

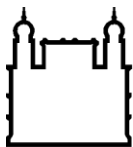
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE VIAS DE IMUNIDADE EM *LUTZOMYIA
LONGIPALPIS* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

BRUNO TINOCO NUNES

Rio de Janeiro
Abril de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Bruno Tinoco Nunes

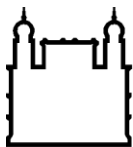
Caracterização de vias de imunidade em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof^a Dr^a Yara Maria Traub-Csekö

RIO DE JANEIRO

Abril de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNO TINOCO NUNES

**Caracterização de vias de imunidade em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
Psychodidae)**

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Yara Maria Traub Csekö

Aprovada em: 25/04/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta (Revisor) Fiocruz-RJ
Prof. Dr. Fernando Ariel Genta (Presidente) Fiocruz-RJ
Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (Membro) UFRJ
Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Membro) Fiocruz/CPqRR
Prof. Dr. Hector Manuel Diaz Albiter (Suplente) Fiocruz-RJ
Prof. Dr. Peter Josef Waniek (Suplente) Fiocruz-RJ

Rio de Janeiro, 25 de abril de 2014

Dedico este trabalho à minha avó, cujo amor e dedicação foram imprescindíveis à minha formação intelectual.

AGRADECIMENTOS

Dentre todos os trabalhos de cunho científico, este é o único espaço no qual somos permitidos revelar parte de nossa vida pessoal. Ainda assim, o fazemos em forma de agradecimento àqueles a quem julgamos terem contribuído, de alguma forma, com o trabalho atual. Pois bem.

Começarei pela maior guerreira que, até então, tive oportunidade de conhecer: minha avó. Muitíssimo obrigado, vó, por ter me criado desde os 9 anos, com todo amor do mundo, por ter me dado toda oportunidade do mundo para estudar e me formar, sem nunca me cobrar qualquer retorno. Te amo e te admiro.

Aos meus pais, Mara Lucia Ferreira e Paulo Roberto Tinoco Nunes, que, apesar de terem permanecido pouco tempo comigo, me mostraram qual lado eu deveria seguir e qual eu não deveria. Meu amor por vocês é infinito.

Aos meus familiares: tia Rita, tia Zezé, tio Maurício, tio Carlos, vovó Teinha, Lela e Cristiane. E, claro, aos meus irmãos Andy, Julinho, Pri e Aline. Vocês são, acima de tudo, meus amigos, porque parentes nós nem sempre amamos ou escolhemos ter, e eu sinto-me muito feliz por ter crescido com vocês. Obrigado por existirem.

À minha incrível namorada, Carol, que durante esses 12 meses de namoro não cansa de me mostrar quão grandiosa uma mulher pode ser. Este trabalho teria sido muito mais difícil sem você ao meu lado, em todos os momentos. Eu agradeço todos os dias por estarmos juntos.

À minha grande mestra Yara Traub Csekö, cujos ensinamentos intelectuais e éticos serão carregados por toda minha vida. Tive a honra de ter sido seu aluno nesses últimos anos e me orgulho muito por isso.

Ao meu também orientador André Pitaluga, que me acolheu no laboratório, há 5 anos, quando bati à porta da Fiocruz. Este trabalho é nosso, pois sem suas ideias e orientações eu certamente não teria desenvolvido este estudo.

Aos amigos do laboratório, que contribuíram fundamentalmente para minha formação científica: Tempone, Marina, Tatiana, Gabriel, Leandro, Poliana, Eudislaine, Maykon, Rute, Andrea, Daniela, Daisy, Guilherme, Cláudia, Marcel, Andres, Erich. Vocês transformaram esses dois anos de mestrado numa experiência inesquecível.

Ao grande pesquisador Jayme Souza-Neto, que me ensinou a fazer as microinjeções, além das nossas muitas conversas esclarecedoras durante sua curta passagem em nosso laboratório.

Às meninas da limpeza, Tati e Dona Mariza, por sempre tornarem os meus dias mais leves e estimulantes com um simples "- Bom dia, Bruninho" ou "- Bom dia, bebê", quando eu passava pelo corredor, apressado e preocupado com experimentos ou reuniões. Vocês são bons exemplos de que palavras gentis e desinteressadas podem mudar completamente o ânimo de alguém.

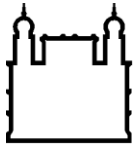
À galera da academia, especialmente Daniel, Thiago, Erlon e Paulinho, por terem muitas vezes sido a minha "válvula de escape" do estresse acadêmico.

Aos professores, coordenadores e secretários da pós-graduação, que fizeram da Biologia Celular e Molecular nível máximo em excelência no país.

Finalmente, não poderia deixar de citar a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), por tornar este trabalho possível.

Valeu, gente!

"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação." (John Dewey)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

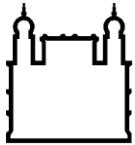
Caracterização de vias de imunidade em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Bruno Tinoco Nunes

Insetos são expostos a diversos microrganismos patogênicos durante seu ciclo de vida. Para sobreviverem a riscos de infecções, os insetos possuem várias barreiras e respostas imunes. O sistema imune de insetos é basicamente composto por vias de sinalização que controlam uma diversidade de mecanismos efetores, deste modo permitindo o controle da maior parte das infecções. Assim como em outros organismos, há três principais vias de sinalização relacionadas à imunidade em insetos: Toll, Imd e Jak/STAT. Nosso objetivo foi caracterizar estas vias imunes em *L. longipalpis*, o principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil. Para isto, nós transfectamos células embrionárias LL5 de *L. longipalpis* com RNA dupla fita para os genes repressores cactus (Toll), caspar (Imd) e pi3 (Jak/STAT). Usando esta abordagem, foi possível correlacionar a expressão dos peptídeos anti-microbianos (AMPs) com as vias correspondentes. Nós vimos que cecropina e defensina 4 foram reguladas positivamente após transfecção com RNA dupla fita para cactus e caspar, mostrando regulação redundante pelas vias Toll e Imd. Nós também silenciámos o gene cactus em insetos adultos. Diferente do que foi observado em células LL5, atacina, cecropina e defensina 4 foram reguladas negativamente após o silenciamento. É possível que este resultado seja explicado pelo efeito de uma alça de regulação negativa da via Toll, de modo a preservar a microbiota na ausência de estímulo imune. Além disso, nós avaliamos a resposta de genes de imunidade durante a infecção por *Leishmania infantum chagasi* em insetos adultos. Cactus foi regulado positivamente 48 horas após infecção, demonstrando o papel da via Toll em resposta à infecção por *Leishmania*. A expressão de SHP-1 foi modulada durante a infecção, com aumento significativo da expressão, em 48 horas. Este resultado sugere que, assim como em macrófagos, Gp63 ativa SHP-1, do hospedeiro invertebrado e, com isso, inibe a via Toll, possivelmente imunossuprimindo o flebotômíneo. Os AMPs atacina, cecropina e defensina 4 mostraram aumento significativo da expressão 72 horas após infecção, quando o parasita interage diretamente com o epitélio intestinal do flebotômíneo. A carga parasitária diminuiu significativamente nos terceiro e quarto dias, provavelmente devido ao aumento da expressão de AMPs nestes pontos. Estes resultados indicam que esses genes são regulados pelo flebotômíneo em resposta a presença de *Leishmania*, e que podem causar impactos na sobrevivência do parasita no intestino do inseto durante a infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of immune pathways in *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Bruno Tinoco Nunes

Insects are exposed to a wide range of pathogenic microorganisms during their life cycle. In order to survive infection risks, insects developed several structural barriers and immune responses. The insect immune system is basically composed of signaling pathways that control a diversity of effector mechanisms, thus allowing control of most infections. As found in other organisms, there are three main signaling pathways related to immunity in insects: Toll, Imd and Jak/STAT. Our purpose was to characterize these immune pathways in *L. longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis in Brazil. For this, we transfected *L. longipalpis* embryonic LL5 cells with dsRNA for the repressor genes cactus (Toll), caspar (Imd) and PIAS (Jak/STAT). Using this approach, it was possible to correlate the expression of AMPs to corresponding pathways. We found that cecropin and defensin 4 were upregulated after transfection by dsRNA for cactus and caspar, showing redundant regulation via the Toll and IMD pathways. We also silenced the cactus gene in adult insects by dsRNA. Unlike what was observed in LL5 cells, attacin, cecropin and defensin 4 genes were downregulated after silencing. This result might be explained by the effect of a negative regulation loop via Toll, to preserve the microbiota in the absence of immune stimulation. Furthermore, we assessed the response of immunity genes upon *Leishmania infantum chagasi* infection in adult insect. Cactus was upregulated at 48 hours after infection, demonstrating the role of the Toll pathway in response to *Leishmania* infection. The SHP-1 expression was modulated during infection, with a significant increase in expression at 48 hours. This result suggests that, like in macrophages, *Leishmania* Gp63 activates SHP-1 of the invertebrate host and thereby inhibits the Toll pathway, possibly immunosuppressing the sandfly. The AMPs attacin, cecropin and defensin 4 showed significant increase in expression at 72 hours after infection, when the parasite is interacting closely with the sand fly intestinal epithelium. The parasite load decreased significantly on the third and fourth days after infection, probably due to increased AMPs expression at this point. These results indicate that these genes are regulated by the sand fly immune response upon the presence of *Leishmania*, which may have an impact on parasite survival in the insect gut during infection.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses e <i>Leishmania</i>	1
1.1.1 O ciclo de vida da <i>Leishmania</i> no flebotomíneo.....	2
1.2 Aspectos relevantes da biologia de flebotomíneos	4
1.2.1 Alimentação sanguínea e tubo digestivo	5
1.3 Vias de Imunidade	6
1.3.1 Via Toll	9
1.3.2 Via Imd.....	9
1.3.3 Via Jak/STAT.....	10
1.3.4 Peptídeos antimicrobianos.....	10
1.3.5 RNA de interferência	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos Gerais	14
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Cultivo de células.....	16
3.2 Insetos	16
3.3 Síntese de dsRNA	16
3.4 Transfecção de células LL5	18
3.5 Preparo de material livre de RNases.....	19
3.6 Extração de RNA total	19

3.7 Tratamento por DNase.....	20
3.8 Síntese de cDNA.....	20
3.10 DNA genômico	21
3.11 RT-PCR para confirmação da síntese de cDNA.....	21
3.12 Lista de oligos	22
3.13 Eletroforese em gel de agarose	23
3.14 qPCR.....	24
3.15 Alimentação sanguínea e infecção com <i>L. i. chagasi</i>	24
3.16 Microinjeção de RNA dupla fita.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Parte I - Silenciamento gênico	27
4.1.1 Avaliação do potencial de silenciamento gênico sequência-específica mediado por dupla fita de RNA em células LL5	27
4.1.2 Análise da expressão de peptídeos antimicrobianos após silenciamento dos reguladores negativos cactus e caspar	29
4.1.2.1 Células LL5 silenciadas para cactus	30
4.1.2.2 Células LL5 silenciadas para caspar.....	32
4.1.3 Expressão de relish 2 nas amostras silenciadas para caspar.....	34
4.1.4 Silenciamento gênico em fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	35
4.1.5 Análise da expressão de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de <i>L. longipalpis</i> silenciadas para cactus	36
4.1.6 Investigação de um possível mecanismo de alça de regulação negativa na via Toll	37
4.2 Parte II - Infecção	40
4.2.1 Infecção de <i>L. longipalpis</i> por <i>L. i. chagasi</i>	40
4.2.2 Análise dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 frente à infecção pelo parasita <i>L. i. chagasi</i>	41
4.2.3 Efeitos da infecção sobre a microbiota bacteriana	43
4.2.4 Avaliação da carga parasitária durante a infecção	44

4.2.5 Investigação de um provável candidato em <i>L. i. chagasi</i> capaz de inibir a via Toll em <i>L. longipalpis</i>	46
4.2.6 Avaliação do papel de DUOX durante a infecção de <i>L. longipalpis</i> por <i>L. i. chagasi</i>	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES.....	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	2
Figura 2: Esquema mostrando o desenvolvimento da <i>Leishmania</i> dentro do tubo digestivo de flebotomíneos.....	4
Figura 3: Esquema com as fases de desenvolvimento do flebotomíneo <i>L. longipalpis</i> ... 5	
Figura 4: Síntese esquemática das três principais vias de imunidade em insetos e seus respectivos repressores.	8
Figura 5: Esquema do mecanismo de RNAi culminando com a degradação de um RNA mensageiro.....	13
Figura 6: Esquema da estratégia utilizada para síntese <i>in vitro</i> de dsRNA.	17
Figura 7: 1ª rodada de PCR para geração de RNA dupla-fita..	17
Figura 8: 2ª rodada de PCR para geração de RNA dupla-fita.	18
Figura 9: Exemplo de foto em gel de agarose 2% após PCR de teste para verificação da presença de DNA genômico.....	20
Figura 10: Exemplo de foto em gel de agarose 2% para confirmação da síntese de cDNA.....	21
Figura 11: Exemplo do esquema de alimentação sanguínea artificial.....	25
Figura 12: Visão interna da gaiola de alimentação.....	25
Figura 13: Fotografia ilustrando o esquema do Nanoject II™ para microinjeção.	26
Figura 14: Expressão relativa de cactus, caspar e pias em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita sequência-específica	28
Figura 15: Expressão de peptídeos antimicrobianos em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para cactus.....	31

Figura 16: Expressão de peptídeos antimicrobianos em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para caspar..	33
Figura 17: Expressão de relish 2 em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para caspar.	34
Figura 18: Expressão de cactus em fêmeas de <i>L longipalpis</i> microinjetadas com RNA dupla fita para cactus..	35
Figura 19: Expressão relativa de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de <i>L longipalpis</i> microinjetadas com RNA dupla fita para cactus..	37
Figura 20: Expressão relativa de WntD em fêmeas de <i>L longipalpis</i> microinjetadas com RNA dupla fita para cactus.....	38
Figura 21: Expressão relativa de dorsal em fêmeas de <i>L longipalpis</i> microinjetadas com RNA dupla fita para cactus.....	39
Figura 22: Expressão relativa de 16S em fêmeas de <i>L longipalpis</i> microinjetadas com RNA dupla fita para cactus.....	40
Figura 23: Expressão relativa de cactus em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas pelo parasita <i>L. infantum chagasi</i>	41
Figura 24: Expressão relativa de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas por <i>L. i. chagasi</i>	43
Figura 25: Efeitos sobre a microbiota em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas pelo parasita <i>L. i. chagasi</i>	44
Figura 26: Modulação da carga parasitária em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas pelo parasita <i>L. i. chagasi</i>	45
Figura 27: Expressão relativa de SHP-1 em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas pelo parasita <i>L. infantum chagasi</i>	46
Figura 28: Expressão relativa de DUOX em fêmeas de <i>L longipalpis</i> infectadas pelo parasita <i>L. infantum chagasi</i>	47

Figura 29: Modelo esquemático mostrando a alça de regulação negativa descrita em <i>D. melanogaster</i> relativa à via Toll	51
Figura 30: Esquema ilustrativo mostrando a introdução de Gp63, por <i>Leishmania</i> , e a consequente ativação de SHP-1.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos	22
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMP - Peptídeo antimicrobiano (*antimicrobial peptide*)
- BLAST Ferramenta básica de procura por alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- CDC - *Centers for Disease Control*
- cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar (*Complementary DNA*)
- DEPC - Dietil pirocarbonato
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfato
- dsRNA - RNA dupla fita (*double strand RNA*)
- EST - Etiqueta de seqüências expressas (*expressed sequence tag*)
- Imd - Deficiência imunológica (*Immune Deficiency*)
- LACD - Leishmaniose anérgica cutânea difusa
- LC - Leishmaniose cutânea
- LL5 – Linhagem celular embrionária de *Lutzomyia longipalpis*
- LLCM - Leishmaniose mucocutânea
- LV - Leishmaniose visceral
- MP - Matriz peritrófica
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PCR - Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
- RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)
- RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RNAi - RNA de interferência
- RNase - ribonuclease
- RT-PCR - PCR por transcriptase reversa (*reverse transcriptase*)
- SHP-1 - Tirosina fosfatase 1 (*tyrosine phosphatase 1*)
- siRNA - Pequenos RNAs interferentes (*small interfering RNA*)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses e *Leishmania*

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com um importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contaminação, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano.

São enfermidades que podem apresentar manifestações clínicas diferenciadas, que irão variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e com o tipo de resposta imunológica desencadeada no hospedeiro vertebrado. As possíveis formas clínicas observadas são a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV) (Ministério da Saúde, 2007), além das formas chamadas de leishmanioses mucocutânea (LCM) e anérgica cutânea difusa (LACD). O ciclo de vida da *Leishmania* pode ser visualizado abaixo (Figura 1).

