastigotas axênicas (Figuras 12B-D e 13D).

Os critérios utilizados e descritos acima indicam que a metodologia utilizada para diferenciação de amastigotas *in vitro* resultou na produção de amastigotas axênicas semelhantes à amastigotas derivadas de animais. A capacidade de induzir a diferenciação de *L. (L.) chagasi in vitro* possibilitou a produção de quantidades suficientes de amastigotas axênicas necessária para a realização da infecção experimental. Essa foi a primeira vez que amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* foram usadas para infectar flebotomíneos. A capacidade de amastigotas axênicas infectarem o vetor *L. (L.) longipalpis* foi o último critério conclusivo para a consideração dessas amastigotas como amastigotas *bona fide*.

Os primeiros estudos morfológicos sobre a interação *Leishmania*-vetor no Novo Mundo observaram a ultraestrutura dos parasitos em infecções de *L. (L.) longipalpis* com *Leishmania mexicana amazonensis* (Killick-Kendrick *et al.*, 1974b; Molyneux *et al.*, 1975). Em 1977, Lainson e colaboradores obtiveram sucesso na transmissão experimental de parasitos de *L. (L.) chagasi* pela picada de *L. (L.) longipalpis*. Entretanto, detalhes sobre o desenvolvimento desse parasito no seu vetor natural foram investigados somente alguns anos depois em trabalhos que abordaram os aspectos ultraestruturais dessa interação pela análise de esfregaço, de cortes histológicos e de microscopia eletrônica de transmissão de intestinos artificialmente infectados (Lainson & Shaw, 1988; Walters *et al.*, 1989a).

No presente trabalho, o desenvolvimento de infecções de *L. (L.) longipalpis* iniciadas com amastigotas axênicas, um modo de infecção mais próximo do natural, foram comparadas àquelas iniciadas com promastigotas de cultura. É interessante notar que nenhuma diferença significativa foi observada entre as taxas de infecção de *L. (L.) longipalpis* nessas infecções experimentais com promastigotas ou amastigotas axênicas. Esse resultado traz evidências de que o modelo de infecção com promastigotas, pelo menos para *L. (L.) chagasi* / *L. (L.) longipalpis*, é adequado para a obtenção de insetos infectados, já que é menos laborioso.

Para avaliar o impacto do tipo de infecção (amastigotas axênicas versus promastigotas) no desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis*, intestinos foram examinados diariamente. A consideração do sucesso da infecção foi baseada na avaliação de parâmetros tais como escape dos parasitos da MP, migração e colonização da válvula do estomodeu e diferenciação dos parasitos em formas infectantes.

Uma alta porcentagem de *L. (L.) longipalpis* infectados foi encontrada em todos os dias analisados, tanto nas infecções iniciadas com promastigotas quanto naquelas iniciadas com amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* (média de 88 e 93% respectivamente). Altas porcentagens de insetos infectados também foram observadas por Saraiva e colaboradores (1995) em *P. (P.) papatasi* infectado com *L. (L.) major* e por Nieves e Pimenta (2000) em *L.*

migonei infectado com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Taxas de infecção bem menores foram encontradas em *L. (L.) longipalpis* infectados com duas diferentes cepas colombianas de *L. (L.) chagasi* (L-12=3,8% e NILO=24,2%) (Montoya-Lerma *et al.*, 2003). A grande diferença entre a taxa de infecção encontrada por nós e a descrita no trabalho citado acima pode estar relacionada tanto a baixa infecciosidade dessas cepas quanto à susceptibilidade a infecção da população colombiana de flebotomíneos utilizada. Além disso, tem sido demonstrado que a fonte do sangue da alimentação pode influenciar na taxa de infecção do flebotomíneo por *Leishmania* (Nieves & Pimenta, 2002).

No segundo dia após a infecção a média de parasitos por intestino de *L. (L.) longipalpis* foi alta para ambas as infecções iniciadas com promastigotas e amastigotas axênicas. Altas densidades de parasitos nos primeiros dias de infecção em diferentes vetores também têm sido relatadas em *L. migonei* infectado com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Nieves e Pimenta 2000, 2002) e *P. (P.) sergenti* infectado com *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) donovani* (Kamhawi *et al.*, 2000b). Em nosso trabalho, uma grande diminuição no número de parasitos foi observada no terceiro e quarto dia após a alimentação sanguínea iniciada com promastigotas e amastigotas axênicas, respectivamente. Estes decréscimos têm sido associados à ação das enzimas digestivas (Dillon & Lane, 1993a; Pimenta *et al.*, 1997; Nieves & Pimenta, 2002). Entretanto, o número de promastigotas sobreviventes em ambos os grupos foi suficiente para estabelecer a infecção no intestino de *L. (L.) longipalpis*, possivelmente pela modulação da ação enzimática pelos parasitos (Schlein & Romano, 1986; Borovsky & Schlein, 1987; Dillon & Lane, 1993a; Schlein & Jacobson, 1998). Recentemente, essa idéia tem sido reforçada pela identificação de proteases do intestino de flebotomíneo que são reguladas pela presença de *Leishmania* (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008).

A perda da infecção foi observada em um pequeno número de flebotomíneos no quarto dia após a alimentação sanguínea. Possivelmente, nesse caso, os parasitos falharam no escape da MP e, conseqüentemente, foram excretados juntamente com o bolo fecal (Walters *et al.*, 1992; Ciaková & Volf, 1997; Pimenta *et al.*, 1997).

Na maioria das fêmeas os remanescentes da digestão sanguínea foram liberados no terceiro dia após o repasto, concordando com as observações de outros autores em infecções de *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi* (Walters *et al.*, 1989a; Montoya-Lerma *et al.*, 2003). A grande maioria das fêmeas permaneceu infectada e os parasitos iniciaram a colonização do intestino. A média de parasitos por intestino atingiu valor máximo no sexto e sétimo dia após a alimentação sanguínea iniciada com promastigotas e amastigotas axênicas,

respectivamente. Nas infecções com promastigotas, o tempo necessário para atingir a densidade máxima de parasitos foi menor, assim com a média de parasitos alcançada foi maior. É possível que as formas amastigotas axênicas tenham sido mais expostas à ação das enzimas digestivas devido às mudanças de conformação no seu glicocálix durante a transição amastigota-promastigota (Pimenta *et al.*, 1997). Como nas infecções iniciadas com promastigotas os parasitos não passaram por esse estágio de diferenciação e já estavam protegidos pela camada de LPG desde as primeiras horas de infecção, a mortalidade pode ter sido menor e o desenvolvimento mais rápido, explicando assim a diferença significativa na média de parasitos atingida pelos dos dois grupos observada unicamente no sexto dia após o repasto. Nos dias subseqüentes, a média de parasitos por intestino manteve-se aproximadamente constante nos dois grupos.

Fatores intrínsecos de cada espécie ou cepa podem influenciar no desenvolvimento e na densidade de parasitos alcançada no intestino do vetor. Em laboratório, a população de parasitos encontrada no intestino *L. migonei* foi maior nas infecções por *L. (L.) amazonensis* do que naquelas por *L. (V.) braziliensis* (Nieves & Pimenta, 2000). Variações no desenvolvimento de várias cepas de *L. (L.) major* provenientes de diferentes regiões também foram observadas nos seus vetores naturais *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) duboscqi* (Ciaková & Volf, 1997).

No presente trabalho, as observações morfológicas do epitélio intestinal de *L. (L.) longipalpis* estão de acordo com aquelas sugeridas para outros flebotomíneos do Velho Mundo (Gemetchu, 1974; El Sawaf *et al.*, 2008) e do Novo Mundo (Rudin & Hecker, 1982; Andrade-Coelho *et al.*, 2001; Nieves *et al.*, 2004). Trabalhos sobre a morfologia de intestinos de flebotomíneos infectados com *Leishmania* têm trazido relevantes informações sobre aspectos da interação parasito-vetor. Walters e colaboradores (1989a) descreveram que a ligação de *L. (L.) chagasi* ao epitélio de *L. (L.) longipalpis* é altamente especializada e que o flagelo encontra-se inserido verticalmente entre as microvilosidades, assim como ocorre para outros pares *Leishmania*/flebotomíneo (Killick-Kendrick *et al.*, 1974b; Warburg *et al.*, 1986; Lawyer *et al.*, 1987; Walters *et al.*, 1987; El Sawaf *et al.*, 2008). Entretanto, no presente trabalho, poucos parasitos foram observados em contato com o epitélio intestinal do flebotomíneo, algumas vezes com todo o corpo celular disposto sobre as microvilosidades (Figura 48F) e esporadicamente com o flagelo superficialmente inserido entre elas (43C e D). A maior parte dos parasitos permaneceu livre no lúmen, próximos as microvilosidades. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos em *P. (L.) langeroni* infectado com *L. (L.) infantum* (El Sawaf *et al.*, 2008). É importante destacar que as espécies *L. (L.) chagasi* e *L.*

(*L. (L.) longipalpis* utilizadas no trabalho de Walters e colaboradores (1989a) eram procedentes da Colômbia e as nossas, do Brasil. Estudos comparativos são de grande interesse, uma vez que *L. (L.) longipalpis* é considerado um complexo de espécies (revisado em Bauzer *et al.*, 2007), com desconhecidas diferenças entre distintas populações geográficas com respeito à interação com *Leishmania* e à competência vetorial.

