

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

A ação da microbiota nativa de *Lutzomyia longipalpis* no desenvolvimento de *Leishmania*
spp.

por
Thais Bonifácio Campolina

Belo Horizonte
2017

Thais Bonifácio Campolina

A ação da microbiota nativa de *Lutzomyia longipalpis* no desenvolvimento de *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

Belo Horizonte

2017

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

C198a Campolina, Thais Bonifácio.
2017

A ação da microbiota nativa de *Lutzomyia longipalpis* no desenvolvimento de *Leishmania* spp. / Thais Bonifácio Campolina. – Belo Horizonte, 2017.

xiv, 46 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 50 - 60

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/transmissão 2. *Leishmania*/genética 3. Psychodidae/isolamento & purificação 4. Microbiota/fisiologia I. Título. II. Secundino, Nágila Francinete Costa (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

THAIS BONIFÁCIO CAMPOLINA

A AÇÃO DA MICROBIOTA NATIVA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* NO
DESENVOLVIMENTO DE *LEISHMANIA* SPP.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Erika Michalsky Monteiro ((CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna (UFMG) Titular

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares ((CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 16/02/2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Nágila Francinete Costa Secundino, por ter acreditado e confiado em mim, dando-me uma incrível oportunidade profissional. Muito obrigada por todo o aprendizado compartilhado, pelas conversas, pelas dicas e conselhos.

Ao Dr. Paulo Pimenta pelo incentivo profissional e ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG por dividirem comigo suas manhãs e torná-las produtivas cientificamente, agradáveis e divertidas! Agradeço, principalmente, as princesas do LEM pelo carinho e paciência.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, aos professores do CPqRR por todo o ensinamento e suporte.

Agradeço ao meu pai, Evandro que foi meu professor na escola da vida, pelo exemplo de amor e dedicação.

À minha mãe Fabiola (*in memoriam*), poucos foram os anos ao seu lado, mas se cheguei até aqui foi por você!

À minha irmã Olivia, que mais que irmã foi minha melhor amiga, companheira e confidente! Obrigada benzinho!

À Vovó Ely pelo carinho, por ouvir os casos dos meus experimentos mesmo sem entender nada, pela preocupação e por não medir esforços para me ajudar.

À Dani obrigada pelo apoio, conselhos tanto pessoais quanto profissionais!

À Voinha por acreditar e me incentivar sempre!

Aos meus tios e primos, que cada um de sua maneira, estiveram ao meu lado torcendo, ensinando, aconselhando e apoiando, obrigada padrinho Sávio, Neidinha, Tia Séfora, Tio Jêromé, Tia Jôsie, Tio Cici e Tio Miguel por estarem ao meu lado, mostrando-se dispostos a ajudar e a escutar.

À toda minha família pela presença fundamental na minha vida.

À Sarah, por todo carinho, amor, paciência e momentos de pura felicidade. Obrigada Marluce e Matheus por terem me recebido de braços abertos.

Agradeço a todos os meus amigos e a melhor turma de mestrado do CPqRR. Obrigada por todas as saídas, festas e momentos de diversão e descontração.

À toda a equipe do CPqRR/Fiocruz pelo apoio estrutural.

À plataforma de sequenciamento de DNA (CPqRR – FIOCRUZ).

Aos órgãos de financiamento Capes, CNPq (Ciências sem Fronteiras), FAPEMIG e Fiocruz/Papes.

E a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada dos flebotomíneos. O estudo da microbiota intestinal de *Lutzomyia longipalpis* é importante para determinar uma possível influência na competência vetorial desse inseto. *In vitro*, a ação da microbiota sobre o parasito foi avaliada demonstrando a lise na parede celular de *L. infantum chagasi* e *L. braziliensis*, causada por *Serratia marcescens*. Em estudos realizados *in vivo*, autores observaram uma redução no número de flebotomíneos infectados com *Leishmania mexicana* pré-alimentados com *Pseudozyma sp.*, *Asaia sp.* e *Ochrobactrum intermedium*. Estes estudos sugerem que a microbiota do vetor pode modular a sua infecção por *Leishmania*, porém o seu papel ainda não está claro. O trabalho aqui apresentado teve como objetivo caracterizar e avaliar o papel da comunidade bacteriana intestinal do *Lu. longipalpis* no desenvolvimento e diferentes espécies de *Leishmania* spp. Métodos morfológicos e moleculares foram utilizados para identificar e mapear a microbiota intestinal. O DNA das bactérias isoladas foram extraídos, a região 16S amplificada, utilizando-se um iniciador específico para esta região do DNA bacteriano. Em seguida, foram purificados, sequenciados e analisados em bancos de dados. Foram obtidas 60 UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) e classificadas taxonomicamente em 10 gêneros bacterianos. A atividade lítica ou efeito *in vitro* dessas bactérias nativas isoladas de *Lu. longipalpis* (Gruta da Lapinha) foi analisada por co-cultura utilizando promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) major* na concentração de 4×10^6 parasitas / mL e incubadas com diferentes gêneros de bactérias na concentração de 1×10^8 UFC / mL. Quando os parasitas foram co-cultivados com o gênero bacteriano *Lysinibacillus* todos os parasitas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* morreram em até 24h. *L. braziliensis* e *L. major* em até 48h de co-cultivo. Entre 96 a 144 horas, não observou-se a lise de todos os parasitas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* co-cultivados com *Pseudomonas* e *Enterobacter*. As bactérias *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Erwinia* quando co-cultivadas com *L. braziliensis* e de *L. major* co-cultivados com *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Enterococcus*. Os gêneros *Lysinibacillus* e *Serratia* apresentaram efeitos lítico sobre todas as quatro espécies de *Leishmania* testadas, abrindo a perspectiva de serem utilizadas em experimentos *in vivo*.