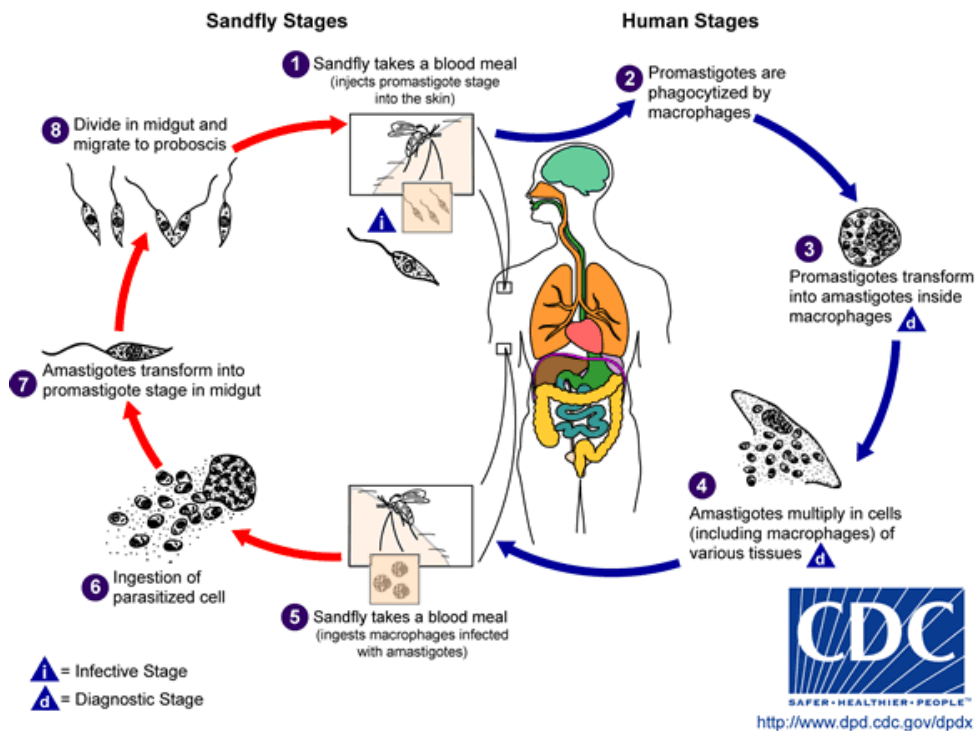


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*: 1- vetor infectado inocula parasitas em um novo hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo; 2 – formas promastigotas do parasita são fagocitadas por macrófagos; 3, 4- parasitas se transformam em amastigotas e infectam células do sistema imune mononuclear; 5, 6- flebotomíneo se alimenta em hospedeiro doente e ingere os parasitas na forma amastigota; 7, 8- a *Leishmania* retorna a forma promastigota e coloniza o vetor (CDC, 2009).

O agente etiológico da leishmaniose é o parasito protozoário *Leishmania spp.* A infecção em humanos pode ser causada por 21 espécies das 30 que infectam mamíferos. As principais espécies que afetam o homem incluem 3 espécies do complexo *Leishmania donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*; e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*) (CDC, 2007).

1.1.1 O ciclo de vida da *Leishmania* no flebotomíneo

O protozoário *Leishmania* apresenta duas fases distintas, uma no vetor invertebrado e a outra no hospedeiro vertebrado. Diz-se, portanto, que seu ciclo de vida é digenético.

A infecção se inicia quando o flebotômíneo ingere sangue infectado, contendo as formas amastigotas, as quais são direcionadas ao intestino médio. Neste novo ambiente, os protozoários se diferenciam em formas promastigotas procíclicas. Essas formas pequenas, flagelares e ovóides possuem alta taxa de multiplicação dentro do bolo alimentar. Entre o 2º e 5º dia após alimentação sanguínea infectada, as formas procíclicas passam por uma série de divisões originando as nectomonas. Nos primeiros dias após alimentação infectada até a passagem do bolo alimentar, essas são as formas majoritárias no tubo digestivo dos flebotômíneos. Por volta de 72 horas após repasto sanguíneo, as formas nectomonas ultrapassam a matriz peritrófica e se aderem às microvilosidades do epitélio intestinal. Em seguida, após 4 a 5 dias, as formas nectomonas são encontradas na porção torácica do intestino médio. Tal ocorrência migratória para as partes anteriores do trato digestivo é acompanhada pela transformação em novas formas promastigotas, as haptomonas e as paramastigotas. Ao mesmo tempo, outra forma surge: os promastigotas metacíclicos. Semelhante fenômeno de diferenciação celular capaz de gerar tais formas de *Leishmania* infectiva ao hospedeiro vertebrado (promastigotas metacíclicos) é conhecido como metaciclogênese (Lainson et al., 1987). Os promastigotas metacíclicos possuem forma delgada e longa com o flagelo extenso. São altamente ativas e responsáveis pela continuação do ciclo de vida do parasito. Os metacíclicos estabelecem uma massiva infecção da válvula estomodeal que, em alguns casos, é acompanhada de invasão do intestino anterior, incluindo a faringe, o cibário e a probóscide. As formas metacíclicas formam um tampão na válvula estomodeal, impedindo, deste modo, o correto bombeamento do sangue durante a alimentação sanguínea e estimulando a regurgitação das formas metacíclicas presentes nas porções anteriores do intestino (Schlein et al., 1992). O ciclo completo da *Leishmania* no flebotômíneo pode ser observado na figura 2.

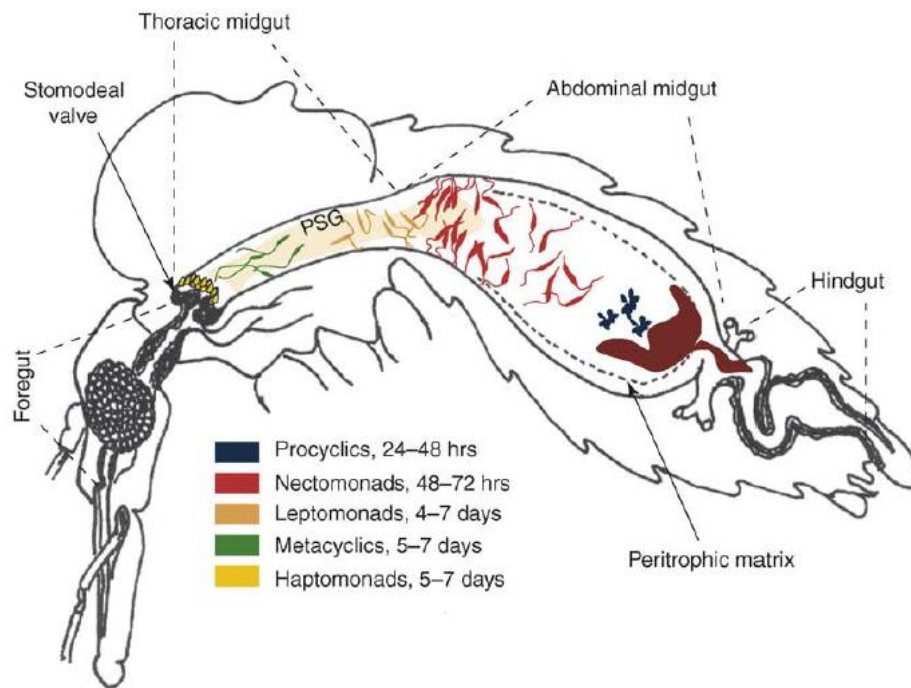


Figura 2: Esquema mostrando o desenvolvimento da *Leishmania* dentro do tubo digestivo de flebotomíneos (Kamhawi, 2006). O período de cada fase é indicado em cores.

1.2 Aspectos relevantes da biologia de flebotomíneos

O inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), é encontrado em todo o continente americano, do México à Argentina. São insetos hematófagos da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* caracterizados pelo pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm, e intensa pilosidade. Como todo díptero, são holometábolos com o ciclo composto por uma fase de ovo, uma fase larval que compreende quatro estádios (L1 a L4), uma fase pupal e a fase de adulto (Brazil et al, 2003) (Figura 3). Em nosso país este inseto vetor é o principal transmissor na maioria dos focos ativos de leishmaniose visceral, picando o homem, cães e raposas (Deane & Deane 1955), desta forma apresentando grande importância epidemiológica.

Os flebotomíneos são hospedeiros de microorganismos e também vetores de vários agentes patogênicos. Diversos microorganismos foram isolados destes vetores, dentre os quais fungos (*Beauveria bassiana*), bactérias (do gênero *Bartonella*), outros tripanosomatídeos (que não *Leishmania*), gregarinas e nematódeos (Secundino et al. 2002).

Os flebotomíneos também transmitem vírus, como o vírus Toscana (Bunyaviridae), presente nos países do Mediterrâneo, responsável por infecções neurológicas que vão desde meningite a encefalites (Valassina et al. 2003). Dentre os arbovírus, os vesiculovírus (Rhabdoviridae), os flebovírus (Bunyaviridae) e os orbivírus (Reoviridae) estão dentre os gêneros de vírus mais comuns presentes em flebotomíneos.

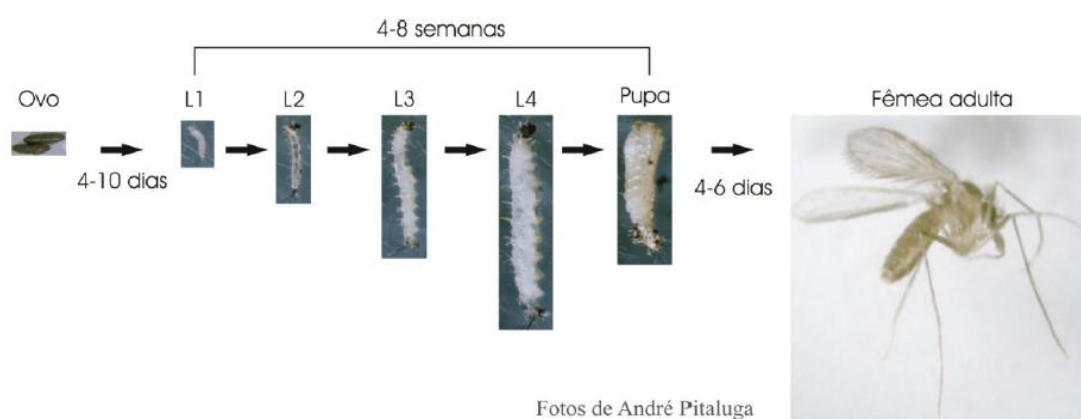


Figura 3: Esquema com as fases de desenvolvimento do flebotomíneo *L. longipalpis* (Fotos de André Pitaluga).

1.2.1 Alimentação sanguínea e tubo digestivo

A laceração provocada pelas peças bucais dos flebotomíneos leva ao surgimento de uma pequena e localizada hemorragia subcutânea, de onde o sangue é sugado. Assim como em outros insetos hematófagos, a alimentação sanguínea nos flebotomos é necessária para o desenvolvimento dos ovários, e a quantidade de ovos gerados é proporcional ao volume de sangue ingerido (Ready, 1979; Lehane, 1991).

O tubo digestivo dos flebotomíneos se inicia nas partes bucais (probóscide), indo até o intestino, que é dividido em três partes (anterior, médio e posterior).

Durante a digestão, o sangue é envolvido pela matriz peritrófica (MP) produzida pelas células do epitélio intestinal do intestino médio. Esta matriz começa a se formar entre 1 e 4 horas após a ingestão sanguínea e, em 24 horas, está completamente

formada. A matriz peritrófica é sintetizada como uma bainha de formato cilíndrico que envolve o sangue ingerido dentro do tubo digestivo (Pimenta et al., 1997). A matriz, apesar de sua composição química não ser completamente estabelecida, é formada por um material fibroso constituído por quitina e várias proteínas associadas (Jacobs-Lorena & Oo, 1996). A matriz peritrófica desempenha importantes funções durante a digestão sanguínea. A estrutura física da matriz protege o epitélio intestinal contra danos causados pela digestão sanguínea, como cristais de hemoglobina (Richards & Richards, 1977; Rudin & Hecker, 1982) ou a ação de radicais livres pela degradação do grupamento heme. A matriz compartimentaliza a digestão, permitindo, deste modo, a formação de um gradiente de tripsina desde o epitélio do intestino até a parte central do material em digestão contendo células sanguíneas e eventuais parasitos (Pimenta et al., 2003). Além disso, outra vantagem da formação da matriz peritrófica pode ser atribuída à defesa contra microrganismos patogênicos presentes no repasto sanguíneo. Foi visto que, embora a matriz possa ser responsável por formar uma barreira física contra a infecção por patógenos, ela também confere proteção à *Leishmania* contra a ação de enzimas digestivas (Pimenta et al., 1997).

Em acréscimo, dois importantes genes que atuam no processo de digestão sanguínea em *L. longipalpis* foram identificados, tripsina (Telleria et al., 2007) e V-ATPase (Ramalho-Ortigão et al., 2007). Além de seu papel na digestão, estas enzimas também exercem influência na habilidade de certos patógenos infectarem seus vetores naturais. Em *L. longipalpis*, dois genes de tripsinas que são diferencialmente expressos em fases distintas do processo digestivo e no desenvolvimento foram identificados (Telleria et al., 2007). No mesmo trabalho, foi visto que a tripsina 1 é modulada durante ingestão sanguínea, ao passo que a tripsina 2 é expressa constitutivamente.

1.3 Vias de Imunidade

Os insetos são expostos a uma grande variedade de microrganismos patogênicos durante seu ciclo de vida, além de algumas espécies se alimentarem de sangue potencialmente infectado com parasitas, bactérias ou vírus. Para poder conviver com o risco de infecção os insetos desenvolveram diversas barreiras estruturais e uma resposta imunológica composta por vários mecanismos de defesa.

Uma das principais defesas dos insetos é o sistema imune inato, que é rapidamente ativado após desafio e demonstra um certo grau de especificidade a diferentes classes de microrganismos. O sistema imune é composto basicamente por vias de sinalização que controlam uma série de mecanismos efetores, como a produção de AMPs, espécies reativas de oxigênio (ROS), NOS e moléculas semelhantes a opsoninas. Desta forma, o sistema imune possibilita o controle da maior parte das infecções. A resposta imune em insetos compreende tanto mecanismos de defesa humoral como celular. Este último envolve os hemócitos presentes na hemolinfa (Medzhitov & Janeway, 2002).

Existem três principais vias imunes de sinalização em insetos: Toll, Imd e Jak/STAT (Figura 4). Estas são responsáveis pela expressão de peptídeos antimicrobianos e de genes efetores da imunidade. Embora haja algum grau de interconexão entre as diferentes vias de sinalização, bactérias Gram-positivas e fungos estimulam preferencialmente a via Toll enquanto bactérias Gram-negativas ativam a via Imd (Michel et al. 2001, Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003). Tanto as vias de imunidade inata como a via de RNA de interferência participam na defesa antiviral dos insetos (Costa et al. 2009; Souza-Neto et al. 2009).

Mosquito immune pathways

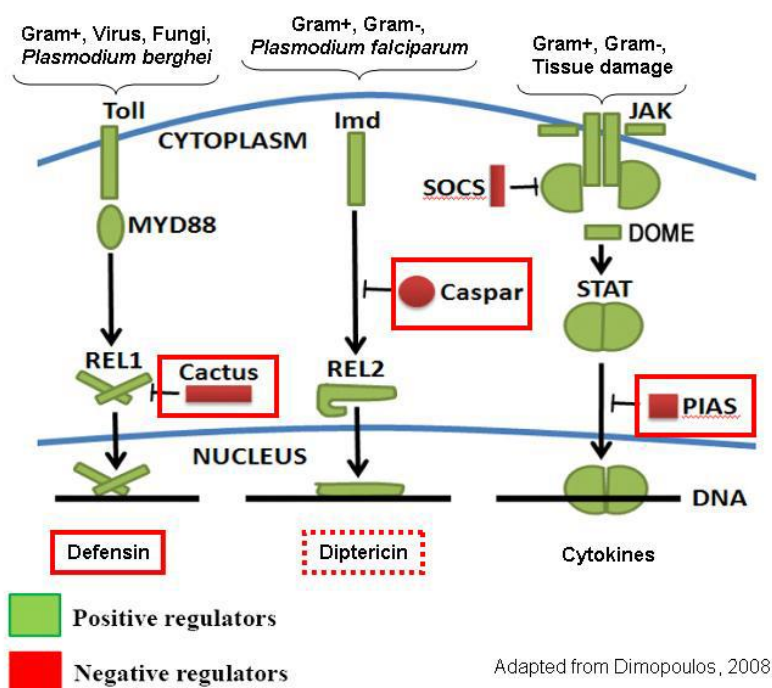


Figura 4: Síntese esquemática das três principais vias de imunidade em insetos e seus respectivos repressores, destacados em vermelho.

Pouco se conhece sobre a imunidade de flebotomíneos. O sistema imune de insetos é conhecido basicamente a partir de estudos em *Drosophila* e em mosquitos. Não se sabe em flebotomíneos, por exemplo, quais são os principais fatores de transcrição utilizados pelas vias Toll e Imd. Em *Drosophila* existe o par Dif/Relish, enquanto em mosquitos existem duas formas de Relish (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Tampouco se tem conhecimento de quais peptídios antimicrobianos estão relacionados com quais vias de imunidade. Nosso grupo identificou diversos genes ligados à imunidade e à via de RNA de interferência (Pitaluga et al. 2008). Dentre os diversos genes identificados, foram descritos os genes reguladores negativos das três principais vias: cactus (via Toll), caspar (via Imd) e piás (via Jak/STAT). Estes genes têm a função de regular negativamente as respectivas vias.