Como observado por Stierholf e colaboradores (1999) em infecções maduras de *L. (L.) longipalpis* com *L. mexicana*, o intestino de *L. (L.) longipalpis* frequentemente apresentou grande quantidade de parasitos. Diferentemente, em *P. (P.) papatasi* infectado com *L. (L.) major* poucos parasitos puderam ser encontrados no intestino nesse mesmo estágio (Stierholf *et al.*, 1999). Em flebotomíneos infectados com *Leishmania*, um fenômeno que tem sido comumente observado é a formação de uma massa de parasitos embebidos em uma matriz tipo gel na região da cárdia e válvula do estomodeu (Killick-Kendrick, 1979; Lawyer *et al.*, 1987, 1990; Walters *et al.*, 1987, 1989a, 1989b; Killick-Kendrick *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 2002, 2004). Nos nossos experimentos, o aparecimento de um gel, possivelmente o PSG, pôde ser observado *in vivo*, por MEV e MET na região da cárdia e do intestino médio em infecções maduras de *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi*. Nesse período, posterior a defecação, os parasitos também não estavam ancorados ao epitélio intestinal, mas apresentavam-se aparentemente ligados entre si por uma rede de substância amorfa do gel. Cortes ultrafinos também revelaram uma densa rede de fibras espalhadas pelo lúmen do intestino e ao redor dos parasitos. A válvula do estomodeu apresentou-se dilatada pela presença de grande número de parasitos embebidos e presos em uma densa rede tridimensional de substância amorfa. A morfologia dessas redes foi semelhante àquela observada em um interessante trabalho que analisou os aspectos morfológicos dos fPPGs secretados por *L. (L.) mexicana* em *L. (L.) longipalpis* e por *L. (L.) major* em *P. (P.) papatasi* (Stierholf *et al.*, 1999). Segundo os autores, a rede de fPPG secretada por essas duas espécies dentro de seu respectivos vetores é morfolologicamente idêntica ao fPPG produzido pelos parasitos *in vitro*. Vale lembrar que os filamentos de PPG (fPPG) são os principais constituintes do PSG (Stierholf *et al.*, 1999).

A destruição da válvula do estomodeu tem sido relacionada à ação de quitinases secretadas pelo parasito (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004; Roger *et al.*, 2008), e como uma consequência da patologia, o contato entre o vetor e o hospedeiro poderia ser aumentado pela redução do volume de sangue que o inseto consegue ingerir, aumentando assim as tentativas de novos repastos. Alterações morfológicas na válvula do estomodeu não têm sido relatadas para muitas combinações parasito-vetor e não foram observadas por nós em *L. (L.)*

longipalpis infectados com *L. (L.) chagasi*, embora análises ultraestruturais não tenham sido realizadas. Por outro lado, grande parte dos flebotomíneos infectados apresentou uma dilatação na região da válvula. Segundo Rogers e colaboradores (2002), a pressão e a expansão causadas pelo PSG e parasitos forçam a abertura da válvula e também prejudicam a sua função, facilitando a regurgitação de parasitos durante a picada. Assim como ocorre quando a válvula encontra-se danificada, o aumento das tentativas de picadas poderia promover a transmissão dos parasitos (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Beach *et al.*, 1985; Rogers *et al.*, 2002; Rogers & Bates, 2007). Alguns estudos têm sugerido que o dano celular encontrado no intestino de algumas espécies flebotomíneos infectados possa ter relação com a formação do gel (Nieves *et al.*, 2004; El Sawaf *et al.*, 2008), entretanto, não foram observadas por nós alterações no epitélio intestinal *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*.

Uma detalhada análise *in vivo* das formas de desenvolvimento do parasito durante a metaciclogênese foi realizada e todos os morfotipos de promastigotas descritos na nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990) foram observados no tubo digestivo de *L. (L.) longipalpis*. O atraso no desenvolvimento das infecções iniciadas com amastigotas axênicas também refletiu pequenas diferenças no aparecimento temporal dos morfotipos. Nas infecções iniciadas com as promastigotas, as formas procíclicas, que possuem uma alta capacidade de multiplicação e são responsáveis pelo estabelecimento inicial da infecção, se transformaram rapidamente em nectomonas, formas capazes de escapar da MP e se ancorar no epitélio intestinal, evitando dessa forma sua expulsão junto com as fezes. No segundo dia após o repasto, nectomonas representaram mais de 90% dos parasitos nas infecções iniciadas com promastigotas, enquanto nas infecções iniciadas com amastigotas axênicas a forma predominante ainda era a procíclica. Nessas infecções, somente no terceiro dia foi observado um rápido aumento das nectomonas (de 12,3% no segundo dia para 96,2% no terceiro dia) concomitantemente com o decréscimo das formas procíclicas (de 81,7% no segundo dia para 2,1% no terceiro dia). Gossage e colaboradores (2003) também observaram uma queda na porcentagem de procíclicas e um aumento das nectomonas três dias após a infecção de *L. (L.) longipalpis* com outra cepa de *L. (L.) chagasi*. Esse mesmo padrão tem sido observado em outros pares *Leishmania*/vetor do Novo Mundo (Nieves & Pimenta, 2000).

A desintegração da MP coincidiu com a diferenciação de procíclicas em nectomonas (Warburg *et al.*, 1986; Lawyer *et al.*, 1990). Alguns autores sugerem que as quitinases do parasito sejam as responsáveis por essa desintegração (Schlein *et al.* 1991), enquanto outros acreditam que os parasitos esperem pela desintegração da MP por ação de quitinases do próprio flebotomíneo (Sádlová & Volf, 2009). Segundo Rogers e colaboradores (2008), é

provável que pelo menos algumas espécies de *Leishmania* dependam das quitinasas produzidas pelo flebotomíneo para o escape. De qualquer forma, não pode ser excluída a possibilidade de que o processo de desintegração da MP seja espécie-específico (Sádlová & Volf, 2009).

Interessantemente, tem sido sugerido que a exposição à saliva (Bates & Rogers, 2004) e/ou a diminuição de hemina do bolo sanguíneo poderia desencadear a diferenciação de formas procíclicas em nectomonas. Dessa forma, após o repasto os parasitos seriam mantidos como formas procíclicas na presença de hemina. Com o decréscimo da concentração dessa substância, procíclicas se desenvolveriam em nectomonas, que migrariam para o intestino torácico, onde a saliva ingerida com a alimentação de açúcar sinalizaria uma sequência de diferenciações até o estágio metacíclico (Charlab *et al.*, 1995).

Formas haptomonas e paramastigotas apareceram em baixas proporções tanto nas infecções iniciadas com promastigotas e amastigotas axênicas. Baixas porcentagens de formas paramastigotas também já foram encontradas em *L. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) mexicana* (Walters *et al.*, 1989a; Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003) e em *L. migonei* infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Nieves & Pimenta, 2000). Especula-se que elas sejam formas degeneradas originadas das haptomonas e que sejam tipicamente encontradas no intestino anterior nos estágios mais tardios de infecção, estando ou não ligadas ao epitélio intestinal (Gossage *et al.*, 2003). Entretanto, seu papel no ciclo de vida do parasito é ainda incerto.

Trabalhos sobre a metaciclogênese utilizando infecções de *L. (L.) mexicana* em *L. (L.) longipalpis* têm proposto a criação de um novo estágio de vida do parasito (Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003). Tais autores especulam que esse novo morfotipo, denominado "leptomona" e correspondente em morfologia à haptomona descritas por Lawyer (Lawyer *et al.*, 1990), seria o precursor das metacíclicas e o responsável pela produção do PSG. Diferente desses trabalhos, que encontraram grande quantidade desses morfotipos ao longo da infecção, baixas proporções de haptomonas foram observadas por nós em *L. (L.) longipalpis*.