Palavras-Chave: *Lutzomyia longipalpis*. Microbiota. *Leishmania*. Intestino Médio.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of sand flies. The study of the intestinal microbiota of *Lutzomyia longipalpis* is important to determine a possible influence on the vector competence of this insect. *In vitro*, the action of the microbiota on the parasite was evaluated demonstrating the lysis in the cell wall of *L. infantum chagasi* and *L. brasiliensis*, caused by *Serratia marcescens*. It was observed, *in vivo*, a reduction in the number of phlebotomines infected with *Leishmania mexicana* pre-fed with *Pseudozyma sp.*, *Asaia sp.* and *Ochrobactrum intermedium*. These studies suggest that the vector microbiota may modulate *Leishmania* infection, but its role is still unclear. The objective of this study was to characterize and evaluate the role of the intestinal bacterial community of *Lu. longipalpis* in the development and different species of *Leishmania spp.* Morphological and molecular methods were used to identify and map the intestinal microbiota. DNAs were extracted from bacteria isolated from the medium intestine, the 16S region amplified, using a specific primer for this region of bacterial DNA. Next, were purified, sequenced and analyzed in databases. The lytic activity or *in vitro* effect of native bacteria isolated from *Lu. longipalpis* was analyzed by co-cultivation using *Leishmania* promastigotes of *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) major* at the concentration of 4×10^6 parasites / ml and incubated with different bacteria genera in the concentration of 1×10^8 CFU / mL. Sixty CFUs (Colony Forming Units) were obtained and were classified as 10 bacterial genera. When the parasites were co-cultivated with the bacterial genus *Lysinibacillus* all parasites of *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis* died within 24 hours. And *L. braziliensis* and *L. major* in up to 48h of co-cultivation. Between 96 and 144 hours, all parasites of *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis* co-cultivated with *Pseudomonas* and *Enterobacter* were not observed. From *L. braziliensis*, only the groups co-cultivated with *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Erwinia* and *L. major* co-cultured with *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Enterococcus* were not observed. The genus *Lysinibacillus* and *Serratia* presented lytic effects on all four *Leishmania* species tested. As prospect of being used in experiments *in vivo*.

Keywords: *Lu. Longipalpis*. Microbiota. *Leishmania*. Midgut.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo de vida dos flebotomíneos. Microscopia Eletrônica de Varredura do ovo (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D).....15
- Figura 2:** Micrografias da forma promastigota e da forma amastigota observadas no microscópio eletrônico de varredura. A) Promastigota de *Leishmania amazonensis*. B) Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago (Teixeira *et al.*, 2013).....17
- Figura 3:** Desenho esquemático do tubo digestório de *Phlebotomus (P.) papatasi* (Jobling,1987).....18
- Figura 4:** Mapa demonstrando os países que apresentam endemicidade de leishmaniose cutânea (A) e leishmaniose visceral (B) (WHO, 2016).....20
- Figura 5:** Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor (Sacks & Kamhawi, 2001).....21
- Figura 6:** Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania* de acordo com a nomenclatura de Lawyer e colaboradores (1990). A) promastigota procíclica, B) promastigota metacíclica, C) promastigota nectomonadas, D) promastigota paramastigota e E) promastigota haptomonadas.....22
- Figura 7:** Local de coleta de *Lu. longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG.....28
- Figura 8:** Atividade lítica observada ao longo do tempo com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonensis*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. brazilienses*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.....37

Figura 9: Atividade lítica observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonenses*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. brazilienses*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.....38

Figura 10: Atividade lítica observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com 3 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *An. aquasalis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonenses*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. brazilienses*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.....41

Figura 11: Atividade lítica observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis* suplementadas com sucrose. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonenses*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. brazilienses*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da reação em cadeia de polimerase para o gene ribossomal 16S.....31

Tabela 2: Condições para a reação de PCR dos isolados bacterianos do intestino médio de *Lu. longipalpis*32

Tabela 3: Gêneros de bactérias isoladas de diferentes estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas de *Lu. longipalpis*.....36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% = Porcentagem

µg = Micrograma

µL = Microlitro

BHI = **Infusão de Cérebro e Coração** (*Brain Heart Infusion*)

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

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

Cm = Centímetros

CPqRR = Centro de Pesquisa René Rachou

DNA = *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

Fiocruz = Fundação Oswaldo Cruz

IDT = *Integrated DNA Technologies*

LEM = Laboratório de Entomologia Médica

M199 = Meio 199

MG = Minas Gerais

mL = Mililitro

Mm = Milimolar

°C = Grau Celsius

Pb = Pares de Bases

PBS = Tampão Fosfato Salino (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR = Reação em Cadeia de Polimerase

pH = Potencial Hidrogeniônico

pmol = Picomol

RNA = Ribonuclease

rpm ou g = Rotações por Minuto

SFB = Soro Fetal Bovino

TBE = Tris-borado EDTA

UFC = Unidade Formadora de Colônia

V = Volts

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

x = vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Flebotomíneo	15
1.2 Os protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	16
1.3 Interação <i>Leishmania</i> -vetor	20
1.3 A microbiota e seu papel na interação com o parasito.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Coleta do <i>Lu. longiplapis</i>	28
4.2 Colonização dos flebotomíneos	28
4.3 Caracterização da diversidade microbiana de larvas, pupas e intestino médio de flebotomíneos - método cultivável.....	29
4.3.1 Preparo das amostras:.....	29
4.3.2 Isolamento	29
4.4 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos.....	29
4.5 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	30
4.6 Cultivo de <i>Leishmania</i> spp.....	33
4.7 Avaliação do efeito in vitro de bactérias no desenvolvimento de <i>Leishmania</i> spp.....	34
4.8 Análises estatística.	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Composição da comunidade bacteriana nativa associada à <i>Lu. longipalpis</i>	35
5.2 Avaliação do efeito in vitro de bactérias nativas associadas à <i>Lu. longipalpis</i> sobre a sobrevivência de espécies de <i>Leishmania</i> spp.	36
5.3 O efeito contínuo in vitro, ao longo de 144 horas de co-cultura de bactérias isoladas de <i>Lu. longipalpis</i> e as espécies de <i>Leishmania</i> testadas.....	38
5.4 Efeito de bactérias não nativas de <i>Lu. longipalpis</i> na co-cultura com <i>Leishmania</i> spp..	39