1.3.1 Via Toll

A via Toll é uma cascata de sinalização conservada evolutivamente que foi inicialmente descrita pelo seu papel no estabelecimento da polaridade no eixo dorso-ventral de embriões de *Drosophila* (Belvin & Anderson, 1996). Mais tarde a via também foi associada à regulação da resposta imune, quando sua função foi caracterizada. Toll é uma proteína transmembrana que é ativada pela proteína extracelular Spaetzle após sofrer clivagem proteolítica induzida por uma cascata de cisteíno-proteínases (Hoffmann & Reichhart, 2002). Após a ligação com Spaetzle, Toll sofre alterações conformacionais, resultando no recrutamento de pelo menos três proteínas com domínios “death” (MyD88, Tube e Pelle). Pelle contém um domínio adicional de serina-treonina quinase e por isso pode estar envolvido na via de degradação proteolítica de cactus. Cactus é uma proteína com domínio anquirina que atua como inibidor dos fatores de transcrição dorsal e relish 1 (Christophides et al. 2004). Após a degradação de cactus, o fator de transcrição dorsal (da família NF- κ B) é translocado para o núcleo, onde promove a transcrição de diversos genes relacionados a vários aspectos da imunidade do inseto, em especial peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Em *Drosophila*, foi caracterizado um mecanismo de alça de regulação negativa da via Toll, no qual a proteína WntD atua como um inibidor da translocação do fator de transcrição dorsal para o núcleo, e é o próprio dorsal que ativa a transcrição de WntD que, em seguida, inibe a acumulação nuclear de dorsal (Gordon et al., 2005).

Foi descoberto em mamíferos que a protease de superfície Gp63, de *Leishmania*, é capaz de ativar a tirosina fosfatase SHP-1, de macrófagos, que por sua vez tem o potencial de inibir componentes da via Toll (Blanchette et al., 1999).

1.3.2 Via Imd

A via Imd é ativada principalmente em resposta a bactérias Gram-negativas e regula um grande conjunto de peptídeos antimicrobianos. O receptor transmembranar da via Imd é uma proteína reconhedora de peptideoglicana de cadeia longa (PGRP-LC). Após estímulo, PGRP-LC passa o sinal para a proteína Imd, que contém o domínio “death” com grande similaridade em relação ao mecanismo de sinalização *tumor*

necrosis factor (TNF) humano. PGRP-LC recruta a proteína Imd, que em seguida interage com o adaptador dFADD via interação com o domínio “death”. Depois disso, dFDD recruta a caspase Dredd, que então se associa com Relish. Uma vez clivada, Relish libera sua porção N-terminal (ativadora transcricional) da porção C-terminal, (inibidora da translocação), e esta é direcionada para o núcleo. Ao atingir o núcleo, Relish promove a transcrição de diversos genes relacionados à imunidade, em especial peptídeos antimicrobianos (AMPs), entre eles atacina, cecropina e diptericina, especialmente ativas contra bactérias Gram-negativas (Hoffmann, 2003).

1.3.3 Via Jak/STAT

Em *Drosophila*, esta via tem um importante papel em eventos como segmentação, proliferação e diferenciação de hemócitos, determinação de sexo e desenvolvimento de olhos, asas e pernas (Zeidler et al. 2000, Luo & Dearolf 2001). A via pode ser acionada por desafio de bactérias ou por lesões teciduais que ativam a ligação da proteína ligadora de citocina UDP3 ao receptor transmembranar DOME, induzindo sua fosforilação pela proteína HOP (uma Jak tirosina quinase). Esta fosforilação cria um sítio de ligação para as proteínas STAT inativas que são então fosforiladas, dimerizadas e translocadas ao núcleo, onde ativam a transcrição de vários genes (Christophides et al. 2004). Aparentemente as vias Imd e Jak/STAT possuem alguns componentes em comum e, de maneira geral, todas as vias (Toll, Imd, e Jak/STAT) compartilham alguns genes em comum como alvo (Boutros et al. 2002).

1.3.4 Peptídeos antimicrobianos

Nos insetos, a produção de AMPs induzida por estímulo imune ocorre principalmente no corpo gorduroso onde os peptídeos são secretados na hemolinfa e acumulados em altas concentrações e difundidos por todo o corpo (Boman, 2003). Entretanto, a produção de AMPs também é detectada em outros tecidos como o epitélio do tubo digestivo (Lehane et al. 1997). A maioria dos AMPs é anfipática, carregada positivamente e com baixo peso molecular (5–30 kDa). São também altamente

abundantes e diversos, a ponto de várias famílias de AMPs já terem sido identificadas em insetos desafiados (Bulet et al. 1999). Embora haja grande variedade de peptídeos antimicrobianos, de maneira geral eles são considerados de amplo espectro, sendo funcionais contra diversos microorganismos (bactérias, fungos, leveduras, vírus, etc.). Esses peptídeos são agrupados em três classes principais: peptídeos lineares com α -hélices anfipáticas e hidrofóbicas (cecropinas, magaininas, etc.) (Lamberty et al. 2001), peptídeos com pontes dissulfídicas entre cisteínas (defensinas, protegrinas, etc.) (Steiner e col., 1981) e aqueles com abundância de resíduos de prolina e/ou glicina (PRP, GRP) (Bulet et al. 1999). O mecanismo de ação mais bem conhecido é através da inserção dos AMPs na membrana celular, que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microorganismo à morte. Recentemente nosso grupo identificou diversos peptídeos antimicrobianos em *L. longipalpis*, dentre os quais podemos citar atacina, cecropina e defensinas 1, 2, 3 e 4.

1.3.5 RNA de interferência

O mecanismo de RNAi foi descoberto em 1998 como uma interferência genética potente e específica causada por RNA dupla fita, em *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998) e se baseia no silenciamento da expressão gênica através da degradação sequência-específica de RNAs mensageiros. O mecanismo de RNAi provavelmente está presente em todas as plantas e animais metazoários (Ghildiyal & Zamore 2009).

O mecanismo básico de RNAi pode ser dividido em 3 etapas: primeiro, uma longa dupla fita de RNA (dsRNA) é processado em pequenas moléculas de RNA dupla fita, que variam de tamanho entre 20 e 30 nucleotídeos (siRNA) por uma ribonuclease III (RNaseIII) conhecida como Dicer; em seguida estes siRNAs são incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA, conhecido como RISC; finalmente, no RISC, uma das fitas de RNA é destruída e a outra serve como molde para a clivagem de outros RNAs mensageiros que apresentem complementaridade com a sequência alvo (Figura 5). O processo geralmente resulta na redução da expressão gênica, influenciando na regulação e proteção do genoma contra ameaças externas e internas, tais como controle de elementos móveis do DNA durante fases embrionárias em células germinativas de mamíferos (Meister & Tuschl 2004; Tomari & Zamore 2005).

Em função de sua natureza, este mecanismo é muito eficiente na inativação de RNA viral (Fritz et al. 2006), principalmente para os organismos que não possuem respostas baseadas no interferon, tendo assim um papel importante na imunidade de vetores de arboviroses.

A compreensão do funcionamento do mecanismo de RNAi em flebotomíneos tem grande importância no sentido de entender os aspectos moleculares desta via, que poderá fornecer novas ferramentas para a genômica funcional e para o controle da transmissão de patógenos. Através do silenciamento de genes de interesse, é possível compreender o funcionamento dos mesmos.

Através de sequenciamento de ESTs em nosso laboratório, foram identificados em *L. longipalpis* alguns componentes do mecanismo de RNAi como *Tudor*, *R2D2*, *Piwi*, *Ago1*, *Ago2*, *Dcr1*, *Arm*, *Rm62*, sendo este o primeiro relato de genes relacionados a RNAi em *L. longipalpis*. (Pitaluga et al. 2009).

É importante lembrar que, nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado diversas evidências que sustentam que o mecanismo de RNAi está envolvido na defesa contra vírus em insetos (Keene et al. 2004; Sanchez-Vargas et al. 2004; van Rij & Andino 2006), sendo o silenciamento por RNA de interferência crucial para a defesa antiviral em adultos de *D. melanogaster* (van Rij et al. 2006) e em *Anopheles gambiae* infectado com vírus O'nyong-nyong (ONNV) (Keene et al. 2004).

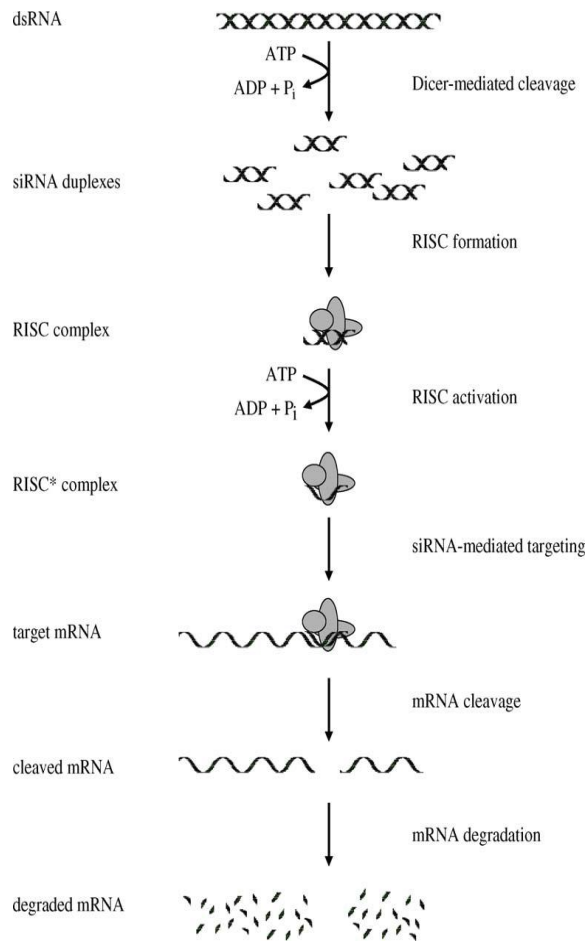


Figura 5: Esquema do mecanismo de RNAi culminando com a degradação de um RNA mensageiro (Aigner, 2006).

Em *L. longipalpis*, foi observada uma resposta antiviral não específica a sequencia de dsRNA após transfecção de células LL5 em cultura, mostrando diferença em comparação ao mecanismo de mosquito (Pitaluga et al. 2008). O mesmo tipo de resposta antiviral foi identificado no crustáceo *Litopenaeus vannamei* (Robalino et al. 2004). Apesar de desencadear atividade antiviral inespecífica em células LL5 de *L. longipalpis*, micro-injeções de dsRNA foram utilizadas em insetos adultos para a redução da expressão de tripsina 1 (Sant'Anna et al. 2009), xantina desidrogenase (Sant'Anna et al. 2008) e caspar (Telleria et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

1. Avaliar o papel das vias Toll e Imd na produção de peptídeos antimicrobianos em células LL5 de *L. longipalpis*;
2. Caracterizar a resposta imune em *L. longipalpis* frente à infecção pelo parasita *L. i. chagasi*.

2.2 Objetivos Específicos

Silenciamento em LL5

- Confirmar a existência do mecanismo de RNAi funcional em células LL5 de *L. longipalpis*;
- Analisar o papel das principais vias de imunidade no controle da expressão de peptídeos antimicrobianos e do fator de transcrição relish 2.

Silenciamento gênico em fêmeas de *L. longipalpis*

- Analisar a expressão de genes de imunidade associados à via Toll após silenciamento do gene cactus;
- Avaliar o efeito do silenciamento de cactus sobre a microbiota bacteriana.

Infecção de *L. longipalpis* por *L. i. chagasi*

- Estudar a resposta imune de *L. longipalpis* frente à infecção pelo parasita;
- Determinar o efeito da infecção sobre a microbiota bacteriana;
- Avaliar a carga parasitária durante a infecção;
- Investigar a modulação da expressão de um possível candidato a inibidor da via Toll, SHP-1;
- Avaliar o papel de DUOX durante a infecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo de células

Células embrionárias da linhagem LL5 (Tesh e Modi, 1983) proveniente de *L. longipalpis* foram mantidas em garrafa de cultura com 25 e 75 cm³ em meio L-15 (SIGMA - Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Laborclin), 10% de triptose e 1% de penicilina/streptomicina (100U/mL / 100mg/mL), a uma temperatura de 29°C.

3.2 Insetos

Todos os experimentos foram realizados usando *L. longipalpis* estabelecidos em colônia, coletados de Jacobina (Bahia, Brasil) usando a metodologia descrita por Modi (1997). Os insetos foram alimentados com 70% de sacarose *ad libitum* e alimentados com sangue de hamster quando necessário. Os insetos foram mantidos a 27 +/- 1°C, com umidade de 80-95%, e fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro.

3.3 Síntese de dsRNA

Os RNA de fita dupla (dsRNA) foram sintetizados *in vitro* a partir de produtos de PCR contendo o promotor T7. Foram executadas duas rodadas de PCR nas quais na primeira foram utilizados primers específicos para o gene de interesse contendo adaptadores nas extremidades 5'. Numa segunda reação de PCR os produtos da primeira reação foram usados como moldes, usando oligonucleotídeos para os adaptadores contendo a sequência do promotor T7 (RNA polimerase de bacteriófago T7) (Figura 6). A transcrição *in vitro* utilizou o kit MEGAScript T7 (Ambion).

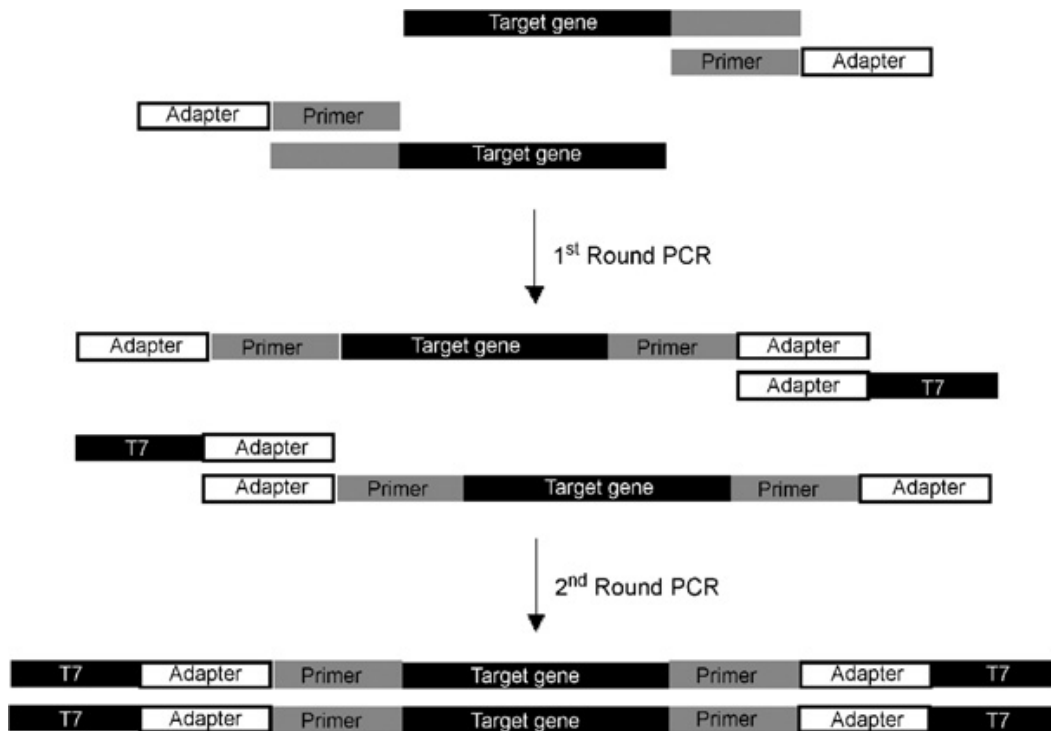


Figura 6: Esquema da estratégia utilizada para síntese *in vitro* de dsRNA (Pitaluga et al., 2007).

Detalhadamente, as condições de PCR da primeira reação foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguido de 72°C por 7 minutos (Figura 7).

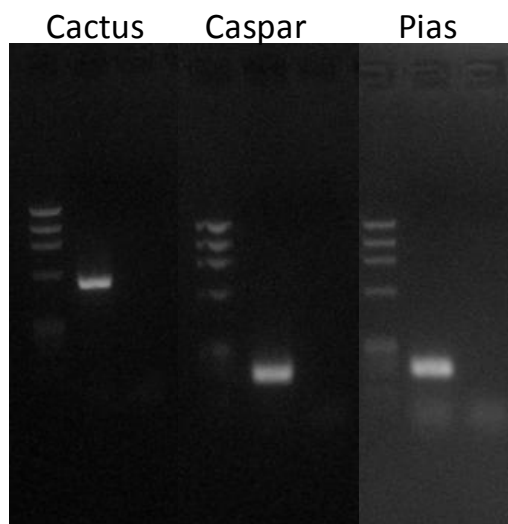


Figura 7: 1^a rodada de PCR. Primeira coluna: marcador de peso molecular 100pb. Segunda coluna: produto resultante da primeira amplificação. Terceira coluna: controle negativo (água como molde para reação).

Após a primeira rodada de PCR, 2 μ L desta reação foram usados como molde para a segunda rodada, nas mesmas condições. A segunda rodada usou o oligonucleotídeo contendo a sequência do promotor T7 ligada à sequência adaptadora (Figura 8). Após a segunda reação de PCR, 4 μ L da reação foram usados como molde para a transcrição *in vitro* de RNA dupla fita, usando o kit MEGAScript T7 (Ambion).