Como já foi dito, grande quantidade de parasitos embebidos em gel tipo PSG pôde ser observada na região da cárdia em infecções maduras. Acredita-se que a acumulação de altas concentrações do PSG na região anterior do intestino possa estimular a metaciclogênese de duas diferentes formas. Primeiro, pelo aumento das condições ácidas nessa região, já que os fPPG, principal componente do PSG (Stieholf *et al.*, 1999), são carregados negativamente e a diminuição do pH tem claramente demonstrado aumentar a metaciclogênese *in vitro* (Zakai *et al.*, 1998). Segundo, pela natureza gelatinosa do gel, que juntamente com a grande quantidade

de parasitos pode causar a depleção local de oxigênio, conhecida por estimular a metaciclogênese *in vitro* (Mendez *et al.*, 1999).

O surgimento das formas promastigotas metacíclicas foi observado a partir do quinto dia nas infecções iniciadas com promastigotas e a partir do nono naquelas iniciadas com amastigotas axênica. O aparecimento dessas formas infectantes coincidiu com a presença do baixo número de procíclicos e um alto número de nectomonas no intestino de *L. (L.) longipalpis*. Em infecções iniciadas com promastigotas cerca de 13% dos morfotipos encontrados após o nono dia de infecção eram metacíclicas. Já em infecções iniciadas com amastigotas axênicas a porcentagem foi menor; menos de 3% eram formas infectantes. O aparecimento de formas metacíclicas de *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis* após seis dias de infecção também tem sido observado por outros autores (Gossage *et al.*, 2003; Montoya-Lerma *et al.*, 2003).

De maneira geral as infecções iniciadas com promastigotas e com amastigotas axênicas demonstraram um perfil semelhante de desenvolvimento e promoveram a formação das formas infectantes. Cihaková e Volf (1997) também encontraram que o padrão de desenvolvimento de *L. (L.) major* em *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) duboscqi* em infecções iniciadas com promastigotas de cultura foi similar àquele observado por outros autores em infecções iniciadas com amastigotas (Warburg *et al.*, 1986; Killick Kendrick *et al.*, 1988; Lawyer *et al.*, 1990).

Para *L. (L.) chagasi*, a questão sobre qual é a forma capaz de originar as metacíclicas permanece sem resposta. Entretanto, é importante destacar que em espécies do Novo Mundo as metacíclicas são frequentemente encontradas em baixas porcentagens (Elnaein *et al.*, 1994; Nieves & Pimenta, 2000; Miranda *et al.*, 2008), uma característica distinta daquela observada no Velho Mundo, onde já foi relatado o aparecimento de até 66% de formas infectantes em infecções maduras (Saraiva *et al.*, 1995), sugerindo uma possível adaptação dessas espécies para a geração de alto número de metacíclicas. A influência da fonte sanguínea no desenvolvimento de *Leishmania* no vetor tem sido avaliada em espécies do Novo Mundo (Nieves & Pimenta, 2000; Miranda *et al.*, 2008). Segundo os autores, a fonte do sangue do segundo repasto pode afetar a taxa de infecção dos flebotomíneos e a densidade de parasitos por intestino. Já a proporção média de todas as formas de desenvolvimento, inclusive metacíclicas, encontrada no flebotomíneo parece não ser afetada pela fonte sanguínea. No entanto, Elnaein e colaboradores (1994) sugeriram que talvez seja necessário um segundo ou terceiro repasto sanguíneo para que altas taxas de metacíclicos sejam desenvolvidas em espécies do Novo Mundo.

Os nossos resultados apresentaram algumas diferenças temporais e quantitativas no aparecimento dos morfotipos de *Leishmania* quando comparados ao trabalho de Gossage e colaboradores (2003), que também infectaram *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi*. Tais diferenças podem ser devido ao uso de diferentes cepas de *L. (L.) chagasi* e de populações de flebotomíneos de diferentes localidades do Brasil, além da adoção de uma outra classificação morfológica.

A razão para as diferenças encontradas no desenvolvimento dos morfotipos do parasito quando comparadas diferentes espécies de *Leishmania* é desconhecida até o momento. É provável que tais diferenças reflitam adaptações de cada espécie para maximizar a possibilidade de transmissão sob condições naturais (Gossage *et al.*, 2003).

Para muitas espécies de *Leishmania*, o LPG tem sido sugerido como uma molécula de adesão que promove a interação entre o epitélio intestinal do flebotomíneo e o parasito (McConville *et al.*, 1992; Pimenta *et al.*, 1992, 1994; Sacks *et al.*, 1995; Mahoney *et al.*, 1999; Kamhawi *et al.*, 2000b; Soares *et al.*, 2002, 2004, 2010). Até o momento são conhecidos três tipos básicos de LPG: I) sem cadeias laterais (*L. (L.) donovani* do Sudão e formas procíclicas de *L. (V.) braziliensis*) (Orlandi & Turco, 1987; Thomas *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2005); II) com ligações de galactoses ou glicoses no carbono 3 da galactose presente nas repetições de dissacarídeos, que são variáveis conforme a espécie (*L. (L.) major*, *L. mexicana*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani* da Índia, *L. (L.) tropica* e formas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis*) (Ilg *et al.*, 1992; McConville *et al.*, 1990, 1992, 1995; Mahoney *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2002, 2004, 2005) e III) com a posição do carbono 2 da manose substituída com um único resíduo manose em *L. aethiopica* (McConville *et al.*, 1995).

Variações intra-específicas no LPG de *Leishmania* têm sido observadas em *L. (L.) major* (McConville *et al.*, 1995), *L. (L.) donovani* (Mahoney *et al.*, 1999) e *L. (L.) tropica* (Soares *et al.*, 2004), espécies do Velho Mundo. Entretanto, a existência de tal variabilidade não era conhecida em espécies do Novo Mundo. Previamente, foi descrito que o LPG de *L. (L.) chagasi* da cepa PP75 apresenta uma glicose nas cadeias laterais das unidades repetitivas (Soares *et al.*, 2002). No presente trabalho, nós encontramos a presença de di, tri, tetra e pentassacarídeos nas cadeias laterais na cepa BH46 de *L. (L.) chagasi* e, tanto a Eletroforese de Monossacarídeos quanto a HPLC comprovaram que os açúcares presentes nessas cadeias laterais são glicoses. Essa é a primeira descrição de variabilidade intra-específica no LPG de espécies do Novo Mundo (Figura 26).

Polimorfismos no LPG têm sido relacionados à heterogeneidade no reconhecimento de sítios expressos nas células epiteliais de diferentes espécies de flebotomíneos (Pimenta *et al.*,

1992, 1994; Mahoney *et al.*, 1999). Para *P. (P.) papatasi*, que transmite somente *L. (L.) major*, essas moléculas parecem ter especificidade para oligossacarídeos contendo galactose, e somente espécies de *Leishmania* que exibem uma abundância de cadeias laterais de galactose na superfície do LPG (no caso, *L. (L.) major*) podem manter a infecção em *P. (P.) papatasi* (Pimenta *et al.*, 1994; Butcher *et al.*, 1996). Sob esse ponto de vista, a expressão de resíduos de glicose terminal tanto nas cadeias laterais como no "cap" possibilitaria a ligação de *L. (L.) donovani* da Índia ao intestino de uma espécie simpátrica de flebotomíneo, por exemplo, *P. (E.) argentipes*. Contudo, cadeias laterais e "cap" contendo glicose não foram necessários para promover a adesão de *L. (L.) donovani* do Sudão, que na verdade depende de açúcares terminais de galactose e manose presentes no cap (Sacks *et al.*, 1995). Para *L. (L.) chagasi* PP75, Soares e colaboradores (2002) sugerem que a expressão de resíduos de glicose nas cadeias laterais seja responsável pela adesão do parasito ao intestino de *L. (L.) longipalpis*. Entretanto, estudos sobre a relação entre o polimorfismo intra-específico do LPG em *L. (L.) chagasi* e o desenvolvimento desses parasitos no seu vetor, *L. (L.) longipalpis*, ainda estão em andamento (Coelho *et al.*, não publicado).