5.5 O efeito modulador de sacarose na co-cultura e na metacicloênese dos parasitas.....	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Flebotomíneo

Os flebotomíneos são insetos vetores que transmitem ao homem patógenos que podem causar doenças como as leishmanioses, verruga peruana (causada pela bactéria *Bartonella bacilliformis*) e arboviroses como a febre papatasi. São dípteros, da subordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. São classificados de acordo com sua distribuição geográfica e suas características morfológicas em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo que compreende a Eurásia e África, e *Lutzomyia* no Novo Mundo que abrange a América (Young & Dukan, 1994). São insetos pequenos medindo cerca de 0,3 a 0,4 cm e apresentam cor variada de castanho claro ao preto, além de muito pilosos (Killick-Kendrick, 1999). Quando estão em repouso, suas asas ficam eretas em forma de “V”. Popularmente são conhecidos como “mosquito palha”, “birigui”, “tatuquira”, entre outros. Aproximadamente 1000 espécies de flebotomíneos foram descritas até o momento, sendo que 400 espécies são do gênero *Lutzomyia* (Rangel & Laison, 2003). Entretanto cerca de 50 são comprovadamente vetores de espécies de *Leishmania* e pertencentes aos dois gêneros de flebotomíneos (Lainson & Rangel, 2005).

São insetos holometábolos e seu desenvolvimento inicia-se a partir do ovo, em seguida passa por quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). A eclosão do ovo ocorre de 7 a 17 dias após a postura, em condições ambientais favoráveis (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a), e o seu desenvolvimento completo pode variar de 30 a 100 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais.

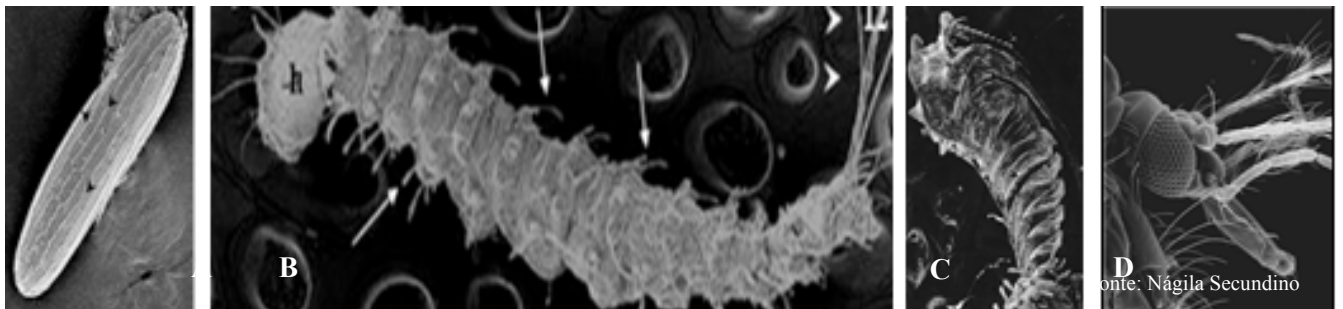


Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos. Microscopia eletrônica de Varredura do ovo (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D)

As larvas se alimentam de matéria orgânica em decomposição (Ferro *et al.*, 1997) e se desenvolvem em locais úmidos (não encharcados), com baixos níveis de luz e onde haja

substrato orgânico, como por exemplo, entre as raízes de árvores e sob troncos caídos, porém seus criadouros são de difícil localização na natureza (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a, Sangiorgi *et al.*, 2012).

Os adultos vivem em abrigos úmidos e escuros como fendas de árvores, tocas de animais e fendas de pedras e se alimentam de fontes naturais de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar) (Rangel & Lainson, 2003). Além dessas fontes, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para ovogênese (Killick-Kendrick, 1999).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do inseto que possui peças bucais pequenas e rígidas, o que impede que ela consiga se alimentar diretamente dos vasos sanguíneos, introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro, dilacerando o tecido e formando uma pequena piscina subcutânea de sangue. Essa estratégia de alimentação é denominada telmofagia. O comportamento pouco seletivo de algumas espécies leva esses insetos hematófagos a se alimentarem em diversas fontes de vertebrados como: roedores, preguiças, tamanduás, raposas, cães e humanos facilitando a transmissão do parasita do gênero *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1977).

Durante a picada a fêmea libera saliva que contém diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, imunossupressores e vasodilatadores facilitando a alimentação sanguínea (Ribeiro *et al.*, 1995; Kamhawi, 2000). O sangue ingerido é direcionado ao intestino médio. No intestino médio o sangue é envolto pela matriz peritrófica (Walters *et al.*, 1993; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Os flebotomíneos digerem as proteínas do sangue com o auxílio de serino-proteases, tripsinas, e quimiotripsinas, que são secretadas pelas células do epitélio intestinal (Dillon & Lane, 1993; Telleria *et al.*, 2010).

1.2 Os protozoários do gênero *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), são membros da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo simples e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto. O ciclo de vida do parasito se distingue em dois estágios de desenvolvimento, um no hospedeiro vertebrado (forma intracelular amastigota) e o outro no hospedeiro invertebrado (forma extracelular promastigota) (Figura 2). Estes parasitos são encontrados em uma variedade de animais silvestres e domésticos em todos os continentes, exceto na Antártica. Aproximadamente 40 espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas, sendo

aproximadamente 21 responsáveis por causar um espectrum de doenças coletivamente denominadas leishmanioses (Killick-Kendrick, 1990).