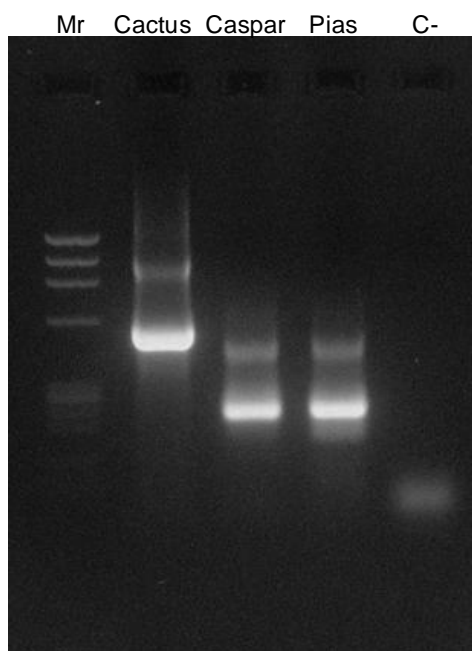


Figura 8: 2ª rodada de PCR.

3.4 Transfecção de células LL5

A transfecção foi realizada usando o reagente lipídico DharmaFECT1 (Thermo Scientific), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, uma mistura foi preparada contendo 0.25 μ L de DharmaFECT1 e 23.25 μ L de DCCM (DHARMA CON) e misturada com 1.5 μ L de dsRNA para obtenção de uma concentração final de 30 nM em cada poço de uma placa de 24 poços. Seguindo 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, 75 μ L de células em suspensão contendo 45,000 células LL5 (cultivadas em meio de cultura) foram adicionadas para cada poço, e as placas foram incubadas por 12, 24 e 48 horas, a 30°C, antes da ressuspensão em TRIzol (Invitrogen).

Em alguns casos, células foram transfectadas com RNA dupla fita para cactus, ou caspar, ou pias, exceto o grupo controle, o qual recebeu RNA dupla fita para luciferase. Para cada ponto de células tratadas com RNA dupla fita sequência específica, paralelamente foi feito outro para células tratadas com dsRNA controle (dsLuciferase). Por exemplo, foi feito um ponto de 12 horas com meio contendo RNA dupla fita para cactus e outro de 12 horas com RNA dupla fita para luciferase. O mesmo para os pontos de 24 e 48 horas e para os demais genes alvos (caspar e pias).

3.5 Preparo de material livre de RNases

Todo o material utilizado para o trabalho com RNA, como vidraria e soluções, foi previamente tratado por 24 h com 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, EUA), seguido de autoclavação. A água milli-Q com 0,1% de DEPC, usada no tratamento de vidrarias e ponteiras, foi autoclavada e armazenada em frascos livres de RNases para posterior utilização em experimentos envolvendo RNA.

3.6 Extração de RNA total

As células em cultura foram ressuspendidas em 1 mL de TRIzol e colocadas dentro de microtubos de 1,5 mL. No caso do uso de insetos adultos, estes foram colocados em 1 mL de TRIzol, macerados, e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. Após a fase líquida ser transferida para um novo tubo (apenas no caso do uso de insetos) todas as amostras receberam 200 µL de clorofórmio, foram agitadas vigorosamente por inversão, incubadas por 3 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, de forma a evitar o carregamento de DNA genômico, que se encontra na interfase aquosa/orgânica. Ao material do novo tubo foi adicionado 1 volume de isopropanol, o RNA foi precipitado por 3 min à temperatura ambiente e a precipitação destes ácidos nucleicos foi feita por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O precipitado foi lavado com EtOH 75% (v/v) previamente gelado a -20°C. A cada lavagem o material foi agitado com auxílio de um vortex e centrifugado a 7.500

rpm por 5 min a 4°C. Ao final, o material foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min e redissolvido em um volume de água que variou de 20 a 40 µL, dependendo da massa aparente do precipitado. A concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro e os tubos com RNA foram armazenados a -70°C.

3.7 Tratamento por DNase

A concentração do RNA foi determinada mediante leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ ND-2000), o RNA extraído foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega), enzima que degrada moléculas contaminantes de DNA oriundas da extração de RNA. O RNA extraído foi mantido em banho-maria, a 37°C, por aproximadamente 2 horas. A confirmação da degradação do DNA genômico pela DNase foi feita realizando-se um PCR com o RNA total como molde. Como controle positivo, foi usado DNA genômico de *L. longipalpis* amplificando o gene de histona (Figura 9).

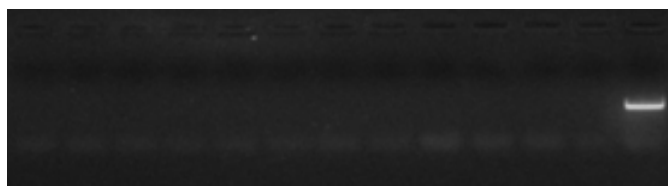


Figura 9: Exemplo de foto em gel de agarose 2% após PCR de teste para verificação da presença de DNA genômico. As colunas para as quais não foram visualizadas bandas no gel são os RNAs tratados com DNase, ao passo que o controle positivo, na última coluna, cujo molde foi DNA genômico, pode-se visualizar a banda no gel.

3.8 Síntese de cDNA

Após a etapa do tratamento por DNase, o RNA, livre de DNA genômico, foi usado como molde para a síntese de cDNA. A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada com o emprego do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen®), de acordo com recomendações do fabricante. A massa de RNA total utilizada por reação foi 1 µg e os iniciadores empregados foram

oligonucleotídeos randômicos (Figura 10). Os tubos contendo cDNA foram estocados a -20°C.

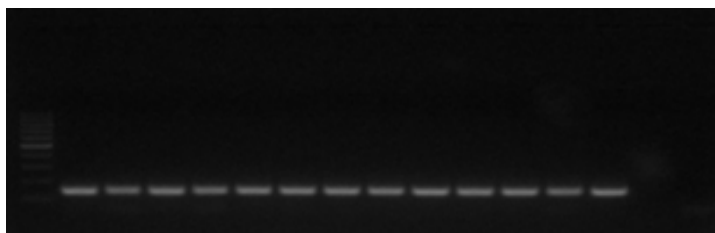


Figura 10: Exemplo de foto em gel de agarose 2% para confirmação da síntese de cDNA. O par de oligonucleotídeos utilizado na reação foi o Rp49 (F e R). Este oligo só é capaz de amplificar o cDNA referente a esta proteína ribossomal, uma vez que sua sequência foi desenhada entre o final de um éxon e o início de outro, excluindo-se a sequência intrônica. As duas últimas bandas são referentes ao controle negativo, em presença de água, em vez de cDNA.

3.10 DNA genômico

O DNA genômico usado neste trabalho foi gentilmente cedido por André Nóbrega Pitaluga, do laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores, IOC/FIOCRUZ.

3.11 RT-PCR para confirmação da síntese de cDNA

As reações foram feitas com 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 1 μ L do cDNA diluído 10 vezes, 2 U de enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega), tampão reacional na concentração de 1 X e água milli-Q suficiente para atingir um volume reacional de 25 μ L. As amplificações foram feitas em um termociclador Veriti 384-well Thermal Cycler - Applied Biosystems (ABI). Após um aquecimento prévio de 3 min a 94°C, as amostras foram aquecidas por 45 seg a 94°C, para a desnaturação da dupla fita de DNA, em seguida ficaram por 45 seg a 58°C, para o anelamento dos oligonucleotídeos, depois, permaneceram por 45 seg a 72°C para extensão das novas fitas. Este ciclo foi repetido por 35 vezes e seguido por uma etapa de extensão final, de 7 min.

3.12 Lista de iniciadores oligonucleotídicos

As seqüências de primers utilizadas neste trabalho (Tabela 1) foram desenhados a partir do extenso sequenciamento e anotação de ESTs de *L. longipalpis* realizado em nosso laboratório (Pitaluga et al. 2009), no qual foram encontrados diversos transcritos associados ao mecanismo de RNAi e às vias de imunidade Toll, Imd e Jak/STAT. Além disso, o banco de dados do Vector Base também foi utilizado, quando necessário (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência
16S-F	5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'
16S-R	5' GGAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'
Atacina-F	5' AGGCTGATCCTCTGGGTCCTGT 3'
Atacina-R	5' ATGGGCATGGCAGCGTCTCT 3'
CactusDS-F	5' TGGCGCCCCTAGATGCGGTGATTCGGGCTTTAT 3'
CactusDS-R	5' TGGCGCCCCTAGATGGCAGGGGTAGGGATTCATT 3'
CactusRT-F	5' CTAATCCGAATGAATCCCTACCC 3'
CactusRT-R	5' GACCCACGATCACGGCTAGA 3'
CasparDS-F	5' TGGCGCCCCTAGATGAACCCAGTGGTGATTTCCTCG 3'
CasparDS-R	5' TGGCGCCCCTAGATGATAGCGTTTCATCTGCATCCATC 3'
CasparRT-F	5' CCAAAGAGGAGGCAAGAAAGA 3'
CasparRT-R	5' TTCCGCTTCAAGACGCATA 3'
Cecropina-F	5' TGGCAGTCCTGACCACTGGA 3'
Cecropina-R	5' CTCTCCACTGAACGGTGAACG 3'
Defensina4-F	5' ATCCATCCTTTATGCAACCG 3'

Defensina4-R	5' GCCTTTGAGTCGCAGTATCC 3'
Dorsal-F	5' CAATCTCGTGGGAAAGGATG 3'
Dorsal-R	5' ACCCGGAGAGCTTCTTCAAT 3'
DUOX-F	5' GCGGCAAGACGGAAGACAA 3'
DUOX-R	5' TCTCAACAAGGGAACGCATCA 3'
PiasDS-F	5' TGGCGCCCCTAGATGAGGAGGATGCAGACTGCGATAT 3'
PiasDS-R	5' TGGCGCCCCTAGATGCAGTGGGTTTCCGTTCATTCA 3'
PiasRT-F	5' GCCACAAGGGTTGAGCACAT 3'
PiasRT-R	5' GACACTGCTTCCCGTTGACTTT 3'
Relish-2-F	5' ACGGGATTGCTCTGACTACG 3'
Relish-2-R	5' ACGGCTTGTAGGTGAAGTGC 3'
RP49-F	5' GACCGATATGCCAAGCTAAAGCA 3'
RP49-R	5' GGGGAGCATGTGGCGTGTCTT 3'
S8-F	5' CAGCAGCCACAAGGTCGAGAAG 3'
S8-R	5' GGTAGAACTGAAGCTCCGCACC 3'
SHP-1-F	5' TCAGACACAGGAATGGGGAC 3'
SHP-1-R	5' TACGTCTCTCCTCCTTGCCA 3'
T7-Primer	5' CCGTAATACGACTCACTATAGGGTGGCGCCCCTAGATG 3'
WntD-F	5' CGTGTTCCATTCAAACATGC 3'
WntD-R	5' GCGTCCACTATTATCAATGGC 3'

3.13 Eletroforese em gel de agarose

Moléculas de DNAs foram separadas em gel de agarose com brometo de etídio. Este corante é um intercalante de DNA e, quando submetido à luz UV, fluoresce,

permitindo a visualização de bandas e a consequente localização do produto de PCR. A maior parte das eletroforeses foi realizada em gel de 11x14 cm, na concentração de 2,0% (p/v) de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (C₂₁H₂OBrN₃), em tampão TAE 1X e a 100 mV. Após a corrida, os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV (Pharmacia - Pharmacia LKB MacroVue) e fotografados.

3.14 qPCR

A modulação dos genes envolvidos neste trabalho foi quantificada por PCR em tempo real. As reações de qRT-PCR foram preparadas utilizando-se o kit iQTM SYBR Green Supermix (Applied Biosystems), como recomendado pelo fabricante, e executadas na Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems. As medidas de expressão em tempo real foram normalizadas em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Os níveis relativos de RNA foram calculados utilizando-se o método $\Delta\Delta CT$ (quantificação relativa) (Livak & Schmittgen, 2001).

3.15 Alimentação sanguínea e infecção com *L. i. chagasi*

A infecção artificial de fêmeas de *L. longipalpis* foi realizada com sangue de hamster heparinizado. Os insetos se alimentaram através de pele de pinto. Os insetos foram divididos em dois grupos: um dos grupos ingeriu apenas sangue enquanto o outro ingeriu sangue contendo *L. i. chagasi*. A concentração inicial de parasitas por mL foi de 5×10^6 . Um exemplo do esquema de alimentação sanguínea artificial pode ser visualizado abaixo (Figuras 11 e 12).



Figura 11: Exemplo do esquema de alimentação sanguínea artificial.



Figura 12: Visão interna da gaiola de alimentação, mostrando os flebotomíneos se alimentando de sangue de hamster através da pele de pinto.

3.16 Microinjeção de RNA dupla fita

As microinjeções foram realizadas como descrito (Sant'Anna, M. R. et al. 2008). Fêmeas recentemente emergidas de *L. longipalpis* foram injetadas com 32 nl de RNA dupla fita na concentração de 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para cactus ou β -Gal (grupo controle). Após as injeções, os insetos foram mantidos em potes (90% de umidade relativa) e supridos com 70% de solução de sacarose *ad libitum*.



Figura 13: Fotografia ilustrando o aparelho Nanoject II™ para microinjeção.

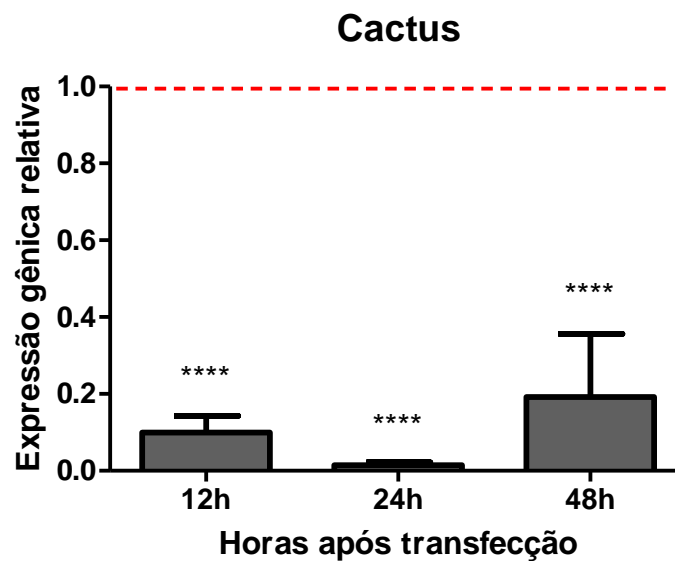
4 RESULTADOS

4.1 Parte I - Silenciamento gênico

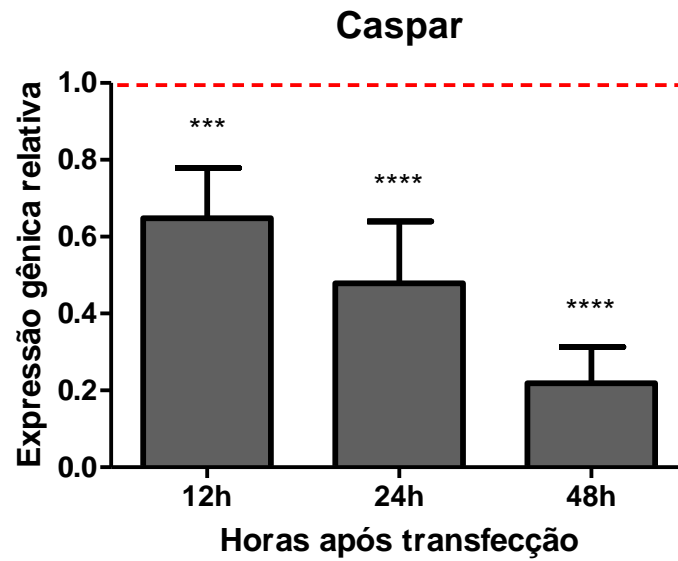
4.1.1 Avaliação do potencial de silenciamento gênico sequência-específica mediado por dupla fita de RNA em células LL5

Para testar o potencial de silenciamento gênico sequência-específica induzido por RNA dupla fita em células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*, transfectamos as células com moléculas de RNA dupla fita para três genes: cactus, caspar e pi3, os quais são descritos na literatura como moléculas repressoras das três principais vias de imunidade em insetos, Toll, Imd e Jak/STAT, respectivamente. As amostras foram obtidas após 12, 24 e 48 horas de incubação com as moléculas de RNA dupla fita. A eficácia do silenciamento gênico induzido por RNA foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real (Figura 14 A, B e C).