O uso de parasitos mutantes proporciona uma excelente oportunidade para testar o papel do LPG na interação com o vetor e com o hospedeiro vertebrado. Para concluir que um gene particular ou um glicoconjugado está envolvido na virulência do parasito, o fator específico deve satisfazer o "Postulado molecular de Koch", isto é, sua ausência em uma célula deve resultar em um fenótipo avirulento/atenuado e sua restauração deve restabelecer a virulência (Falkow, 1988). A experimentação transgênica em *Leishmania* utilizou inicialmente de mutagênese e seleção de parasitos para o estabelecimento de mutantes em LPG nas espécies *L. (L.) donovani* (King & Turco 1988; Huang & Turco, 1993; McNeeley *et al.*, 1990; Descoteaux *et al.*, 1995) e *L. (L.) major* (Pimenta *et al.*, 1994; Butcher *et al.*, 1996). Dessa forma, o requerimento de LPG e de outros fosfoglicanos durante o desenvolvimento de *Leishmania* no flebotomíneo pôde ser avaliado nos pares *L. major*/ *P. (P.) papatasi* (Pimenta *et al.*, 1994; Butcher *et al.*, 1996; Sacks *et al.*, 2000) e *L. (L.) donovani* / *P. (E.) argentipes* (Pimenta *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 2000). Entretanto, a interpretação dos dados obtidos com esses mutantes pode ter sido comprometida por efeitos não específicos associados a mutações secundárias geradas durante a forte mutagênese, ou pela perda da virulência associada a um longo tempo de cultivo *in vitro* (Späth *et al.*, 2000), tal como foi observado em estudos nos quais a restauração do LPG nos mutantes promoveu o restabelecimento da síntese da molécula mas não a virulência (Ryan *et al.*, 1993; Descoteaux *et al.*, 1995). Os primeiros parasitos especificamente mutantes no gene *LPG1*, que são deficientes na produção da

galactosiltransferase envolvida na biossíntese da porção central glicana do LPG, foram gerados em *L. (L.) major* (Späth *et al.*, 2000, 2003). Esses mutantes não sintetizavam LPG, mas possuíam níveis normais dos outros glicoconjugados e de proteínas ancoradas a GPI, e tiveram sua virulência restaurada após a reintrodução do gene *LPG1*. Desde então, a importância do LPG durante o desenvolvimento de espécies de parasito do Velho Mundo no flebotomíneo tem sido avaliada apenas em infecções com mutante em *LPG1* de *L. (L.) major*, tanto em vetores naturais (Boulanger *et al.*, 2004; Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010; Secundino *et al.*, 2010) como em vetores não naturais (Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010). No Novo Mundo, este é o primeiro trabalho a avaliar o comportamento de parasitos mutantes no gene *LPG1* em seu vetor natural para estudo do papel do LPG nessa interação.

Trabalhos clássicos estabeleceram um paradigma para o papel do LPG na sobrevivência de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* em seus vetores, mediada pela adesão do LPG ao intestino do flebotomíneo (Pimenta *et al.*, 1994; Sacks *et al.* 2000). No caso de *L. (L.) major*, galectinas do epitélio intestinal de *P. (P.) papatasi*, denominadas PpGalec, foram reconhecidas como mediadoras dessa interação (Kamhawi *et al.*, 2004). Entretanto, em 2007 estudos demonstraram a sobrevivência de parasitos independentemente de LPG em vetores experimentalmente "permissivos". Assim, os prévios estudos sobre a dependência do LPG para o desenvolvimento do parasito no flebotomíneo foram associados a espécies "seletivas", novamente pela observação em testes experimentais que essas espécies suportam o desenvolvimento de um limitado número de espécies ou cepas de *Leishmania* (Myskova *et al.*, 2007).

Assim como relatado previamente para *P. (P.) papatasi* (Sacks *et al.*, 2000; Myskova *et al.*, 2007) e *P. (P.) duboscqi* (Boulanger *et al.*, 2004; Svárovská *et al.*, 2010; Secundino *et al.*, 2010) infectados com *L. (L.) major* mutantes em *LPG1*, *L. (L.) chagasi* LPG1KO foi incapaz de persistir no intestino de seu vetor natural, *L. (L.) longipalpis*, após a liberação do bolo fecal. A inabilidade de esses mutantes persistirem no intestino durante a excreção foi correlacionada ao papel do LPG em mediar a adesão dos parasitos ao epitélio intestinal (Pimenta *et al.*, 2002, 2004; Kamhawi *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2002, 2010). Entretanto, diferente do que acontece em *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) duboscqi*, nos quais o LPG não é requerido nas fases iniciais do desenvolvimento de *L. (L.) major* (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004; Svárovská *et al.*, 2010; Secundino *et al.*, 2010), nós observamos uma grande redução na sobrevivência ou crescimento de *L. (L.) chagasi* LPG1KO no período que antecede a defecação, sendo que nas primeiras 60 horas ocorreu a perda total da infecção.

Esse fenótipo é muito semelhante àquele apresentado por mutantes em *LPG2* (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004; Svárovská *et al.*, 2010; Secundino *et al.*, 2010), que são deficientes na produção de todas as moléculas que contêm fosfoglicanos e têm o seu desenvolvimento e crescimento severamente reduzido nas fases iniciais da infecção no vetor.

Baseados na idéia que a adição de inibidor de tripsina ao sangue poder reduzir a atividade proteolítica e promover a sobrevivência de *L. (L.) donovani* em *P. (P.) papatasi* (Borovsky & Schlein, 1987), nós utilizamos esse inibidor nas alimentações de *L. (L.) longipalpis* com *L. (L.) chagasi* WT e *LPG1KO*. Apesar da presença do inibidor ter causado um aumento significativo no número médio de *L. (L.) chagasi* *LPG1KO* nos intestino nas primeiras 48 horas de infecção, após três dias não foram mais encontrados parasitos viáveis. Nos ensaios *in vitro*, promastigotas de *L. (L.) chagasi* *LPG1KO* também demonstraram grande mortalidade quando expostos a lisados de um simples intestino. Novamente, a adição de inibidor de tripsina mostrou redução parcial da mortalidade. Esses dados sugerem que, adicional à tripsina, outras proteases presentes durante o processo digestivo estejam envolvidas na mortalidade desses mutantes. Explorando o desenvolvimento de *L. (L.) chagasi* em *P. (P.) dubosqi*, que é vetor somente de *L. (L.) major*, nós também observamos grande mortalidade de promastigotas *LPG1KO* nos períodos iniciais de desenvolvimento, enquanto promastigotas WT somente foram perdidas com a excreção. Esses dados reforçam a hipótese da ação letal das enzimas digestivas sobre os mutantes de *L. (L.) chagasi*.

Recentemente, Svárovská e colaboradores (2010) não encontraram diferença significativa no crescimento nas linhagens selvagem, mutantes em *LPG1* e mutante em *LPG2* de *L. (L.) major* em presença de tripsina bovina. Entretanto, baseados nos resultados prévios de Secundino e colaboradores (2010), que demonstram que a inibição de tripsina e de outras proteases do intestino de *P. dubosqi* pode aumentar a sobrevivência de mutantes em *LPG2* de *L. (L.) major*, os autores sugeriram a possibilidade da tripsina bovina não ser um bom modelo para avaliar a atividade e/ou propriedades de todo o conteúdo proteolítico do intestino do flebotomíneo.

A forma como a presença do LPG pode conferir proteção aos parasitos contra as proteases do intestino do vetor no par *L. (L.) chagasi* / *L. (L.) longipalpis* ainda não é clara. A inibição da atividade de proteases em intestino de flebotomíneos infectados com *Leishmania*, já descrita por outros autores (Schlein & Romano, 1986; Borovsky & Schlein, 1987; Dillon & Lane, 1993a; Ramalho-Ortigão *et al.*, 2007; Jochim *et al.*, 2008), pode ter sido produzida, no caso de *L. (L.) chagasi*, pela presença do LPG. Entretanto, variações nos níveis de proteases no intestino de *L. (L.) longipalpis* durante a infecção com *L. (L.) chagasi* WT não foram

medidas no presente trabalho. Outra possibilidade é que o LPG, juntamente com os outros glicoconjugados de superfície de *Leishmania*, forme uma densa camada de proteção contra o ataque enzimático sofrido pelo parasito.

O fato de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* deficientes na produção de LPG sobreviverem em seus vetores naturais quando o bolo sanguíneo ainda está presente (Sacks *et al.*, 2000; Boulanger *et al.*, 2004; Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010; Secundino *et al.*, 2010), não reduzem necessariamente a contribuição do LPG na resistência a morte inicial dos parasitos no intestino, visto que, em alguns casos, tem sido observada uma modesta redução na sobrevivência desses mutantes nesse período inicial de infecção (Sacks *et al.*, 2000; Myskova *et al.*, 2007; Secundino *et al.*, 2010). Além disso, em experimentos *in vitro*, Secundino e colaboradores (2010) observaram que a adição de PGs derivados de LPGs conferiu a *L. (L.) major* mutantes em *LPG2* alguma resistência a morte pelas proteases de lisados de intestino de *P. (P.) duboscqi*.