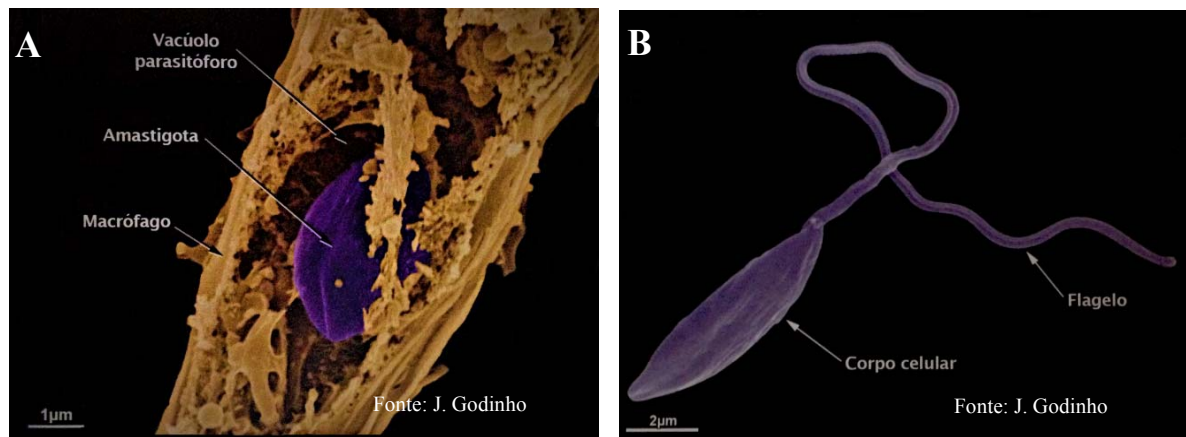


Figura 2: Micrografias da forma promastigota e da forma amastigota observadas no microscópio eletrônico de varredura. A) Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago. B) Promastigota de *Leishmania amazonensis* (modificado de Teixeira *et al.*, 2013).

O gênero *Leishmania* se divide em três subgêneros de acordo com as observações do tipo de desenvolvimento do parasito no intestino do vetor (Figura 3). Na adesão suprapilárica, os parasitos têm o seu desenvolvimento restrito ao intestino médio do vetor e pertencem ao subgênero *Leishmania*, que inclui a maioria das espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, como por exemplo, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *Leishmania (L.) major*. O subgênero *Viannia* compreende os parasitos que se aderem ao intestino do vetor de forma peripilárica, estabelecendo uma infecção inicial no triângulo pilórico e no intestino posterior. Posteriormente, esses parasitos migram e se desenvolvem na região do intestino médio. Esse grupo inclui, por exemplo, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e são encontrados exclusivamente nas Américas. Na adesão do tipo hipopilárica, os parasitos se desenvolvem no intestino posterior e pertencem ao subgênero *Sauroleishmania*, não patogênica ao homem (Lainson & Shaw, 1979).

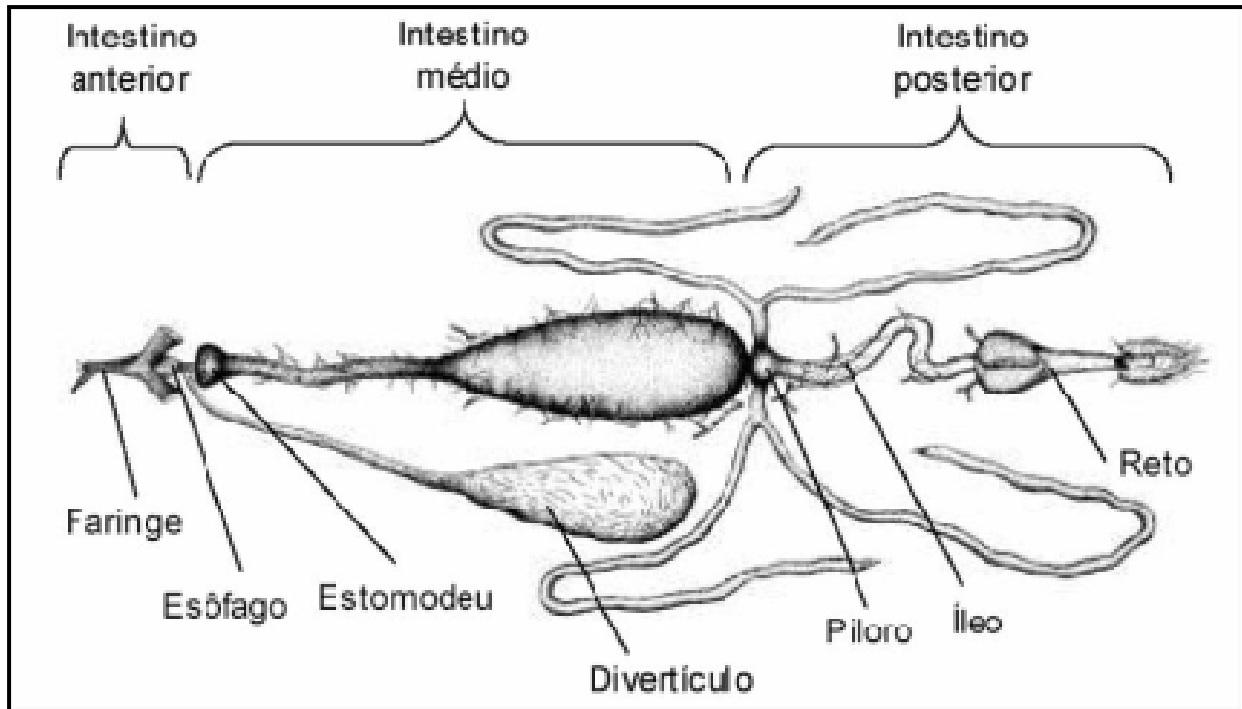


Figura 3: Desenho esquemático do tubo digestório de *Phlebotomus (P.) papatasi* (Jobling, 1987). No intestino médio ocorre a adesão suprapilárica; no triângulo pilórico (início do intestino posterior) a adesão peripilárica e a adesão do tipo hipopilárica no intestino posterior.