(A)



(B)



(C)

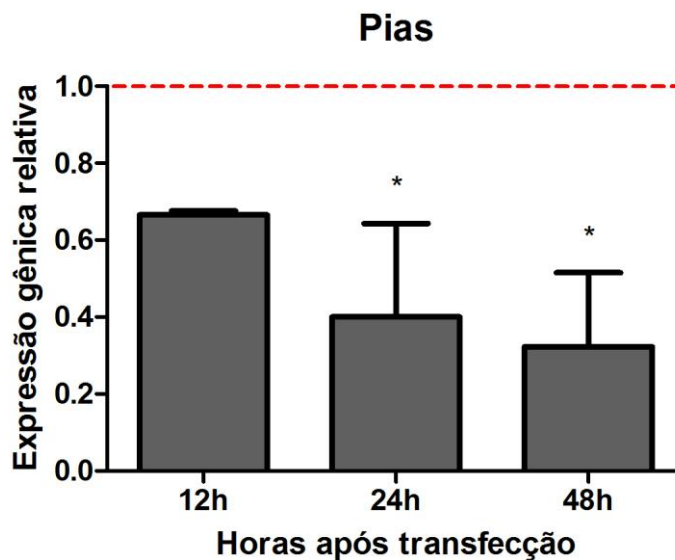


Figura 14: Expressão relativa de cactus, caspar e pias em células LL5 transfectadas com 30 nM de RNA dupla fita utilizando o agente de transfecção DharmaFECT1. Células LL5 foram transfectadas com RNA dupla fita sequência-específica para (A) cactus, (B) caspar, (C) pias e avaliadas quanto à expressão destes genes em 12, 24 e 48 horas após transfecção. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo de células LL5 controle, que foram transfectadas com RNA dupla fita para luciferase. A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam o desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas

comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados em A, B e C são resultados de 3 amostras biológicas independentes e repetidas em triplicata experimental.

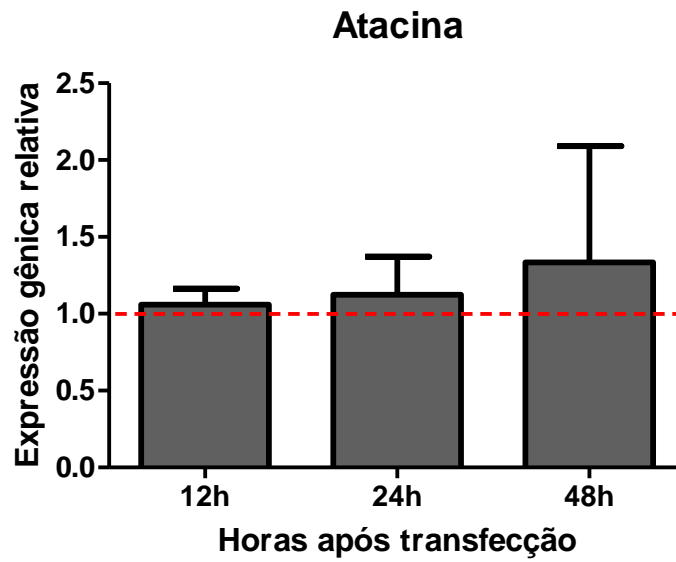
Células LL5 transfectadas com RNA dupla fita sequência-específica para os genes *cactus*, *caspar* e *pias* tiveram redução significativa dos níveis de RNA mensageiro em 12, 24 e 48 horas. Em todos os casos, exceto em 12 horas após transfecção com *pias* (Fig. 14 C) o silenciamento gênico foi eficiente em células LL5. Estes resultados sugerem a existência de um mecanismo de RNA de interferência funcional em células LL5 de *L. longipalpis*.

4.1.2 Análise da expressão de peptídeos antimicrobianos após silenciamento dos reguladores negativos *cactus* e *caspar*

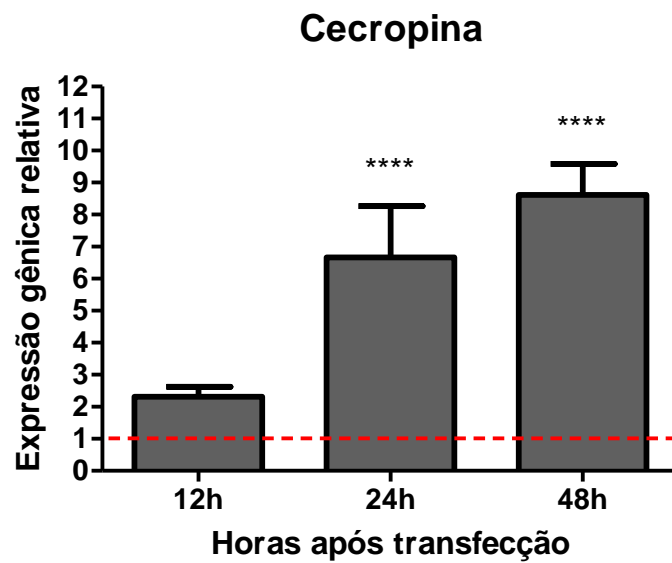
Com o intuito de observar quais peptídeos antimicrobianos estão sendo expressos quando os repressores *cactus* e *caspar* são silenciados em células LL5 de *L. longipalpis* através do mecanismo de RNAi, foram realizados experimentos para avaliar o perfil de expressão gênica por PCR em tempo real para os genes *atacina*, *cecropina* e *defensina 4*. (Figuras 15 e 16).

4.1.2.1 Células LL5 silenciadas para cactus

(A)



(B)



(C)

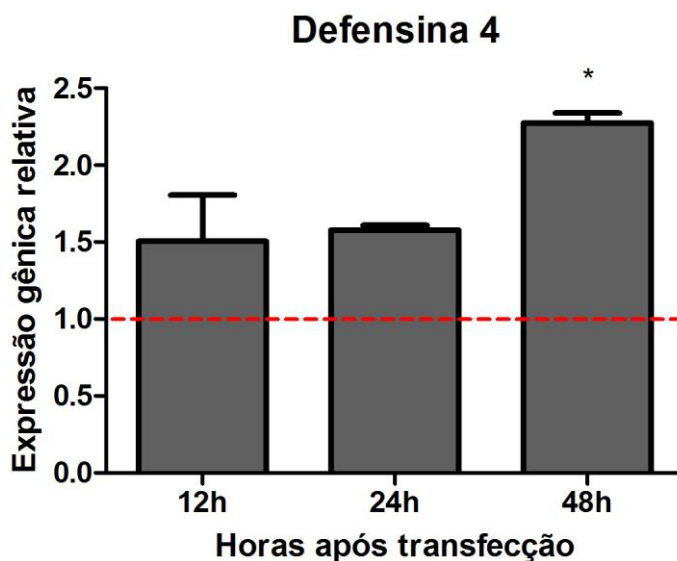
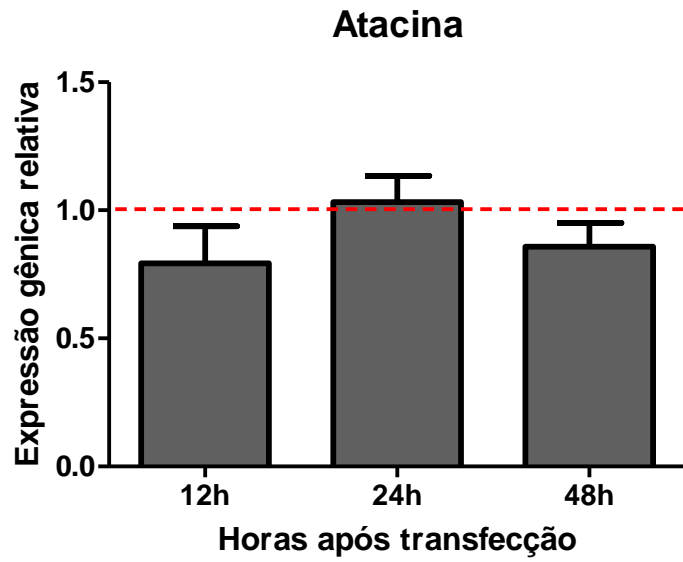


Figura 15: Expressão de peptídeos antimicrobianos em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para atacina, cecropina e defensina 4 nos pontos de 12, 24 e 48 horas após silenciamento de cactus. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes observados no grupo de células LL5 controle, que foram transfectadas com RNA dupla fita para luciferase. A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados em A, B e C são resultados de 3 amostras biológicas independentes e repetidas em duplicata experimental.

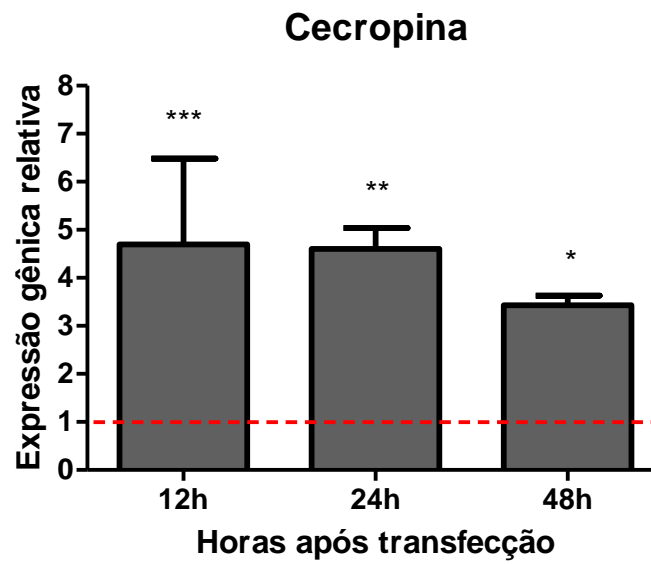
Não houve diferença significativa na expressão do peptídeo antimicrobiano atacina no grupo de células transfectadas com RNA dupla fita para cactus, descrito na literatura como regulador negativo da via Toll em *Drosophila* e *Anopheles* (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Dimopoulos, 2008) quando comparadas ao grupo controle (Fig. 15 A). A expressão de cecropina, contudo, teve aumento significativo em 24 e 48 horas após tratamento por RNA dupla fita. Uma vez que se conseguiu silenciar o repressor da via, pode-se sugerir que cecropina esteja sendo regulada pela via Toll, da qual cactus é o regulador negativo. O peptídeo antimicrobiano defensina 4 também mostrou aumento significativo em 48 horas após tratamento (Fig. 15 C), sugerindo que, assim como cecropina, defensina 4 seja de fato regulada pela via Toll em nosso modelo de estudo.

4.1.2.2 Células LL5 silenciadas para caspar

(A)



(B)



(C)

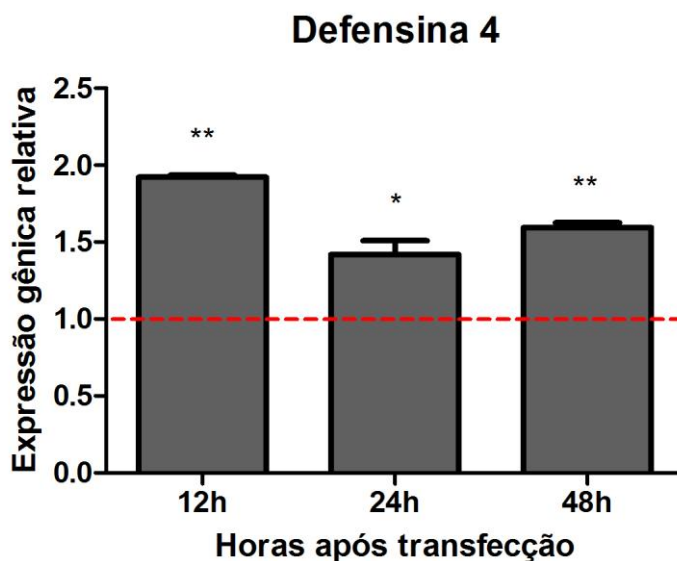


Figura 16: Expressão de peptídeos antimicrobianos em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para caspar. qPCR para atacina, cecropina e defensina 4 nos pontos de 12, 24 e 48 horas após silenciamento de caspar. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes observados no grupo de células LL5 controle, que foram transfectadas com RNA dupla fita para luciferase. A expressão dos genes alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados em A, B e C são resultados de 3 amostras biológicas independentes e repetidas em triplicata experimental.

Assim como nas células transfectadas com RNA dupla fita para cactus, nas amostras silenciadas para o gene caspar não houve diferença significativa em relação ao grupo de células controle no que tange à expressão de atacina (Fig. 16 A). A expressão de cecropina foi significativamente maior em todos os horários observados, mostrando que, quando a via Imd é ativada mediante silenciamento do repressor caspar, o peptídeo antimicrobiano é mais expresso, sugerindo regulação redundante de cecropina tanto pela via Toll (Fig. 15 B) quanto pela via Imd (Fig. 16 B). Defensina 4 também apresentou expressão significativamente mais alta em todos os horários observados, da mesma forma evidenciando regulação redundante tanto pela via Toll (Fig. 15 C) quanto pela via Imd (Fig. 16 C).

4.1.3 Expressão de relish 2 nas amostras silenciadas para caspar

Para demonstrar que de fato as vias foram ativadas mediante silenciamento dos reguladores negativos, nós analisamos a expressão do fator de transcrição da via Imd, relish 2 (Fig. 17).

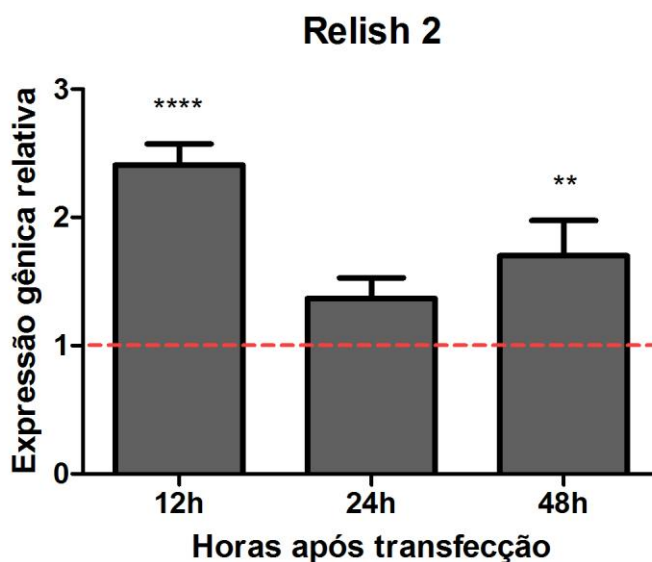


Figura 17: Expressão de relish 2 em células LL5 transfectadas com RNA dupla fita para caspar. qPCR para relish 2 nos pontos de 12, 24 e 48 horas. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de células LL5 controle, que foram transfectadas com RNA dupla fita para luciferase. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 3 amostras biológicas independentes e repetidas em triplicata experimental.

A expressão do fator de transcrição relish 2 foi significativamente mais alta em 12 e 48 horas após o silenciamento do repressor caspar, desta forma evidenciando mais uma vez a ativação da via.

O fato de células LL5 de *L. longipalpis* apresentarem redução dos níveis de RNA mensageiro quando tratadas com RNA dupla fita para cactus, caspar e pias, indica que essa linhagem celular tem um mecanismo funcional de RNA de interferência. Além disso, cecropina e defensina 4 parecem ser regulados pelas vias Toll e Imd em nosso modelo de estudo, sugerindo regulação redundante desses dois peptídeos

antimicrobianos por essas duas vias. Por outro lado, atacina não deu indícios da via pela qual é regulada em nosso modelo.

Nossos resultados indicam LL5 como um bom candidato a modelo em estudos de imunidade para *L. longipalpis*, um importante vetor transmissor da leishmaniose.

4.1.4 Silenciamento gênico em fêmeas de *L. longipalpis*

Com o intuito de correlacionar a expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 à via Toll em insetos adultos, microinjetamos 32 nL de RNA dupla fita para cactus, na concentração de 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, na região torácica de fêmeas de *L. longipalpis* (Fig. 18).