A ausência do receptor PpGalec para todas as outras espécies de flebotomíneos vetores examinadas até o momento (Kamhawi *et al.*, 2004) retoma as discussões sobre quais seriam os sítios de ligação dos parasitos nesses insetos. É importante considerar a natureza dos receptores expressos por vetores naturais de parasitos que possuem unidades repetitivas de LPG não substituídas ou pouco substituídas, como por exemplo, *L. (L.) donovani* (Sacks *et al.*, 1995) e *L. (L.) chagasi* (Soares *et al.*, 2002), que se desenvolvem em *P. (E.) argentipes* e *L. (L.) longipalpis*, respectivamente. Interessantemente, como já foi dito, esses flebotomíneos parecem comportar-se como vetores "permissivos" em estudos de laboratório. Investigações sobre a importância do LPG em vetores experimentalmente "permissivos" têm demonstrado que *L. (L.) major* mutantes em *LPG1* permanecem capazes de se desenvolver nos vetores "permissivos" *P. (E.) argentipes* (Svárovská *et al.*, 2010), *P. (Larrousius) perniciosus* (Svárovská *et al.*, 2010), *P. (A.) arabicus* (Myskova *et al.*, 2007) e *L. (L.) longipalpis* (Myskova *et al.*, 2007; Secundino *et al.*, 2010) e sugerem que, nesses casos, o LPG não seja requerido para a proteção do parasito contra as enzimas digestivas nem para a adesão ao intestino. Com base nesses resultados, tem sido sugerido que o desenvolvimento de *Leishmania* em vetores experimentalmente "permissivos" seja independente de LPG (Myskova *et al.*, 2007; Svárovská *et al.*, 2010) e que glicoproteínas contendo N-acetil galactosamina (GalNAc) estejam envolvidas no mecanismo de adesão (Evangelista & Leite, 2002; Myskova *et al.*, 2007). Essa hipótese é corroborada pelo fato dessas glicoproteínas ligarem-se especificamente a superfície de promastigotas de *Leishmania* e por epítomos contendo GalNAc demonstrarem localização específica nas bordas das microvilosidades do

intestino, localização requerida para adesão dos parasitos no flebotomíneo.

A identificação de uma interação conservada parasito-ligante GalNAc fornece um perspectiva útil para o sucesso da adaptação de *Leishmania* em outros flebotomíneos além daqueles específicos, provavelmente como resultado da ação de atividades humanas. Segundo Myskova e colaboradores (2007), esse poderia ser o caso da introdução de *L. (L.) infantum* do Mediterrâneo para a América Latina. Na Europa, esse parasito é transmitido para cães e humanos por *P. (L.) perniciosus* (Killick-Kendrick, 1999), uma espécie que apresenta glicanos contendo GalNAc em seu intestino (Myskova *et al.*, 2007) e por outras espécies do gênero *Larrousius* (Killick-Kendrick, 1999). Na América Latina, o parasito teria sido capaz de se desenvolver no flebotomíneo "permissivo" *L. (L.) longipalpis*, que também apresenta esses glicanos contendo GalNAc em seu intestino (Myskova *et al.*, 2007). Entretanto, a idéia do desenvolvimento independente de LPG não pode ser generalizada para todos os insetos considerados vetores "permissivos". Prévios estudos demonstraram que *L. (L.) donovani* mutante em LPG foram incapazes de sobreviver dentro de *P. (E.) argentipes* (Pimenta *et al.*, 1994), um vetor considerado permissivo e que apresenta a expressão de GalNAc no intestino.

Embora o papel do LPG na proteção de *L. (L.) chagasi* frente o ambiente hidrolítico do intestino seja claro, nossos resultados não permitiram determinar se o desenvolvimento de infecções tardias de *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis* é dependente ou não da adesão dos parasitos no epitélio via LPG, já que os parasitos mutantes em *LPG1* não sobreviveram até o momento em que é necessária a adesão. Não podem ser descartadas as hipóteses que outros ligantes estejam envolvidos nessa interação ou que os grumos formados pelos parasitos e o gel consigam permanecer no intestino após a defecação sem a necessidade de ligação às microvilosidades. Além disso, tem sido identificado um neuropeptídeo mioinibidor secretado por *L. (L.) major* que é capaz de inibir o peristaltismo do intestino médio e posterior de *P. (P.) papatasi*, tornando o flebotomíneo menos eficiente em expelir os parasitos, aumentando suas chances de persistir no intestino (Vaidyanatham, 2004, 2005).

6 CONCLUSÕES

- O protocolo utilizado foi eficiente para transformação *in vitro* de promastigotas em amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* BH46.
- *Lutzomyia longipalpis* infectados com formas promastigotas ou amastigotas axênicas de *L. (L.) chagasi* produziram altas porcentagens de infecção, perfil semelhante de desenvolvimento dos parasitos e diferenciação de formas infectantes.
- Formas promastigotas podem ser preferencialmente utilizadas em experimentos de infecção experimental devido à facilidade de obtenção e manipulação das mesmas.
- Diferente da adesão altamente especializada previamente proposta para *L. (L.) chagasi* em *L. (L.) longipalpis* (Walters *et al.*, 1989a), poucos parasitos foram observados com corpo e flagelo em contato com o epitélio intestinal e, esporadicamente, com o flagelo superficialmente inserido entre as microvilosidades.
- A análise da composição de açúcar das cadeias laterais do LPG da cepa BH46 revelou pela primeira vez a presença de um LPG poliglicosilado (1, 2 e 3 cadeias laterais de glicose) em *L. (L.) chagasi*.
- A síntese de LPG foi essencial para a sobrevivência inicial de *L. (L.) chagasi* no intestino de *L. (L.) longipalpis*, provavelmente protegendo os parasitos do ataque enzimático.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu NA, Andrade-Coelho CA, Vigoder FM, Ward RD, Peixoto AA. Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(2):216-9.
- Adler S. Factors determining the behavior of *Leishmania* sp. in sandflies. Harefuah 1938; 14:1-6.
- Adler S. *Leishmania*. Adv Parasitol 1964; 2: 35-91.
- Adler S, Theodor O. The behavior of cultures of *Leishmania tropica*, *L. infantum* and *L. braziliensis* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. Nature (Lond) 1927; 119: 48-9.
- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 2003; 17:1-18.
- Andrade-Coelho C, Santos-Mallet J, Souza NA, Lins U, Meirelles MNL, Rangel EF. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(8):1141-51.
- Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW, Githure JI, Olobo JO, Robert LL, et al. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. Acta Trop 1995; 60:97-100.
- Araki AS, Vigoner FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza NA, Araújo IB. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(1):e365.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol 1996; 14:523-32.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30:1269-81.

Azevedo AC, Monteiro FA, Cabelo PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG, Rangel EF. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:305-22.

Balanco JMF, Pral EMF, da Silva S, Bijovsky AT, Mortara RA, Alfieri SD. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. Parasitology 1998; 116:103-13.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64:1-109.

Barak E, Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N, Zilberstein D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analyses of signal perception and response. Mol Biochem Parasitol 2005; 141:99-108.

Barros VA, Oliveira JS, Melo MN, Gontijo NF. *Leishmania amazonensis*: Chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. Exp Parasitol 2006; 112:152-7.

Bates PA. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. Parasitol Today 1993; 9:143-6.

Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol 2008; 11:1-5.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med 2004; 4:601-9.

Bates A, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. Parasitology (Lond.) 1992; 105:193-202.

Bauzer LGSR, Souza NA, Maingon RDC, Peixoto AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(1):1-12.

- 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.
- Beattie L, Evans KJ, Kayer PM, Smith DF. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunol* 2008; 30:255-66.
- 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.
- Berman J. Visceral Leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res* 2006; 123:289-94.
- Besteiro S, Eilliams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007; 37:1063-75.
- Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop* 2003; 88:109-16.
- 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.
- Bottechia M, Oliveira SG, Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, et al. Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *J Mol Evol* 2004; 58:754-61.
- Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, et al. Characterization of a defensin from the sandfly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004; 72:7140-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose. Brasília. MS, 2008. Disponível em: http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_lv_por_100000_hab_br_gr_uf_1990_2008.pdf. Acesso em: 10 jan. 2010.