As várias espécies do gênero *Leishmania* infectam pessoas no mundo todo, causando um amplo conjunto de doenças coletivamente denominadas leishmanioses, as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomáticas, relacionados com as diferentes espécies do parasito (Herwaldt, 1999). A doença pode ocorrer sob a forma cutânea, a qual varia em: localizada, difusa, disseminada e muco-cutânea; e sob a forma visceral.

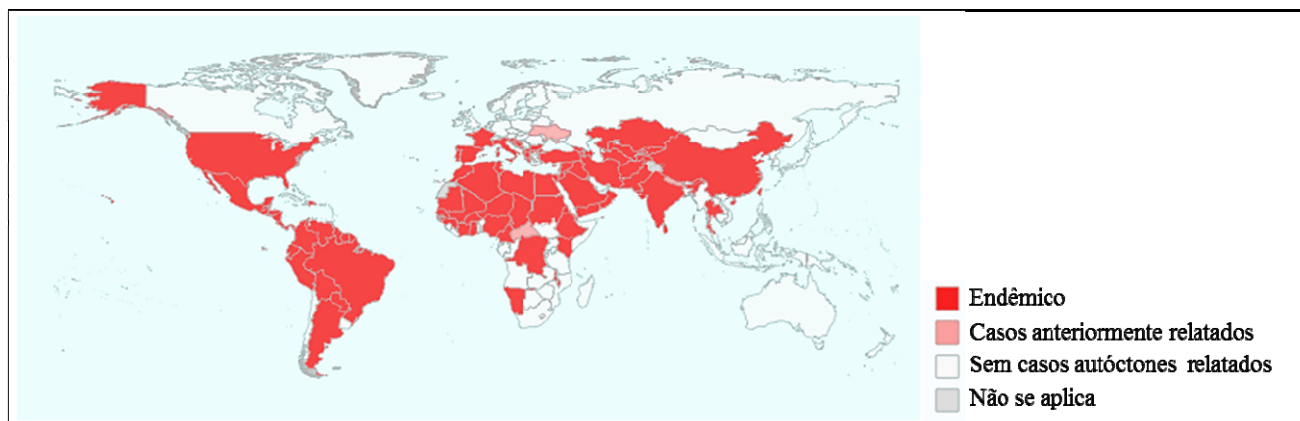
A leishmaniose cutânea ocorre quando o parasito apresenta tropismo por células da pele e aparecem lesões que podem ser ulcerativas e de cura espontânea, e podem deixar cicatrizes. Existem ainda formas recidivas da doença que aparecem após o tratamento. Os principais agentes etiológicos são *Leishmania (L.) major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* no Novo Mundo (revisado por Sacks *et al.*, 2008; Sharma & Singh, 2008).

A forma cutânea localizada desenvolve-se uma lesão indolor, com forma arredondada e tamanho variado, podendo ser ou não ulcerativa (Ministério da Saúde, 2017). A forma difusa da leishmaniose cutânea apresenta lesões não ulcerativas por todo o corpo e sem cura espontânea e é causada principalmente por *L. (L.) amazonensis* no Novo Mundo, sendo de difícil tratamento. A forma disseminada, relativamente rara, aparecem múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem varias partes do corpo, sendo causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Ministério da Saúde, 2017). Já a forma muco-cutânea apresenta lesões nas mucosas da boca, nariz, palato, faringe e laringe, podendo ser desfigurante e é causada pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (Herwald, 1999; Costa *et al.*, 2003).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma sistêmica da doença e pode ser fatal se não tratada. Os parasitos, neste caso, apresentam um forte tropismo pelo sistema mononuclear do fígado, baço, medula óssea e linfonodos, apresentando como principais sintomas febre, perda de peso, hepato-esplenomegalia e pancitopenia (redução dos elementos do sangue: hemácias, leucócitos e plaquetas). Em alguns casos após o tratamento pode haver o aparecimento de uma forma cutânea pós-calazar. A leishmaniose visceral acomete principalmente crianças, idosos, indivíduos desnutridos e imunossuprimidos (Gramiccia & Grandoni, 2005; Chappuis *et al.*, 2007). Seus agentes etiológicos são *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Lukes *et al.*, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2016), estima-se que 900.000 -1.3 milhões de novos casos e 20.000 – 30.000 mortes ocorram anualmente. Atualmente, as leishmanioses são registradas em 98 países e nos quatro continentes. A grande maioria (90%) dos casos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (Soares & Turco 2003, Chappuis *et al.* 2007). Já a forma cutâneo-mucosa ocorre principalmente no Brasil, Bolívia e Peru que, juntos, representam cerca de 90% dos casos da doença. Com relação à leishmaniose cutânea, 90% dos casos notificados concentram-se no Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Iran, Peru e Síria sendo que, o Brasil é o único país a reunir uma grande quantidade de casos das três manifestações clinicas de leishmaniose (WHO, 2016).