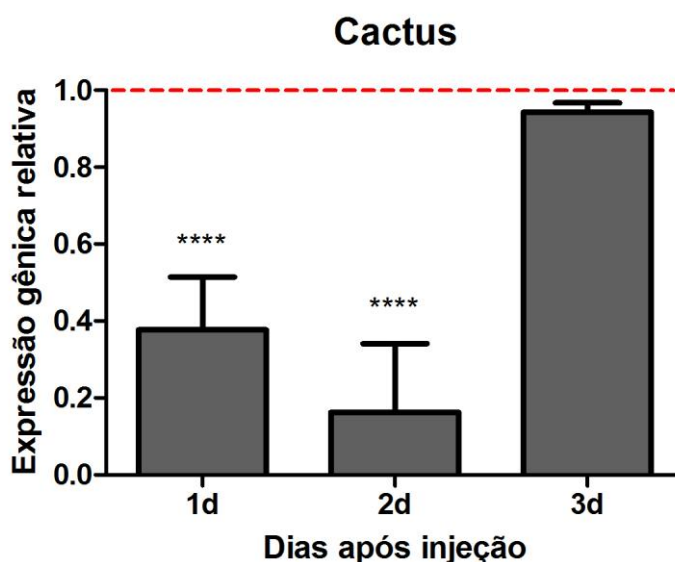


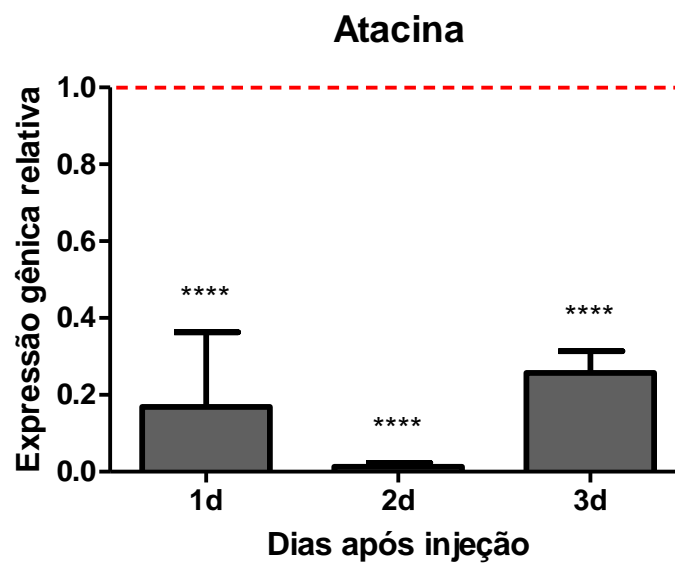
Figura 18: Expressão de cactus em fêmeas de *L. longipalpis* microinjetadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para cactus mostrando a expressão do gene após a injeção em 1, 2 e 3 dias. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 2 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Houve redução dos níveis de RNA mensageiro para cactus após 1 e 2 dias da microinjeção e recuperação dos níveis de expressão deste gene a partir do terceiro dia,

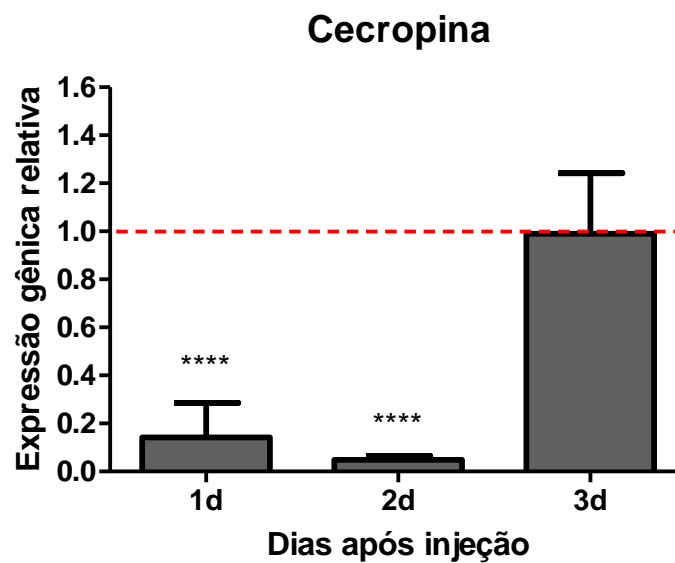
demonstrando que o silenciamento em fêmeas de *L. longipalpis* mediante microinjeção foi bem sucedido.

4.1.5 Análise da expressão de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de *L. longipalpis* silenciadas para cactus

(A)



(B)



(C)

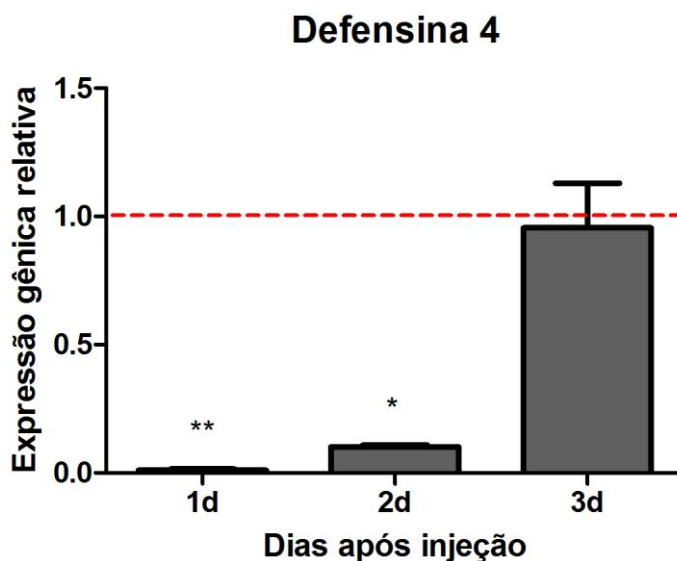


Figura 19: Expressão relativa de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de *L. longipalpis* microinjetadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para atacina e cecropina mostrando a expressão dos genes após a injeção em 1, 2 e 3 dias. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. A expressão dos genes alvos foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 2 amostras biológicas repetidas em triplicata experimental.

Diferentemente do que esperávamos, os três peptídeos antimicrobianos observados apresentaram diminuição dos níveis de RNA mensageiro após silenciamento do repressor cactus no primeiro e segundo dias. Os AMPs cecropina e defensina 4 mostraram tendência à recuperação dos níveis de expressão a partir do terceiro dia.

4.1.6 Investigação de um possível mecanismo de alça de regulação negativa na via Toll

No intuito de tentar compreender o motivo pelo qual os AMPs atacina, cecropina e defensina 4 apresentaram regulação negativa quando do silenciamento de cactus, nós

verificamos os níveis de expressão de WntD gene quando cactus foi silenciado (Fig. 20).

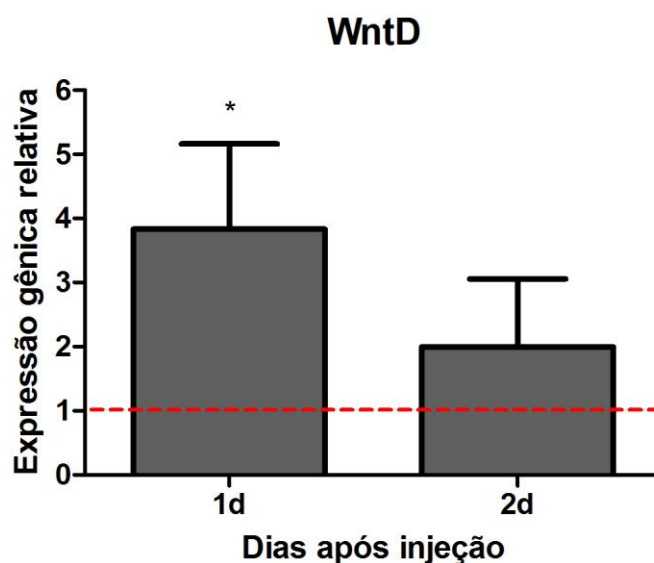


Figura 20: Expressão relativa de WntD em fêmeas de *L. longipalpis* microinjetadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para WntD mostrando a expressão do gene após a injeção em 1 e 2 dias. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 2 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Conforme previsto com base na literatura, o gene WntD demonstrou regulação positiva nos dois primeiros dias após silenciamento do repressor cactus, isto é, quando a via estava supostamente ativada, sugerindo um mecanismo de alça de regulação negativa na via Toll em fêmeas de *L. longipalpis*, após microinjeção.

Em seguida, nós verificamos os níveis de expressão do fator de transcrição dorsal (Fig. 21), para verificar se a inibição da via foi correspondente a uma consequente diminuição dos níveis de RNA mensageiro para dorsal.

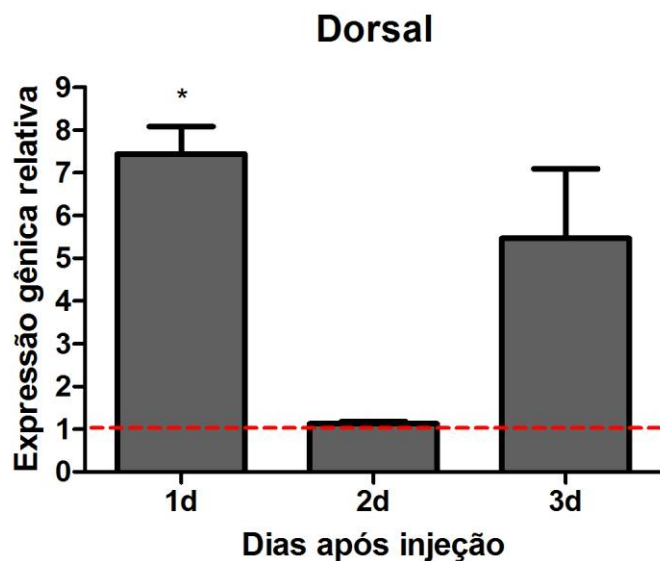


Figura 21: Expressão relativa de dorsal em fêmeas de *L. longipalpis* microinjetadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para dorsal mostrando a expressão do gene após a injeção em 1, 2 e 3 dias. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 2 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

O fator de transcrição da família NF- κ B, dorsal, mostrou aumento dos níveis de expressão no primeiro e terceiro dias. Sabe-se que o próprio dorsal ativa a transcrição de WntD e este, em seguida, inibe a acumulação nuclear de dorsal (Aggarwal & Silverman, 2008). Portanto, os níveis de expressão de WntD e Dorsal são coerentes com a diminuição dos AMPs e sugere a existência de um mecanismo de alça de regulação negativa na via Toll, em fêmeas de *L. longipalpis*, quando a via é ativada por silenciamento e na ausência de estímulo.

Para tentar entender por que o inseto estaria ativando essa alça de regulação negativa, nós propusemos que o motivo seria a preservação da microbiota, de modo que a ativação da via, na ausência de estímulo imune, prejudicaria a saúde do inseto quando da diminuição da microbiota, além do gasto energético e de efeitos colaterais da ativação imune. Assim sendo, avaliamos o efeito do silenciamento de cactus na microbiota bacteriana através de PCR em tempo real com oligonucleotídeos capazes de amplificar o RNA ribossomal 16S de bactérias (Fig. 22).

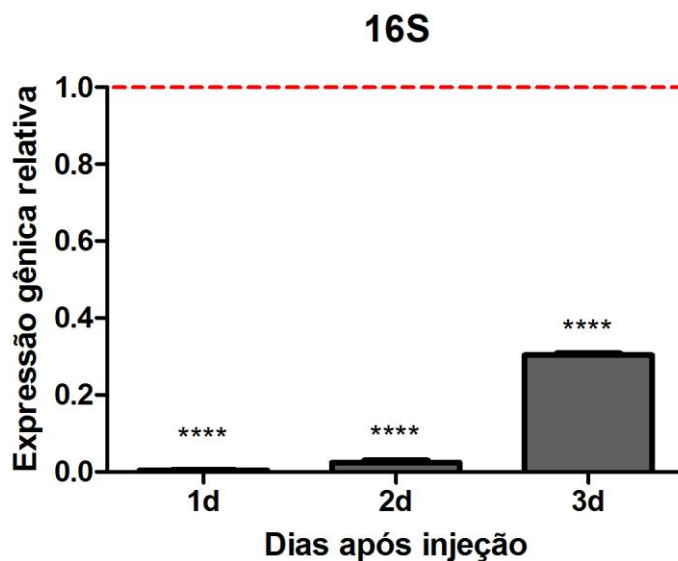


Figura 22: Expressão relativa de 16S em fêmeas de *L. longipalpis* microinjetadas com RNA dupla fita para cactus. qPCR para 16S mostrando a expressão do gene após a injeção em 1, 2 e 3 dias. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 2 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

De fato, foi observada diminuição da microbiota bacteriana nos 3 dias que seguiram o silenciamento de cactus. Pode-se notar, contudo, uma tendência, a partir do terceiro dia, de recuperação da microbiota.

4.2 Parte II - Infecção

4.2.1 Infecção de *L. longipalpis* por *L. i. chagasi*

No intuito de avaliar aspectos da resposta imune de *L. longipalpis* frente à infecção pelo parasita *L. i. chagasi*, realizamos infecção artificial e utilizamos insetos alimentados somente com sangue como controle. Em seguida avaliamos a expressão de cactus até o quarto dia quando o flebotomíneo foi exposto ao parasita (Fig. 23).

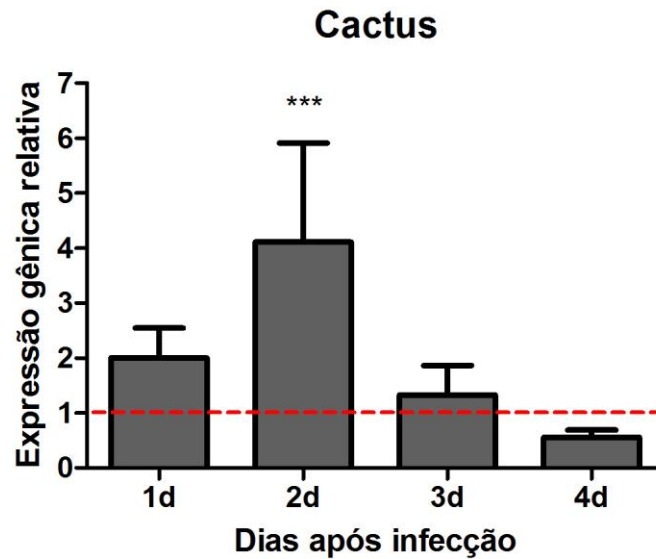


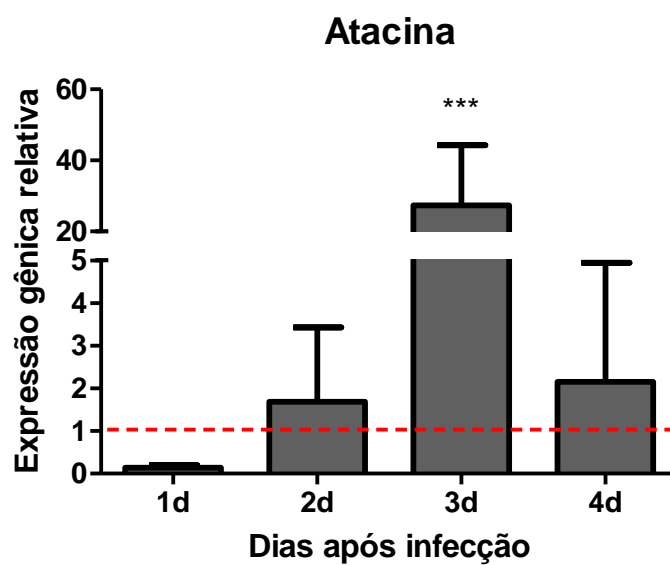
Figura 23: Expressão relativa de cactus em fêmeas de *L longipalpis* infectadas pelo parasita *L. infantum chagasi*. qPCR para cactus mostrando a expressão do gene após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram alimentados apenas com sangue. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Houve aumento significativo da expressão de cactus após dois dias da infecção artificial (Fig. 23), sugerindo participação do parasita *L. i. chagasi* no aspecto observado. Tal fato indica que a via Toll ficou menos ativa no primeiro e segundo dia após infecção e que em seguida se mostrou mais ativa, uma vez que se observou um retorno da expressão do repressor no terceiro e um decréscimo a partir do quarto dia, apesar deste resultado não ter sido estatisticamente significativo.

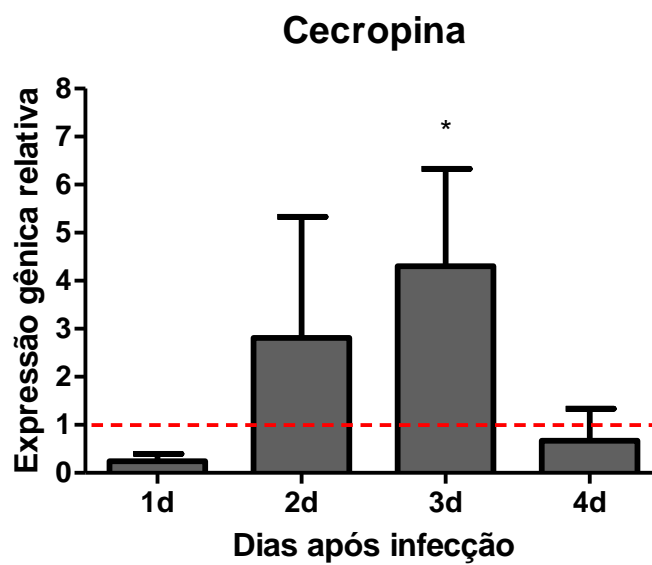
4.2.2 Análise dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 frente à infecção pelo parasita *L. i. chagasi*

Uma vez que foi observada modulação da expressão do regulador negativo da via Toll (cactus), investigamos o comportamento dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 quando da infecção por *Leishmania* (Fig. 24 A, B e C).

(A)



(B)



(C)

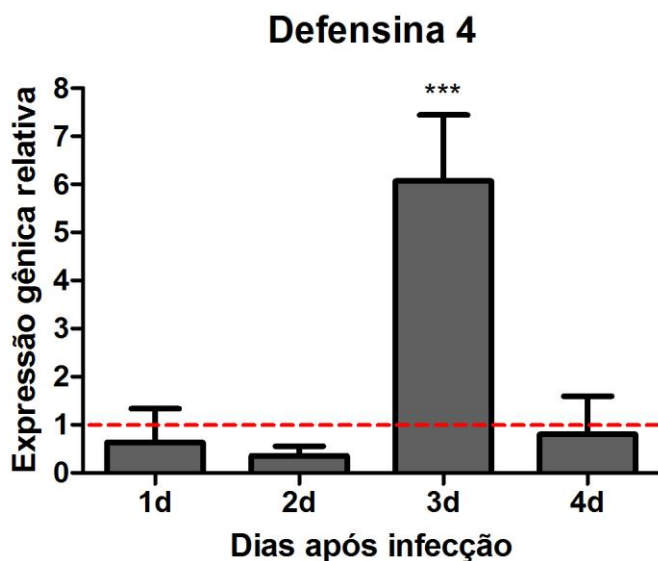


Figura 24: Expressão relativa de atacina, cecropina e defensina 4 em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas por *L. i. chagasi*. qPCR para atacina, cecropina e defensina 4 mostrando a expressão dos genes após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram alimentados apenas com sangue. A expressão dos genes alvos foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Pode-se observar aumento significativo na expressão dos três AMPs em 72 horas após infecção artificial. Este fenômeno pode estar associado ao evento de degradação da matriz peritrófica e o conseqüente contato físico entre o parasita e o epitélio intestinal do intestino médio do flebotomíneo.