Brazil RP, Oliveira MO. Parthenogenesis in the sand fly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). Med Vet Entomol 1999; 13:463-4.

Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PFP, Panunzio M, Sacks DL. Deficiency in β 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sandfly interaction. J Biol Chem 1996; 271:20573-9.

Cavalcanti RR, Pereira MH, Freitas JM, Gontijo NF. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 85-7.

Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CHN. Factors associated to the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecologic study in Teresina, Brazil. Cad. saúde pública 2009; 25: 1543-51.

Chaniots BN. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J Med Entomol 1974; 11:73-9.

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? TDR (WHO/TDR). Nat Rev Microbiol 2007; 5:S7-S16.

Charest H, Matlashewski G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage specific gene. Mol Cell Biol 1994; 14(5):2975-84.

Charlab R, Ribeiro M. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. Am J Trop Med Hyg 1993; 48:831-8.

- Charlab R, Tesh RB, Rowton ED, Ribeiro JMC. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary glands homogenates of sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Exp Parasitol 1995; 80:167-75.
- Ciáková J, Volf P. Development of different *Leishmania major* strains in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. Ann Trop Med Parasitol 1997; 91(3):267-79.
- Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, War JM, et al. Sand Fly salivary proteins induce strong cellular immunity un a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. PLOS Pathog 2009; 5(5): e1000441.
- Costa CHN, Tapety, CMM, Werneck, GL. Controle da Leishmaniose visceral em meio urbano: estudo da intervenção randomizado fatorial. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(4):415-9.
- Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ, Ramalho-Ortigão M. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. Parasit Vectors 2008; 1:16.
- Croft LM, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 119(1):111-26.
- Cunha AM. Experimental infections in American Visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1938; 33:581-616.
- 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.
- Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. Science 2001; 292:285-7.

- Cuvillier A, Miranda LC, Ambit A, Barral A, Merlin G. Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol* 2003; 5:717-28.
- Daba S, Mansour NS, Youssef F, Shanbaky NM, Shehata M, El Sawaf BM. Vector-host-parasite inter-relationships in Leishmaniasis. II. Influence of blood meal from natural vertebrate hosts with or without *Leishmania infantum* and *L. major* on the proteolytic activity in the gut of *Phlebotomus langeroni*. *J Egypt Soc Parasitol*, 1997; 27:639-49.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of Epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48(3):151-6.
- Darling TN, Blum JJ. *In vitro* reversible transformation of *Leishmania braziliensis panamensis* between promastigote and ellipsoidal forms. *J Protozool* 1987; 34(2):166-8.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003; 326: 377-82.
- Deane, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Social de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1956; 162p.
- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose Visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 1955; 47:113-29.
- Debrabant A, Joshhi MB, Pimenta PFP, Mwyer DM. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int J Parasitol* 2004; 34:205-17.
- Descoteaux A, Turco JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 341-52.
- Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ, Beverley SM. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 1995; 269: 1869-72.

Descoteaux A, Mengeling BJ, Beverley SM, Turco SJ. *Leishmania donovani* has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 94:27-40.

Desjeux P. The increase in risk factors for the leishmaniasis. Worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-43.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.

Dias Costa J, Soares R, Finkelstein LC, Côrte-Real S, Meirelles MN, Porrozi R. Fast high yield of pure *Leishmania (Leishmania) infantum* axenic amastigotes and their infectivity to mouse macrophages. *Parasitol Res* 2009; 105:227-36.

Dias-Sversutti AC, Scodro RBL, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the State of Paraná, South Brazil. *Neotrop Entomol* 2007; 36(6):953-9.

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

Dillon RJ, Lane RP. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med Vet Entomol* 1993b; 7: 225-32.

Dillon RJ, Lane RP. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding protein in the gut of the sandfly vector. *Parasitology* 1999; 118:27-32.

Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail Ma, Rogers ME et al. Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* 2006; 88:831-40.

Dobson DE, Scholtes LP, Valdez KE, Sullivan DR, Mengelin BJ, Cilmi S, Turco SJ, Beverley SM. Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required for species-

specific modifications of the lipophosphoglycan adhesion controlling *Leishmania major*-sandfly interactions. J Biol Chem. 2003; 278:15523-31.

Donnelly KB, Lima CL, Tutus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sandfly vector salivary gland lysate. J Parasitol 1998; 84:97-103.

Doyle PS, Engel JC, Pimenta PFP, Da Silva PP, Dwyer DM. *Leishmania donovani* long term culture of axenic amastigotes at 37°C. Exp Parasitol 1991; 73:326-34.

Drahota J, Lipoldová M, Volf P, Rohousová I. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. Parasite Immunol 2009; 31: 766-70.

El Sawaf BM, Doha SA, Kamel KE, Emam M. Attachment of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* in the midgut of their respective sandfly vectors *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). J Egypt Soc Parasitol 2008; 38(3):833-42.

Elnaein DA, Ward RD, Young PE. An ultra-structural study on the early development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Parasitol Res 1994; 80:414-9.

Evangelista LG, Leite AC. Histochemical localization of N-acetyl-galactosamine in the midgut *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 2002; 39:432-9.

Falkow S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev Infect Dis 1988; 10(Suppl 2):S274-6.

Feng LV. The role of the peritrophic membrane in *Leishmania* and trypanosome infection of sandflies. Pek Nat His Bull 1951; 19:327-34.

Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in as endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol 1997; 34:719-28.

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Vieira EP, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111:161-73.

Gemetchu T. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol* 1974; 68(1): 111-24.

Ghedin E, Zhang WW, Charest H, Sundar S, Kenney RT, Matlashewski G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis, *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4:530-5.

Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:7845-50.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7:338-49.

Gontijo NF, Almeida-Silva S, Costa FF, Mares-Guia ML, Williams P, Melo MN. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive, Glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* Development. *Exp Parasitol* 1998; 90:212-9.

González R, Sousa L, Devera R, Jorquera A, Ledezma E. Seasonal and nocturnal domiciliary landing/biting behaviour of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *evansi* and *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *panamensis* (Diptera, Psychodidae) in a periurban area of city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoátegui State). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 361-4.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1027-34.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35:1169-80.

Gramiccia M, Smith DF, Angelici MC, Ready PD, Gradoni L. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology* 1992; 105:29-34.

Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigote of *Leishmania*. *Trends Parasitol* 2001; 17(3):150-3.

Gupta N, Goyal N, Singha UK, Blakuni V, Roy R, Rastogi AK. Characterization of intracellular metabolites of axenic amastigotes of *Leishmania donovani* by ¹H NMR spectroscopy. *Acta Trop* 1999; 73:121-33.

Habibi P, Sadjjadi SM, Owji M, Moattari A, Sarkari B, Naghibalhosseini F, et al. Characterization of *in vitro* cultivated amastigote like of *Leishmania major*: a substitution for *in vivo* studies. *Iranian J Parasitol* 2008; 1:6-15.

Hajmova M, Chang KP, Kolli B, Volf P. Downregulation of GP63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microbes Infect* 2004; 6:646-9.

Hamilton JGC, Maingon R, Alexander B, Ward R, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol* 2005; 19:480-8.

Handman E, Greenblatt CL, Goding JW. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*. Characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J* 1984; 3:2301-6.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; 354:1191-9.

Hodgkinson VH, Soong L, Duboise M, McMahon-Pratt D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp Parasitol* 1996; 83:94-105.

- Huang C, Turco SJ. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. J Biol Chem 1993; 268(15):24060-6.
- Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, et al. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. J Biol Chem 1992; 267:6834-40.
- Ilg T, Handman E, Stierhof YD. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Biochem Soc Trans 1999; 27:518-25.
- Ilg T. Proteophosphoglycan of *Leishmania*. Parasitol Today 2000; 16(11):489-97.
- Ismaeel AY, Garmson JC, Molyneux DH, Bates PA. Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* *in vitro* and in *Lutzomyia longipalpis*. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(3): 421-5.
- Jacobson RL, Schlein Y. *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express alpha-amylase e alpha-glucosidase. Acta Trop 2001; 78:41-9.
- Jobling B. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher; 1987, 119p.
- Johnson PT. Autogeny in Panamanian *Phlebotomus* sandflies (Diptera:Psychodidae). Ann Ent Soc Amer 1961; 54:116-8.
- Joshi MB, Rogers ME, Shakarian AM, Yamage M, Al-Harthi SA, Bates PA, Dwyer DM. Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of *LmexCht1*: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. J Biol Chem 2005; 280:3847-61.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion of *Leishmania major* identifies leishmanolysin (gp63) as a virulence factor. Mol Biochem Parasitol 2002; 120:33-40.