A Status da Endemicidade da Leishmaniose Cutânea: 2015



B Status da Endemicidade da Leishmaniose Visceral: 2015

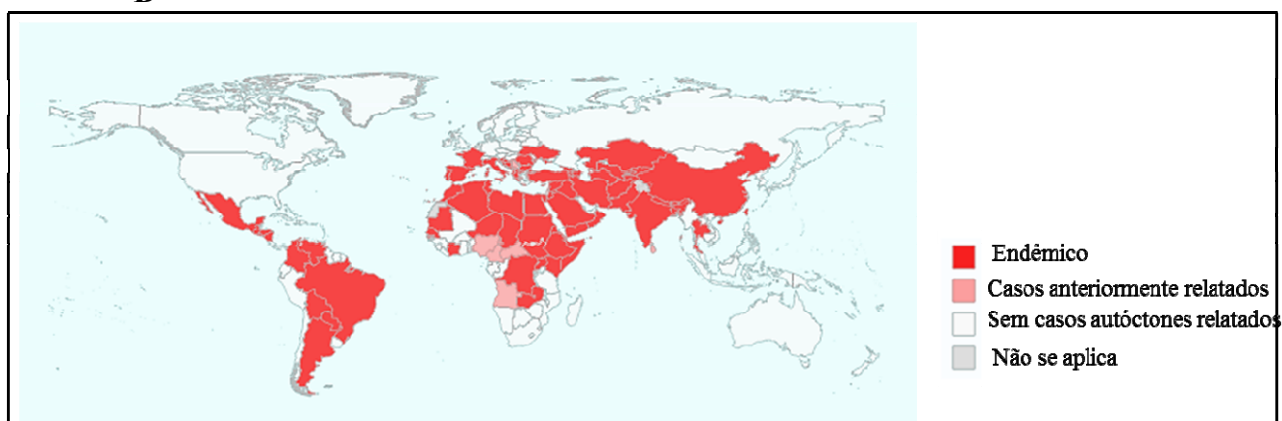


Figura 4: Mapa demonstrando os países endêmicos para leishmaniose cutânea (A) e leishmaniose visceral (B) (WHO, 2016).

1.3 Interação *Leishmania*-vetor

De acordo com Killick-Kendrick (1999), para ser considerado um vetor o flebotomíneo deve: (a) apresentar hábito alimentar antropofílico; (b) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (c) os parasitas isolados de flebotomíneos capturados em campo deverão ser indistinguíveis de isolados de pacientes e (d) ser capaz de transmitir o parasito pela picada.

Durante o repasto, a fêmea, eventualmente, pode ingerir o protozoário pertencente ao gênero *Leishmania*, (na forma amastigota livre ou dentro de neutrófilos e macrófagos). O sangue é rapidamente direcionado ao intestino médio do inseto e envolto pela matriz peritrófica composta de quitina, proteínas e glicoproteínas e secretada pelo epitélio intestinal,

junto ao o bolo sanguíneo (Figura 5) (Walters *et al.*, 1993; 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005).

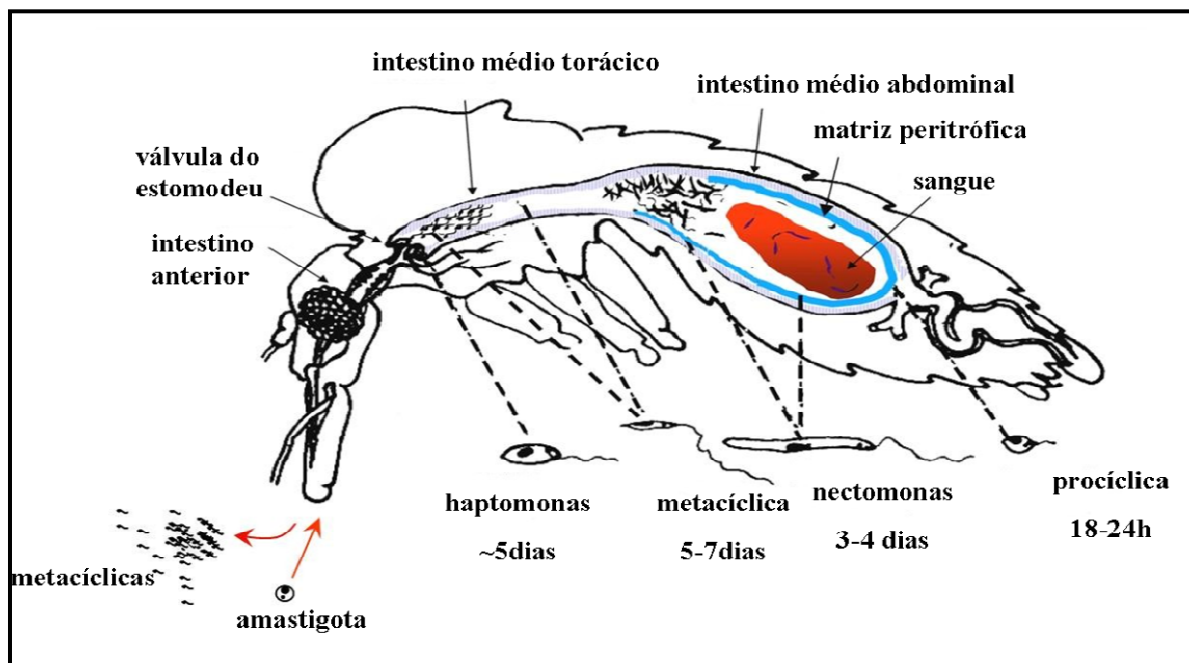


Figura 5: Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor (Sacks & Kamhawi, 2001).

Após um período de doze a vinte horas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas (Figura 6A). As promastigotas são formas altamente multiplicativas, alongadas, flageladas e extremamente móveis. Em um período de 2 à 5 dias as promastigotas iniciam o processo de metaciclogênese, transformando-se na forma promastigota metacíclica (Figura 6B), forma infectante ao vertebrado, (Sacks & Perkins, 1984; Descoteaux, 1999). Além da forma infectante, no trato digestório do vetor são encontradas outras formas como as promastigotas nectomonas (Figura 6C), promastigotas paramastigotas (Figura 6D), e promastigotas haptomonas (Figura 6E), (Lawyer *et al.*, 1990). O ciclo de vida da *Leishmania* nos insetos vetores é extracelular, ou seja, os parasitos se desenvolvem livres na luz do trato digestório (revisado por Sacks *et al.*, 2008).