4.2.3 Efeitos da infecção sobre a microbiota bacteriana

No intuito de correlacionar os dados apresentados com a proliferação da microbiota bacteriana presente no tubo digestivo de *L. longipalpis*, realizamos experimentos de PCR em tempo real com oligonucleotídeos capazes de amplificar o RNA ribossomal 16S de bactérias (Fig. 25).

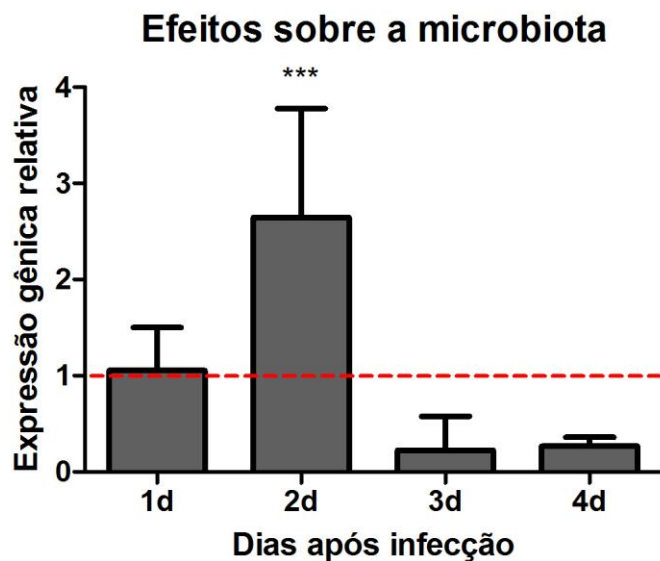


Figura 25: Efeitos sobre a microbiota em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas pelo parasita *L. i. chagasi*. qPCR para o RNA ribossomal 16S mostrando a modulação da microbiota bacteriana após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram alimentados apenas com sangue. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

O perfil da microbiota bacteriana foi coerente com os resultados apresentados anteriormente (Fig. 23 e 24). Os momentos de maior e menor proliferação bacteriana no tubo digestivo dos flebotomíneos coincidem com o perfil de expressão de cactus, sugerindo uma modulação direta da microbiota bacteriana pela via Toll. Os pontos de maior expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4, em 72 horas, também são coerentes com a queda nos níveis de 16S bacteriano no terceiro dia, observados na figura 21.

4.2.4 Avaliação da carga parasitária durante a infecção

Os resultados anteriores nos conduziram ao questionamento sobre a modulação da carga parasitária durante a infecção. Para responder esta pergunta, foram desenhados

oligonucleotídeos capazes de amplificar o gene 8S de *Leishmania*, desta forma foi possível avaliar os níveis do parasita quando da infecção (Fig. 26)

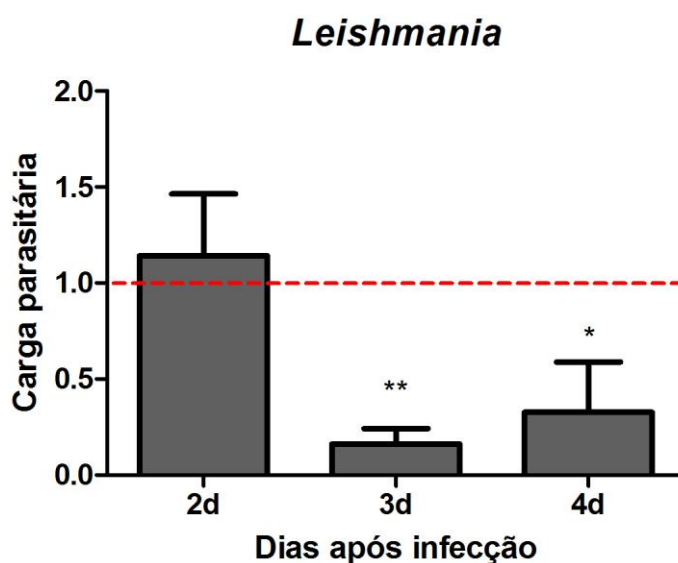


Figura 26: Modulação da carga parasitária em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas pelo parasita *L. i. chagasi*. qPCR para a proteína ribossomal 8S mostrando a modulação de *Leishmania* após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos após 24 horas de infecção. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Como esperávamos, a carga parasitária sofre uma queda brusca a partir do terceiro dia, sendo estatisticamente significativo nos terceiro e quarto dias. Tal fato pode ser explicado, em parte, pela excreção do conteúdo digestivo a partir de 72 horas. Além disso, nós também acreditamos que o aumento da expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 após 72 horas de infecção possa exercer influência no resultado observado.

4.2.5 Investigação de um provável candidato em *L. i. chagasi* capaz de inibir a via Toll em *L. longipalpis*

Foi realizado um BLAST da sequência nucleotídica de SHP-1, de mamífero, contra o banco de dados de *L. longipalpis* (VectorBase), tornando possível o desenho de oligonucleotídeos específicos para este gene. Com isso, nós checamos como SHP-1 foi modulado em *L. longipalpis* durante a infecção por *L. i. chagasi* (Fig. 27).

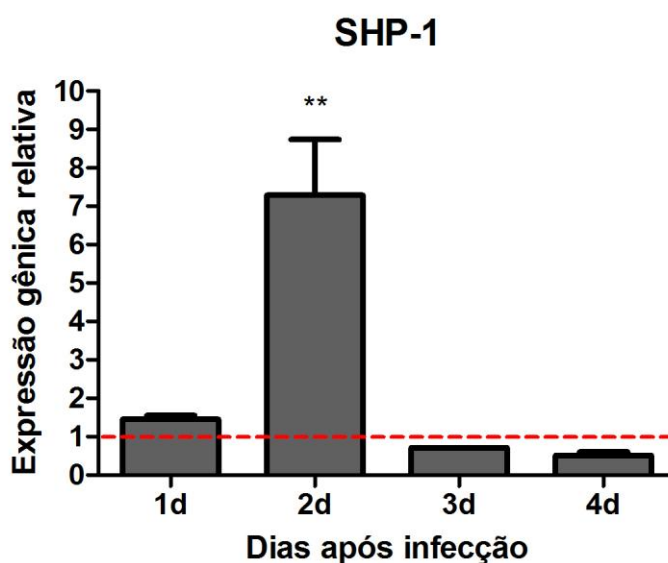


Figura 27: Expressão relativa de SHP-1 em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas pelo parasita *L. i. chagasi*. qPCR para SHP-1 mostrando a expressão do gene após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram alimentados apenas com sangue. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

O SHP-1, de *L. longipalpis*, foi modulado durante a infecção, com aumento significativo da expressão em 48 horas.

4.2.6 Avaliação do papel de DUOX durante a infecção de *L. longipalpis* por *L. i. chagasi*

Para investigar se a presença do parasita poderia provocar modulação da expressão de DUOX, enzima associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), nós verificamos a expressão deste gene durante a infecção (Fig. 28)

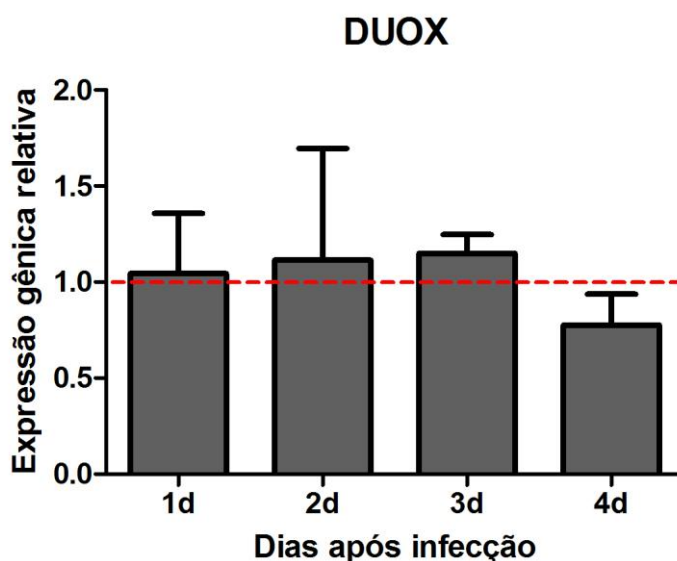


Figura 28: Expressão relativa de DUOX em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas pelo parasita *L. infantum chagasi*. qPCR para DUOX mostrando a expressão do gene após infecção artificial até o quarto dia. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram alimentados apenas com sangue. A expressão do gene alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. Barras no topo de cada coluna representam desvio padrão. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os dados apresentados são resultados de 4 amostras biológicas repetidas em duplicata experimental.

Com base em nossos resultados, não foi possível correlacionar a presença do parasita, durante a infecção, com uma resposta relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio.

5 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores já demonstraram a importância do uso de linhagens celulares de insetos para compreensão de mecanismos imunológicos, mostrando ser possível, portanto, adotar um modelo experimental simples a fim de responder perguntas científicas específicas. Por exemplo, células C7-10 e Aag-2, de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, respectivamente, apresentaram expressão de diversos fatores da resposta imune, incluindo transferrina, lisozima, cecropina e defensina (Fallon & Sun, 2000). Em acréscimo, estudos posteriores mostraram que o perfil de expressão de genes de imunidade em linhagem celular Aag-2 em resposta a diferentes estímulos imunes são semelhantes quando comparados ao correspondente adulto *Aedes aegypti* (Barletta et al., 2012)

O mecanismo de RNAi já foi observado em vários organismos, tais como plantas, vermes, artrópodes e mamíferos, sendo mais bem relatado em *Drosophila* e *C. elegans*, organismos-modelos para os quais já foram identificadas a maioria das proteínas que envolvem a maquinaria de RNAi (Ghildiyal & Zamore 2009). No que diz respeito ao mecanismo de RNAi, linhagens celulares de insetos também já foram utilizadas para compreensão do que se sabe atualmente, especialmente células S2 de *D. melanogaster*, as quais demonstraram silenciamento gênico facilmente induzido por RNA dupla fita sequência específica (van Rij et al., 2006).

Contudo, em células C6/36, de *A. albopictus*, não foi observado um perfil de ativação do mecanismo de RNAi quando estas foram comparadas às células S2 de *D. melanogaster*, indicando que essa linhagem celular apresenta disfunção da via de RNAi quando submetida ao desafio por vírus (Vírus do Oeste do Nilo [Flaviviridae], Sindbis virus [SINV, Togaviridae] e La Crosse virus [LACV, Bunyaviridae]) (Brackney et al. 2010).

Em *L. longipalpis*, foi observada uma resposta antiviral não específica após transfecção de células LL5 em cultura com vários RNAs de dupla fita, mostrando diferença em comparação ao mecanismo de mosquito (Pitaluga et al. 2008). O mesmo tipo de resposta antiviral foi identificado no crustáceo *Litopenaeus vannamei* (Robalino et al. 2004).

Apesar da via de RNAi ter sido demonstrada em outros organismos, este mecanismo ainda não foi bem estudado em *L. longipalpis*. Neste trabalho avaliamos a capacidade das células LL5 de *L. longipalpis* em responder ao tratamento com RNA dupla fita diminuindo a expressão dos genes alvo através do mecanismo de RNA de interferência.

Observamos que células LL5 transfectadas com RNA dupla fita sequência-específica para os genes *cactus*, *caspar* e *pias* tiveram redução dos níveis de RNA mensageiro após transfecção. Nossos resultados sugerem a existência de um mecanismo de RNAi funcional em células LL5 de *L. longipalpis* baseado no silenciamento de *cactus*, *caspar* e *pias* após transfecção de dsRNA dos respectivos genes. Com isso, validamos as células LL5 como modelo para estudos relacionados tanto à via de RNAi quanto ao silenciamento gênico baseado em dsRNA.

Após concluir que a via de RNAi é funcional em células LL5, correlacionamos quais vias de imunidade (Tol e Imd) são responsáveis pela ativação de peptídeos antimicrobianos como atacina, cecropina e defensina 4.

Atualmente, os dados sobre as vias de imunidade em flebotomíneos são escassos. As informações gerais sobre o funcionamento do sistema imune de insetos são basicamente inferidas a partir de estudos em *Drosophila* e em mosquitos, como *Aedes* e *Anopheles*. Em fêmeas de *L. longipalpis* foi observado que *caspar*, repressor da via Imd, é diferencialmente expresso quando o inseto é alimentado com bactérias Gram positivas e Gram negativas. No mesmo trabalho, a técnica de RNAi foi usada para depletar a expressão de *caspar* em fêmeas de *L. longipalpis*, as quais foram subsequentemente infectadas com duas espécies de *Leishmania* (*L. infantum* e *L. mexicana*). Interessantemente, no grupo de flebotomos para os quais houve silenciamento de *caspar*, a quantidade de parasitos no intestino foi reduzida (Telleria et al. 2012), demonstrando pela primeira vez o papel das vias de imunidade no controle da infecção por *Leishmania* em *L. Longipalpis*.

Nossos dados em células LL5 de *L. longipalpis* apontam para uma regulação redundante dos peptídeos antimicrobianos cecropina e defensina 4 pelas vias Toll e Imd. De maneira geral todas as vias (Toll, Imd, e JAK/STAT) compartilham alguns genes em comum como alvo (Boutros et al. 2002). Em 2006, Luna e colaboradores demonstraram que em células MSQ43 de *Anopheles stephensi* cecropina 1 e defensina 1 também são regulados pelas vias Toll e Imd, mais uma vez reforçando o fato de que alguns

peptídeos antimicrobianos não são regulados de maneira exclusiva pelas vias de imunidade em alguns insetos

Os resultados apresentados para o peptídeo antimicrobiano atacina, em células LL5, não foram conclusivos em relação à via pela qual este AMP é regulado em nosso modelo de estudo.

O fator de transcrição da via Imd, Relish 2, também mostrou aumento dos níveis de expressão quando do silenciamento do repressor caspar, mais uma vez reforçando o conceito de ativação das vias imunes através do silenciamento de reguladores negativos.

Recentemente, em insetos adultos de *L. longipalpis*, foi observado redução da expressão de tripsina 1 (Sant'Anna et al. 2009), xantina desidrogenase (Sant'Anna et al. 2008) e caspar (Telleria et al. 2012) após micro-injeção com dsRNAs específicos. Apesar de outros grupos já terem obtido eficiência no silenciamento gênico mediado por dupla fita de RNA, em insetos adultos de *L. longipalpis*, contudo, ainda não houve uma tentativa para se correlacionar a expressão de peptídeos antimicrobianos às vias pelas quais eles são regulados. Conforme se observa na figura 18 deste trabalho, houve redução significativa dos níveis de RNA mensageiro de cactus, demonstrando, portanto, que houve êxito quando do silenciamento. Curiosamente, a expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 foi regulada negativamente quando o repressor foi depletado.

O gene WntD foi identificado como um membro da família Wnt de *Drosophila*, baseado em uma pesquisa genômica para genes relacionados a Wnt (sinônimos: CG8458 e wnt8). Em *Drosophila*, WntD atua como um inibidor da translocação do fator de transcrição dorsal para o núcleo (Gordon et al., 2005), e é o próprio dorsal que ativa a transcrição de WntD que, em seguida, inibe a acumulação nuclear de dorsal (Aggarwal & Silverman, 2008) (Fig. 29).

Em nossos resultados, interessantemente, a expressão de WntD esteve aumentada nos dois primeiros dias após silenciamento do repressor cactus, isto é, quando a via estava supostamente ativada. O fator de transcrição da família NF- κ B, dorsal, por sua vez, mostrou aumento dos níveis de expressão no primeiro e terceiro dias. Portanto, os níveis de expressão de WntD e dorsal são coerentes com a diminuição dos AMPs e sugere a existência de um mecanismo de alça de regulação negativa na via Toll, em fêmeas de *L. longipalpis*, quando a via é possivelmente ativada em função do silenciamento do repressor cactus e na ausência de estímulo imune.