- Joshi PB, Sacks DL, Modi G, McMaster WR. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol Microbiol* 1998; 27:519-30.
- Jochim RC, Teixeira CR, Laughinnghouse A, Mu J, Oliveira F, Gomes RB, et al. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies. *BCM Genomics* 2008; 9:15.
- 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.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22 (9): 439-45.
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Roeton E, Sacks D. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 2000a; 290:1351-4.
- Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PFP, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 2000b; 121:25-33.
- Kamhawi S, Ortigão MR, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A Role for Insect Galectins in Parasite. *Cell* 2004; 119(3): 329-41.
- Killick-Kendrick R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: W.H.R. Lumsden WHR and Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. Volume 2. Academic Press, London, New York & San Francisco; 1979. p. 396-449.
- Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exotic Filiales* 1985; 78:747-55.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: 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.

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 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 RR, Molyneux DH, Ashford RW. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. Trans R Soc Trop Med Hyg 1974a; 68:269-76

Killick-Kendrick R R, Molyneux DH, Ashford RW. *Leishmania* in phlebotominae sandflies. 1. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. Proc R Soc Lond B Biol 1974b; 187:409-19.

Killick-Kendrick R, Wallbanks KR, Molyneux DH, Lavin DR. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. Parasitol Res 1988; 774: 586-90.

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.

King DL, Turco SJ. A ricin agglutinin-resistant clone of *Leishmania donovani* deficient in lipophosphoglycan. Mol Biochem Parasitol 1988; 28:285-93.

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. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Ann Parasitol Hum Comp 1988; 63(2):134-45.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Nature 1977; 266:628-30.

Lanzaro GC, Warburg A. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. Parasitol Today 1995; 11:151-4.

Lanzaro GC, Lopes AH, Ribeiro JM, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M, Titus RG. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis*. Insect Mol Biol 1999; 8:267-75.

Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 839-47.

Laurenti MD, da Matta LR, Pernichelli, T, Secundino NFC, Pinto LC, Corbett CEP, Pimenta PF. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. Scand J Immunol 2009b; 70: 389-95.

Laurenti MD, Silveira VMS, Secundino NFC, Corbett CEP, Pimenta PF. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol Int 2009a; 58(3):220-6.

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.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. Mol Biochem Parasitol 2007; 152:35-46.

Li Q, Shao Y, Ni B, Yao C, Zhou Y, Xu W, Wang Z. Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analyses of gene expression. Parasitol Res 2008; 103(4):821-8.

Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. Clin Immunol 2005; 114: 256-65.

Lukes J, Mauricio IL, Schönián 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.

Lynn MA, McMaster WR *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. Research focus. Trends Parasitol 2008; 24(3): 103-5.

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco S. Intra-Species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry 1999; 38: 9813-23.

Mangabeiras O. Sobre a sistemática e biologia do *Phlebotomus* no Ceará. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1969; 21:3-26.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16:188-98.

- McConville MJ, Ferguson MAJ. The structure, biosynthesis and function of glycolysate phosphatidylinositol in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* 1993; 294:305-24.
- McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol* 2007; 37:1047-51.
- McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* 1995; 310:807-18.
- 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.
- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 1992; 11:3593-600.
- McNeelly TB, Tolson DL, Pearson TW, Turco SJ. Characterization of *Leishmania donovani* variant clones using anti-lipophosphoglycan monoclonal antibodies. *Glycobiology* 1990; 1:63-9.
- Mendez S, Fernandez-Perez FJ, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez-Munoz MT, Alunda JM. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol Res* 1999; 507-9.
- Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara-Silva FO, Loureiro AMF, Fortes-Dias C et al. *Phlebotominae* distribution in Janaúba, an area transmission for leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 56-61.
- Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Santos SL, Barata RB, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotominae sand flies. *Vet Parasitol* 2007; 147:67-76.

- Miranda JC, Secundino NFC, Nieves E, Souza APA, Bahia-Nascimento AC, Prates DB, et al. Studies of the influence of the presence of domestic animals on increasing the transmission probabilities of Leishmaniasis. *Anns Med Entomol (Bhopal, Índia)* 2008; 17: 9-15.
- Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(4):365-8.
- Molyneux DH, Killick-Kendrick R, Ashford RW. *Leishmania* in Phlebotominae sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B* 1975; 190:341-57.
- Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedi M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 2003; 85:19-29.
- Moodi F, Handman E. The structure of *L. major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1993; 268(25): 18457-66.
- Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 2008; 8:350-63.
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 2001; 167:5226-30.
- Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49(1):68-75.

- Mukhopadhyay J, Ghosh K. Vector potential of *Phlebotomus duboscqi* and *P. papatasi*: a comparison of feeding behavior, reproductive capacity and experimental infection with *Leishmania major*. Ann Trop Med Parasitol 1999; 93:309-18.
- Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Host feeding preferences of sandflies in rural area, Southern Brazil. Rev Saude Publica 2006; 40(6):1087-93.
- Myskova J, Svobodova M, Beverley SM; Volf P. A lipophosphoglycan independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect 2007; 9(3): 317-24.
- Naderer T, McConville, MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 2008; 10(2):301-8.
- Nascimento M, Abourjeily N, Ghost A, Zhang WW, Matlashwsky G. Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene in *Leishmania*: effect on differentiation. Mol Microbiol 2003; 50(5):1517-26.
- Nasereddin A, Schweynoch C, Schonian G, Jaffe CL. Characterization of *Leishmania (Leishmania) tropica* axenic amastigotes. Acta Trop 2010; 113:72-9.
- Nery LCR, Lorosa E S, Franco AMR. Feeding Preference of the Sand Flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an Urban Forest Patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(6): 571-4.
- Nicolle C. Sur trois cas d'infection splénique infantile a corps de Leishman observees 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: Psycodidae). J Med Entomol 2000; 37(1): 134-40.
- Nieves E, Pimenta PFP. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg 2002; 67(6): 640-7.

Nieves E, Delsy Dávila V, Palacios-Pru E. Daño ultraestructural del intestino medio abdominal de *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychocidae) ocasionado por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Parasitol Latinoam 2004; 59: 115-22.

Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* Infection by modulating Interleukin-10 production. Infect Immun 2004; 1240-7.

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 FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil EP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2005; 129:219-27.

Oppeerdoes FR, Coombs GH. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. Trends Parasitol 2007; 23(4):149-58.

Orlandi PA, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J Biol Chem 1987; 262:10384-91.

Pan AA, Duboise SM, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, Traub-Cseko Y, et al. Developmental life cycle of *Leishmania*: cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotas. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:213-23.

Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petreskim Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Loren M, Lemos FJA. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. Ins Biochem Mol Biol 2002; 32:517-23.

Peters NS, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kiling N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals as essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 2008; 321:970-4.

Petts SL, Tang Y, Ward RD. Nectar from a wax plant, *Hoya sp.*, as a carbohydrate source for *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Ann trop med parasitol* 1997; 91:443-6.

Pimenta PFP, de Souza W. Fine structure and cytochemistry of endoplasmatic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Submicrosc Cytol* 1985; 17:413-9.

Pimenta PFP, de Souza W. Structural observations on the attachment of promastigotes of the *Leishmania mexicana amazonensis* to the surface of macrophages. *Microsc Eletron Biol Celular* 1986; 10:65-75.

Pimenta PFP, da Silva RP, Sacks DL, Pinto da Silva P. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania* major as revealed by fracture flip: A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stages promastigotes. *Eur J Cell Biol* 1989; 48:180-90.

Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology* 1997; 115:359-69.

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.

Pimenta PFP, Turco SJ, McConville M, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. *Science* 1992; 256: 1812-5.

Pitaluga NA, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias, Dádila AMR, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Américas. *Mol Genet Genomics* 2009; 282(3):307-17.

- Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008; 107:66-9.
- Queiróz Balbino V, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, Andrade PP, Castro JA, et al. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Trop* 2006; 98:15-24.
- Quinnel RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol* 1992; 6(3):195-200.
- Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko ZM. Molecular characterization of L1chit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003; 33:279-87.
- Ramalho-Ortigão JM, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM, et al. Characterization of an activated chitinolytic system in the midgut of the sandfly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol* 2005; 14(6):703-12.
- Ramalho-Ortigão JM, Kamhawi S, Rowton ES, Ribeiro JMC, Valenzuela JG. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003; 33: 163-71.
- Ramalho-Ortigão MR, Jochin RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BCM Genomics* 2007; 8:300.
- 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 JM. Vector salivation and parasite transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82:1-3.