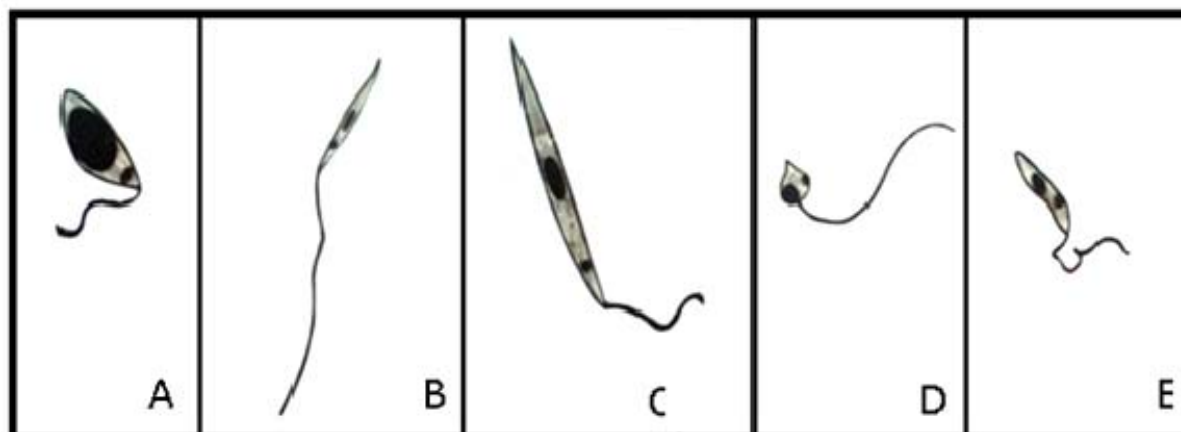


Figura 6: Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania* de acordo com a nomenclatura de Lawyer et al., 1970. A) promastigota procíclica, B) promastigota metacíclica, C) promastigota nectomonadas, D) promastigota paramastigota e E) promastigota haptomonadas.

Sabe-se que existem várias barreiras naturais e estas são enfrentadas pelos parasitos durante o processo de interação com o vetor. Entre eles estão: a ação das enzimas digestivas (Borovsky & Schlein, 1987); a matriz peritrófica (Walter et al., 1993; Pimenta et al., 1997; Secundino et al., 2005); a transformação de amastigotas para promastigotas procíclicas; a ruptura da matriz peritrófica na região do intestino médio, devido a produção de quitinase pelos parasitos (Sacks et al., 1994); a adesão ao epitélio do trato digestório das promastigotas pelo flagelo, dependente da expressão de moléculas espécie-específicas de lipofosfoliglicano (LPG) na superfície dos parasitos (McConville et al., 1990; Pimenta et al., 1994); a migração dos parasitos para a região da cárdia ou válvula do estomodeu após a completa digestão do alimento sanguíneo; produção de PSG e boqueio do tubo digestivo anterior (Rogers et al., 2004); a diferenciação dos parasitos em promastigotas metacíclicas, forma infectiva ao hospedeiro vertebrado no momento da picada (Turco & Descoteaux, 1992); a ação da saliva do vetor, intensificando e modulando o estabelecimento da infecção no local da picada no hospedeiro vertebrado (Ribeiro et al., 1995) e finalmente a transmissão pela picada (Secundino et al., 2011)

1.3 A microbiota e seu papel na interação com o parasito

Os insetos, tanto os machos como as fêmeas alimentam-se de seiva vegetal, provenientes de várias fontes o que possibilita a ingestão de vários micro-organismos, entre eles, as bactérias (Tanada & Kaya, 1993).

Interações de bactérias intracelulares e insetos são comumente encontrados na natureza. As bactérias podem ser endossimbiontes ou entomopatógenas causadores de doenças ou comensais. Segundo Zook (1998), simbiose é definida como uma relação entre dois micro-organismos resultando em novas estruturas ou metabolismo. Essa associação pode ser positiva ou negativa. Mutualismo e comensalismo seriam relações positivas de simbiose. No mutualismo ambos são beneficiados e no comensalismo o micro-organismo beneficia o inseto enquanto o habita (Klepzing *et al.*, 2009; Smith & Douglas, 1987; Bignell, 2000). Associações simbióticas entre insetos e sua microbiota podem ser favoráveis para o hospedeiro de varias maneiras, por exemplo, suplementação da dieta, tolerância a variações do ambiente, e/ou manutenção da homeostase no sistema imune do hospedeiro (Weiss & Aksoy, 2011).

Em mosquitos, estudos demonstram que infecções por bactérias provenientes do intestino de *Anopheles* podem inibir o desenvolvimento dos parasitas da malária (Pumpuni *et al.*, 1993; 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2009; Cirimotich *et al.*, 2011). Também já foi demonstrado por Pumpuni e colaboradores (1993; 1996), que bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Ewingella americana*) reduzem a formação de oocistos, sendo que a mesma ação não é observada com as bactérias Gram-positivas das espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Para a mosca Tsé-Tsé também já foi demonstrado que existem evidências da influência da microbiota intestinal no ciclo de vida de parasitas (Welburn & Maldlin, 1999).

A maior parte dos estudos realizados se concentra nas interações caracterizadas por contribuições das bactérias para o metabolismo do inseto hospedeiro (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Estudos demonstraram que a microbiota pode fornecer resistência contra inimigos naturais e parasitos (Oliver *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2005), pode interferir em relações sociais (Dillon & Charney, 2002) e modular a resposta imune do inseto hospedeiro (Hoffman Reichhart 2002; Basset *et al.*, 2003; Baton *et at.*, 2009). Além disso, bactérias endossimbiontes, como as do gênero *Wolbachia*, estão presentes em tecidos reprodutivos de mosquitos, e estão associadas a uma variedade de manipulações reprodutivas, tais como

incompatibilidade citoplasmática, morte de machos e indução de partenogênese (Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999).