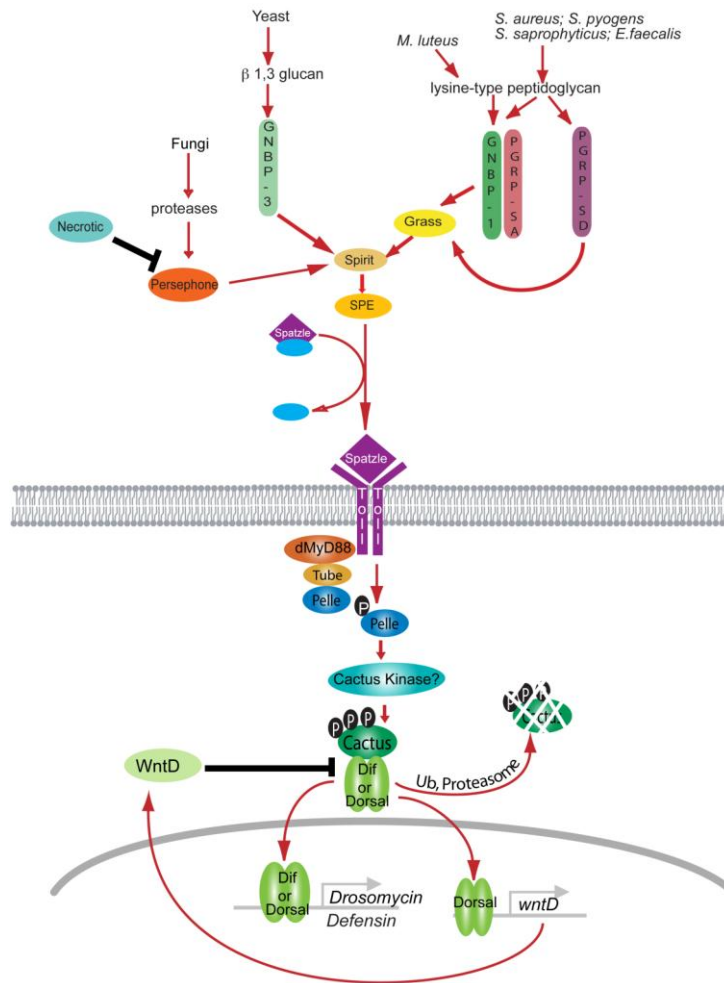


Figura 29: Modelo esquemático mostrando a alça de regulação negativa descrita em *D. melanogaster* relativa à via Toll (Aggarwal & Silverman, 2008).

Uma vez que houve uma queda brusca da microbiota bacteriana quando da suposta ativação da via, nós propomos que o mecanismo de alça de regulação negativa, possivelmente atuante neste caso, poderia ser ativado de modo a preservar a microbiota de uma superativação da via na ausência de estímulo imune, além do dispendioso gasto energético e de efeitos colaterais oriundos da ativação imune. Embora a queda da microbiota não possa ser explicada pela diminuição da expressão de AMPs nos pontos observados, nós acreditamos que uma superativação da via ocorreu anteriormente a 24 horas do silenciamento, ativando a alça de regulação negativa e modulando negativamente a expressão dos genes efetores.

A análise do perfil de expressão dos genes de imunidade avaliados até o momento quando o inseto é infectado nos possibilita importantes questionamentos sobre

os aspectos interativos entre o hospedeiro invertebrado *L. longipalpis* e o parasita *L. i. chagasi*.

Quando avaliamos a expressão de cactus durante a infecção, fica evidente uma suposta inibição da via Toll, em 48 horas, sugerindo que, de algum modo, o parasita esteja contribuindo para tal fenômeno. A protease de superfície Gp63 expressa por *Leishmania* é capaz de ativar a tirosina fosfatase SHP-1 de macrófagos, que por sua vez inibe importantes componentes das vias Toll e Jak/STAT (Blanchette et al., 1999) (Fig. 30). Surpreendentemente, a expressão de SHP-1 de *L. longipalpis* foi modulada durante a infecção, com aumento significativo da expressão em 48 horas. Este resultado sugere que, assim como em macrófagos, Gp63 de *Leishmania* ativa SHP-1 do hospedeiro invertebrado e, com isso, inibe a via Toll, possivelmente imunossuprimindo o flebotomíneo. Além disso, foi relatado que *L. longipalpis* infectado com *L. amazonensis* superexpressando Gp63 apresentou aumento significativo do percentual de infecção, ao passo que nos insetos infectados com a cepa subexpressando Gp63 houve uma diminuição dos níveis de infecção (Hajmová et al., 2004), evidenciando pela primeira vez um possível envolvimento de Gp63 no estabelecimento da infecção. Recentemente, foi visto que Gp63 é liberada por exossomos de cultura de macrófagos infectados com *L. mexicana*, e que esses exossomos, oriundos de macrófagos infectados, são capazes de aumentar a expressão de uma série de proteínas de macrófagos em cultura não infectados, inclusive SHP-1 (Hassani & Olivier, 2013).

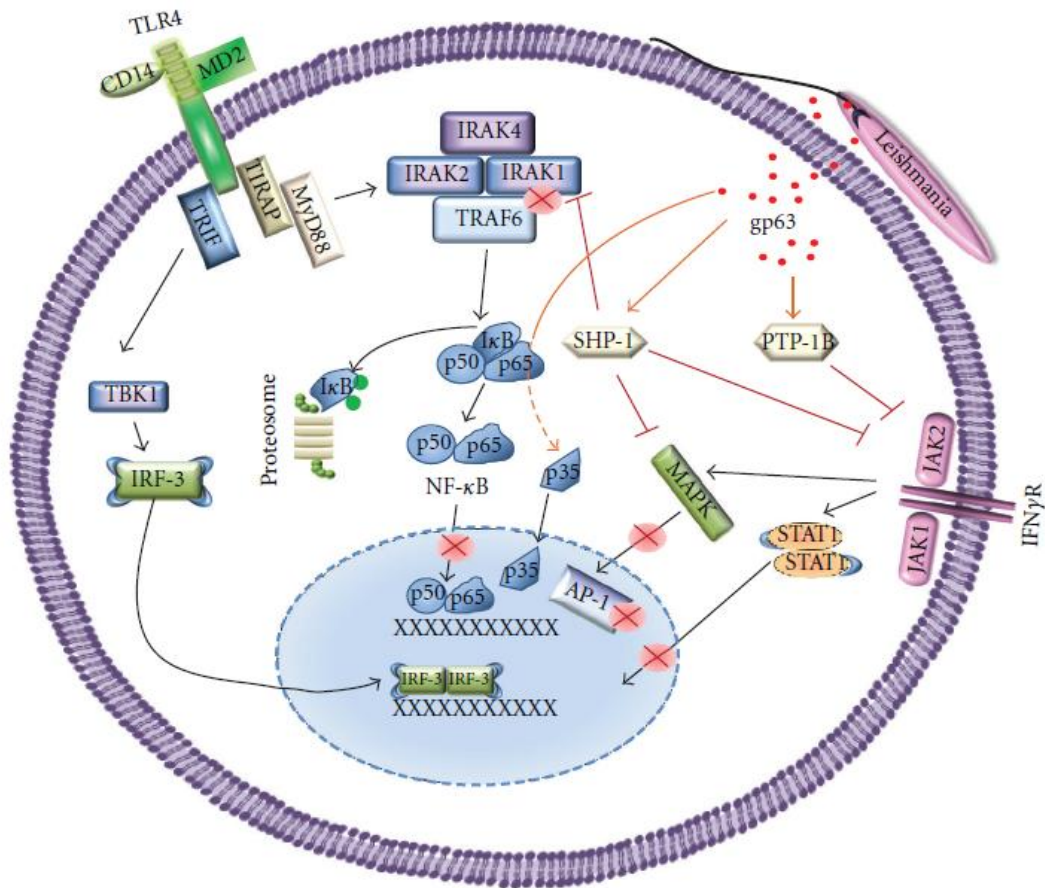


Figura 30: Esquema ilustrativo mostrando a introdução de Gp63, por *Leishmania*, e a consequente ativação de SHP-1, culminando com a inibição de componentes das vias Toll e Jak/STAT (Shio et al., 2012).

Este é o primeiro relato de um possível envolvimento de Gp63 de *Leishmania* na modulação da capacidade de resposta imune do hospedeiro invertebrado.

A análise do perfil de expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 mostrou aumento significativo da expressão desses genes em 72 horas após infecção, momento no qual a matriz peritrófica é degradada pela ação de quitinases e o parasita interage diretamente com o epitélio do intestino médio do flebotomíneo. A observada diminuição da carga parasitária em 72 horas (Fig. 26) nos motiva a pensar que o aumento de expressão dos AMPs possa de fato causar impactos na sobrevivência do parasita durante a infecção.

A modulação da microbiota bacteriana durante a infecção foi coerente com os resultados observados para cactus e para os AMPs (Fig. 23 e 24). Os momentos de maior e menor proliferação bacteriana no tubo digestivo dos flebotomíneos coincidem

com o perfil de expressão de cactus, sugerindo uma modulação direta da microbiota bacteriana pela via Toll. Além disso, os pontos de maior expressão dos peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4, em 72 horas, também são coerentes com a queda nos níveis de 16S bacteriano no terceiro dia.

Aparentemente a presença do parasita *L. i. chagasi* não estimula um aumento da expressão de DUOX, sistema enzimático capaz de produzir espécies reativas de oxigênio, durante a infecção em *L. longipalpis*. Nossos resultados complementam trabalhos anteriores que mostram que a infecção de *L. longipalpis* por *L. mexicana* não foi associada a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Diaz-Albiter et al., 2012).

Diante dos dados que este trabalho oferece, é intrigante notar que muitas questões acerca da interação entre *L. longipalpis* e *L. i. chagasi* ainda precisam ser esclarecidas. No entanto, o presente estudo fornece bases para uma melhor compreensão sobre a interação parasito-vetor, uma vez que visa elucidar aspectos da imunologia de *L. longipalpis* e da interação com o parasita *L. i. chagasi*. Esperamos que os resultados obtidos a partir deste trabalho possam contribuir para uma compreensão mais profunda da imunidade de insetos vetores e que, em breve, possam ajudar no desenvolvimento de estratégias para prevenção de leishmanioses, influenciando diretamente na qualidade de vida de parte da população brasileira.

6 CONCLUSÕES

- Células LL5 de *L. longipalpis* têm um mecanismo funcional de RNA de interferência;
- Cecropina e defensina 4 apresentaram regulação redundante pelas vias Toll e Imd;
- O silenciamento gênico sequência-específica de cactus se mostrou eficiente em fêmeas de *L. longipalpis*;
- Nossos resultados sugerem a existência de um mecanismo de alça de regulação negativa da via Toll, em fêmeas de *L. longipalpis*, quando a via é ativada por silenciamento do repressor cactus e na ausência de estímulo imune;
- Assim como foi observado em macrófagos, nossos resultados sugerem que a *Leishmania* ativa SHP-1, do hospedeiro invertebrado e, com isso, inibe a via Toll, imunossuprimindo o flebotomíneo;
- A diminuição da carga parasitária a partir do terceiro dia indica que o aumento de expressão dos peptídeos antimicrobianos em 72 horas possa de fato causar impactos na sobrevivência do parasita durante a infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggarwal K, Silverman N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Rep.* 2008 Apr 30;41(4):267-77.
2. Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol.* 2006 Jun 25;124(1):12-25. Epub 2006 Jan 18.
3. Barletta AB, Silva MC, Sorgine MH. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasit Vectors.* 2012 Jul 24;5:148. doi: 10.1186/1756-3305-5-148.
4. Belvin, M.P. and Anderson, K.V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 393–416.
5. Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3737-44.
6. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med.* 2003 Sep;254(3):197-215.
7. Boutros, M., Agaisse, H. and Perrimon, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2002;3, 711-722.
8. Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, Mudge J, Wilusz J, Olson KE, Blair CD, Ebel GD. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Oct 26;4(10):e856.
9. Brazil, R.P.; Brazil, B.G.. *Biologia de Flebotomíneos Neotropicais*. In: Rangel, EF; Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*. 1ª Ed. FIOCRUZ, 2003, p.257-270.
10. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 1999 Jun-Jul;23(4-5):329-44.
11. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 1999 Jun-Jul;23(4-5):329-44.
12. CDC, 2007 em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>

13. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 2004 Apr;198:127-48.
14. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 2004 Apr;198:127-48.
15. Costa A, Jan E, Sarnow P, Schneider D. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS One.* 2009 Oct 15;4(10):e7436.
16. Deane LM, Deane MP. Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em uma zona endêmica do Estado do Ceará. I. distribuição, predominância e variação estacional. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, n. 15, v. 1, p. 83-95, abr. 1955.
17. Diaz-Albiter H, Sant'Anna MR, Genta FA, Dillon RJ. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the sand phlebotomine fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem.* 2012 Jul 6;287(28):23995-4003. doi: 10.1074/jbc.M112.376095. Epub 2012 May 29.
18. Fallon AM, Sun D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001 Mar 1;31(3):263-78.
19. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998).
20. Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* 2005 Jul;3(7):e236. Epub 2005 May 24.
21. Fritz JH, Girardin SE, Philpott DJ. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE.* 2006 Jun 13;2006(339):pe27.
22. Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in *Drosophila* development and immunity. *Nature.* 2005 Sep 29;437(7059):746-9. Epub 2005 Aug 17.
23. Hajmová M, Chang KP, Kolli B, Volf P. Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microbes Infect.* 2004 Jun;6(7):646-9.

24. Hassani K, Olivier M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 2;7(5):e2185. doi: 10.1371/journal.pntd.0002185. Print 2013.
25. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):121-6.
26. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):121-6.
27. Hoffmann, JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):33-8.
28. Hultmark 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol*. 2003 Feb;15(1):12-9.
29. Jacobs-Lorena M e Oo MM. The peritrophic matrix of insects. In: Beaty BJ,Marquardt C. *The biology of disease vectors*. Colorado. University Press, 1996. p318-322
30. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):439-45. Epub 2006 Jul 14.
31. Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., and Olson, K.E. 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101: 17240–17245.
32. Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Jul-Sep;82(3):421-4.
33. Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA, Bulet P. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J Biol Chem*. 2001 Feb 9;276(6):4085-92. Epub 2000 Oct 26.
34. Lehane M. *Biology of blood-sucking insects*. London: Haper-Collins Academic, 1991. 288p.
35. Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*. 1997;42:525-50.
36. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:697-743.

37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
38. Luna C, Hoa NT, Lin H, Zhang L, Nguyen HL, Kanzok SM, Zheng L. Expression of immune responsive genes in cell lines from two different Anopheline species. *Insect Mol Biol*. 2006 Dec;15(6):721-9.
39. Luo H, Dearolf CR. The JAK/STAT pathway and Drosophila development. *Bioessays* 2001;23:1138–1147.
40. Lutz, A. & Neiva, A. – Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. O. Cruz*, 4:84-95, 1912.
41. Medzhitov e Janeway, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):298-300
42. Megha Ghildiyal and Phillip D. Zamore. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Genetics* 10, 94-108 (2009)
43. Meister, G. and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.
44. Michel T, Reichhart J-M, Hoffmann JA, Royet J: Drosophila Toll is activated by Gram positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2001, 414:756-759.
45. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leishmaniose*. Biblioteca Virtual em Saúde, setembro/2007. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/html/pt/dicas/126leishmaniose.html>>
46. Modi, G. B. (1997) Care and maintenance of phlebotomine sandfly colonies, in *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors* (Crampton, J. M., Beard, C. B., and Louis, C., eds) pp. 21–30, Chapman & Hall, London
47. Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997 Oct;115 (Pt 4):359-69.
48. Pimenta PFP, Secundino NFC, Nieves Blanco E. Interação da *Leishmania* - Hospedeiro Invertebrado. In: Elizabeth F. Rangel, Ralph Lainson. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. 01 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, v. , p. 275-289.
49. Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AMR, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko YM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-

infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics*. 2009 Sep;282(3):307-17. Epub 2009 Jun 30.

50. Pitaluga AN, Mason PW, Traub-Cseko YM. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(3):191-7.

51. Ramalho-Ortigao M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, Valenzuela JG. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC Genomics*. 2007 Aug 30;8(1):300 (B)

52. Ready PD. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 1979 Nov 23;16(5):413-23.

53. Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. *Annu Rev Entomol*. 1977;22:219-40.

54. Robalino J, Browdy CL, Prior S, Metz A, Parnell P, Gross P, Warr G: Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J Virol* 2004, 78:10442-10448.

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

56. Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W., Beaty, B.J., Blair, C.D., and Olson, K.E. 2004. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res*. 102: 65–74.

57. Sant'Anna MR¹, Alexander B, Bates PA, Dillon RJ. Gene silencing in phlebotomine sand flies: Xanthine dehydrogenase knock down by dsRNA microinjections. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008 Jun;38(6):652-60. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.03.012. Epub 2008 Apr 4.

58. Sant'Anna MRV, Albiter HD, Mubarak M, Dillon RJ and Bates PA. 2009. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors* 2009, 2:62 doi:10.1186/1756-3305-2-62.

59. 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 U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9944-8.

60. Secundino NF, Araújo MS, Oliveira GH, Massara CL, Carvalho OS, Lanfredi RM, Pimenta PF. Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting

Lutzomyia longipalpis sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. *J Invertebr Pathol.* 2002 May;80(1):35-40.

61. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, Abu-Dayyeh I, Olivier M. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med.* 2012;2012:819512. doi: 10.1155/2012/819512. Epub 2011 Nov 3.
62. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 20;106(42):17841-6.
63. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248. 1981. *J Immunol.* 2009 Jun 1;182(11):6635-7.
64. Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigao-Farias JR, de Araujo AP, Ramalho-Ortigao JM, Traub-Cseko YM. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2007 Oct;66(2):53-63.
65. Telleria EL, Sant'anna MR, Ortigão-Farias JR, Pitaluga AN, Dillon VM, Bates PA, Traub-Csekö YM, Dillon RJ. Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in the sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem.* 2012 Feb 28.
66. Tesh RB, Modi GB (1983). Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses. *J Med Entomol* 20:199-202.
67. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *J Neurovirol.* 2003 Dec;9(6):577-83.
68. van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewski C and Andino R. 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2006 20: 2985-2995
69. van Rij, R.P. and Andino, R. 2006. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol.* 24: 186–193.
70. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* 2000;19:2598–2606.