Ribeiro JM, Katz O, Panell LK, Waitumbi J, Warburg A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. J Exp Biol 1999; 202:1551-9.

Ribeiro JM, Modi GB, Tesh RB. Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies. Insect Biochem 1989; 19:409-12.

Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Comp Biochem Physiol 1986; 83:683-6.

Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate on human primary *in vitro* immune responses. Parasite Immunol 2003; 25:127-34.

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.

Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Mwyer DM, Volf P, et al. *Leishmania* chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cell Microbiol 2008; 10:1363-72.

Rogers ME, Kropf P, Choi B, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycan regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophage to promote parasite survival. PLoS Pathog 2009; 5(8):1-14.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Brit Med J 1903; 2:1261-2.

Rudin W, Hecker H. Funcional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. Tissue Cell 1982; 14(4):751-8.

Ryan KA, Garraway LA, Descoteaux A, Turco SJ, Beverley SM. Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:8609-13.

Ryan L, Silveira FT, Shaw JJ. Leishmanial infections in *Lu. longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78:547-8.

Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, et al. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigote of *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol 1998; 95:9-20.

Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol 1989; 69:100-3.

Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. Annu Rev Microbiol 2001; 55:453-83.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 1984; 223:1417-1419.

Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. Am J Trop Med Hyg 1985; 34: 456-9.

Sacks DL, Crodin TN, Turco SJ. Developmental modifications of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol 1990; 42:225-33.

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, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotas. J Immunol 1985; 135(1):564-9.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco SJ, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:406-11.

Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformation changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J Exp Med 1995; 181:685-97.

Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PFP. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. Parasitology 1994; 108:S55:62.

Sádlová J, Volf P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell Tissue Res 2009; 337(2):313-25.

Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998; 12:315-7.

Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* on *Phlebotomus papatasi*. Parasitology 1995; 111(Pt3):275-87.

Schlein Y. Sandfly diet and *Leishmania*. Parasitol Today 1986; 2(6):175-7.

Schlein Y, Jacobson RL. Haemoglobin inhibits the developmental of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. Parasitology (Lond.) 1994; 109:23-8.

Schlein Y, Jacobson RL. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. Parasitology (Lond.) 1998; 117:467-73.

Schlein Y, Romano H. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). Exp Parasitol 1986; 62:376-80.

Schlein Y, Warburg A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J Med Entomol 1986; 23(1):11-5.

Schlein Y, Jacobson RL, Schlomai J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proc R Soc Lond (Biol) 1991; 245:121-6.

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, Schnur LF, Jacobson RL. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990; 84:353-5.

Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta, PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. J Med Entomol 2005; 42:928-38.

Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Berveley SM, et al. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. Cel Microbiol 2010; Accepted article online: doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01439.x.

Shakarian AM, Dwyer DM. The *Ld Cht1* gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. Gene 1998; 208:315-22.

Shakarian AM, Dwyer DM. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases with are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol* 2000; 94:238-42.

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distributions, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 255-72.

Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Rec* 2000; 147:421-2.

Soares RPPS, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75(3): 301-30.

Soares RPP, Barron T, McCoy-Sumamndle K, Svobodova M, Warburg A, Turco S. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol* 2004; 107:105-14.

Soares RPP, Cardoso TL Barron T, Araújo MSS, Pimenta PFP, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol* 2005; 35:245-53.

Soares RPP, Margonari C, Secundino NFC, Macedo ME, Costa SM, Rangel EF, et al. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol* 2010; 439174.

Soares RPP; Macedo ME Ropert C; Gontijo NF; Almeida IC; Gazzinelli RT; Pimenta PFP; Turco SJ. *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121:213-24.

Somanna A, Vasanthakrishna M, Gedamu L. *In vitro* cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. *Acta Trop* 2002; 83:37-42.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Peixoto AA, Rangel EF. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area

of American Cutaneous Leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. J Med Entomol 2005; 42(6): 986-92.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Silva VC, Ward RD, Peixoto AA. Life cycle differences among Brazilian sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* sibling species complex. Med Vet Entomol 2009; 23: 287-92.

Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. J Med Entomol 2004; 41:906-13.

Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CO, Peixoto AA. Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96:102-3.

Späth GF, Epsteins L, Leader B, Singer SM, Avila H, Turco SJ, et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(16): 9258-63.

Späth GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. Science 2003; 301:1241-3.

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.

Sudia WD, Chamberlain RW. Battery-operated light trap, an improved model. Mosq News 1962; 22: 126-9.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health 2001; 6(11):849-54.

- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis 2000; 31:1104-7.
- Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley S, Volf P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (*lpg2*) but not lipophosphoglycan (*lpg1*) for survival in permissive sand fly vectors. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(1): e580.
- Svobodova M, Volf P, Killick-Kendrick R. Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. Ann Trop Med Parasitol 1996; 90:329-36.
- Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes Rb, Santos CS, Andrade BB. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. J Immunol 2005; 175:8346-53.
- Telleria LT, Pitaluga NA, Ortigão-Faria JR, Araújo APO, Ramalho-Ortigão LM, Traub-Cseko Y. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. Arch Insect Biochem Physiol 2007; 66:53-63.
- Terra WR. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch Insect Biochem Physiol 2001; 47:47-61.
- Tesh RH, Chaniotis BN, Aranson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. Am J Trop Med Hyg 1971; 20:150-6.
- Theodos CM, Titus RG. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has a inhibitory effect on macrophage function in vitro. Parasite Immunol 1993; 15:481-7.
- Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect on sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infect Immun 1991; 59:1592-8.

Thiakaki M, Rohousova I, Volfová V, Volf P, Chang KP, Soteriadou K. Sand fly species-specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-Balb/c mouse model. *Microbes Infect* 2005; 7:760-6.

Thomas R, McConville M J, Thomas-Oates J E, Homans SW, Ferguson MAJ, Gorin PAJ, et al. Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 1992; 267, 6829-33.

Titus R, Mbow M. The vasodilator of *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary glands exacerbates infection with *Leishmania major* in mice. *FASEB J*, 1999; 13(Pt 2, Suppl S):A970.

Titus RG, Ribeiro J. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988; 239:1306-8.

Titus R, Ribeiro J. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today* 1990; 6:157-60.

Turco SJ. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW, editors. *Molecular Medical Parasitology*. California: Academic Press; 2003. p.225-40.

Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46:65-94.

Uribe S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(6): 729-34.

Vaidyanatham R. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contraction in hemimetabolous and holometabolous insects. *J Invertebr Pathol* 2004; 87:123-8.

Vaidyanatham R. Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sandfly *Phlebotomus*

papatasi (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 2005; 42:142-52.

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.

Volf P, Kiewgová A, Svobodová, M. Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. Med Vet Entomol 1998; 12:151-4.

Volf P, Skarupová S, Man P. Characterization of the lectin from female of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. Eur J Biochem 2002; 269:6294-301.

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.

Waitumbi J, Warburg A. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxid production by murine macrophages. Infect Immun 1998; 66:1534-7.

Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:196-206.

Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. Am J Trop Med Hyg 1989b; 40:19-39.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Formation and compositions of the peritrophic membrane in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1993; 30: 179-98.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1995; 32:711-25.

Walters LL, Irons KP, Modi GB, Tesh RB. Refractory barriers in the sandfly (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg 1992; 46:211-28.

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 1989a; 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. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008; 102:161-6.

Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. Z Parasitenkd 1986; 72:423-31.

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.

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differ in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B 1994; 345:223-230.

World Health Organization, 2006. Control of Leishmaniasis. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_4-en.pdf. Acesso em 18 jan 2010.

World Health Organization, 2010. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/. Acesso em 18 jan 2010.

- Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 110: 345-57.
- Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. *BMJ* 2002; 325:176-7.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 132:1-16.
- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and a geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associate Publishers, Gainesville, Florida; 1994. 881p.
- Young DG, Lawyer PG. New world vectors of the Leishmaniases. In: Current Topics in Vector Research. Harriz KF editores. Springer-Verlag, New York; 1987. p.29-71.
- Zakai HA, Chance ML, Bates PA. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology* (Lond.) 1998; 116:305-9.
- Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 2001; 31:810-4.
- Zhang WW, Charest H, Ghedin E, Matlashewski G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 78:79-90.
- Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8807-11.
- Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48:449-70.