Embora Schlein e colaboradores (1985) tenham demonstrado para *P. papatasi* que o divertículo esofágico apresenta atividade anti-bactericida e postulado que o intestino médio do inseto é livre de bactérias devido ao efeito destes inibidores, outros estudos demonstraram a presença de microbiota intestinal em flebotomíneos e que esta microbiota pode interferir no desenvolvimento de *Leishmania* spp. (Adler & Theodor, 1927, Oliveira *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 2017, Li K *et al.*, 2016, Monteiro *et al.*, 2016, McCarthy *et al.*, 2011, Gouveia *et al.*, 2008, Sant'anna *et al.*, 2001, 2014, Machado *et al.*, 2014).

Existem indícios de que as bactérias estão presentes durante as diferentes fases de vida de um inseto, como na fase larvar, inseto recém-emergido ou alimentado podem ser sazonais (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Um estudo mostra que bactérias presentes no intestino de *P. papatasi* mudam durante a vida da fêmea (Dillon *et al.*, 1996) e outro estudo demonstra que *P. dubosqui* apresenta bactérias imediatamente após a emergência do adulto sendo que as formas imaturas (larvas) possuem *Pseudomonas* sp., *Oligella* sp., *Enterobacter gervoviae* e *Sphingobacterium spiritivorum*. Já os adultos em distintas condições, antes e após a alimentação sanguínea, apresentaram na sua maioria *Ochrobactrum* sp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Volf *et al.*, 2002).

Entretanto a grande maioria dos estudos são referentes à microbiota intestinal de flebotomíneos do Velho Mundo. Para os flebotomíneos vetores das Américas, alguns trabalhos já foram publicados com *Lu. longipalpis* descrevendo sua microbiota (Gouveia *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2011, Sant'anna *et al.*, 2014). Oliveira e colaboradores (2000; 2001) e Gouveia e colaboradores (2008) descreveram os gêneros e espécies bacterianas encontrada em populações de campo de *Lu. longipalpis* provenientes da gruta da Lapinha, Minas Gerais. As bactérias encontradas foram: *Acinetobacter lowffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Flavimonas orizihabitans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ozaenae*, *Bacillus thuringiensis* e *Staphylococcus* spp.. O mesmo grupo (Oliveira *et al.* 2001) observou a microbiota de *Lu. longipalpis* comparando exemplares colonizados e silvestres em duas diferentes condições: A) fêmeas alimentadas com sangue e sacarose, nas quais observou os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Yokenella* e (B) fêmeas alimentadas apenas com sangue observando-se com exclusividade os gêneros, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia*, além dos quatro primeiros gêneros do grupo A. Já Gouveia e colaboradores (2008) descreveram a microbiota bacteriana

encontrada no intestino de *Lu. longipalpis* provenientes da Bahia, Maranhão e Minas Gerais. As bactérias encontradas foram: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Critrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavimonas*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* (encontrada apenas na população de Jacobina), *Stenotrophomonas* (presente nas três populações analisadas) e *Weeksella*.

As co-infecções produzidas por vírus, bactérias, protozoários, fungos, nemátodos e ácaros são capazes de matar o inseto hospedeiro (Warburg et al., 1991). Quando as co-infecções ocorrem no tubo digestivo de flebotomíneos, podem reduzir a população ou inibir o desenvolvimento da *Leishmania* (Secundino et al, 2002; Sant'Anna et al 2014).

Trabalhos *in vitro* de Moraes e colaboradores (2008 e 2009) observaram lise na parede celular de *L. infantum chagasi* e *L. braziliensis* causada por *Serratia marcescens*, no entanto, não se tratava de isolados de *Lu. longipalpis*. Mais recentemente , em experimentos realizados *in vivo*, Sant'Anna e colaboradores (2014), isolaram algumas bactérias de fêmeas de *Lu. longipalpis* e alimentaram esses insetos com essas bactérias e, em seguida, com sangue infectado com *Leishmania mexicana*. Eles observaram uma redução no número de flebotomíneos infectados com *Leishmania* que haviam sido pré-alimentados com *Pseudozyma* sp., *Asaia* sp. ou *O. intermedium*, além da redução da carga parasitária nesses insetos.

2 JUSTIFICATIVA

A importância epidemiológica dos flebotomíneos deve-se ao fato de que espécies dos serem transmissoras dos protozoários do gênero *Leishmania*. A doença atinge o Brasil e vários países do mundo, sendo que a leishmaniose visceral ou Calazar é a forma mais grave da doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde é segunda doença parasitária que mais mata no mundo perdendo apenas para a malária (WHO, 2016). Os reservatórios são uma variedade de mamíferos, tanto domésticos quanto selvagens, que podem ou não apresentar sinais da doença (Laison & Shaw, 1979; Bofill et al, 1985; Young & Duncan, 1994).

Durante as últimas décadas muitos estudos foram feitos a fim de entender a biologia do parasito. Porém, se compararmos os estudos existentes sobre a *Leishmania* e a sua interação com hospedeiros vertebrados, em relação ao inseto transmissor, os conhecimentos são ainda relativamente escassos e fragmentados, principalmente em relação aos parasitos e aos vetores do Novo Mundo (Titus & Ribeiro, 1990; Young & Arias, 1991; Schlein, 1993; Secundino et al, 2012).

Em se tratando de flebotomíneos do Novo mundo existem trabalhos descrevendo a diversidade da microbiota encontrada em *Lu. longipalpis*, entretanto poucos são os estudos *in vivo* avaliando a ação da microbiota na interação vetor-parasita (Sant'Anna et al., 2014) e sua aplicabilidade como ferramenta para avaliar fenótipos simbióticos onde o parasita não fosse favorecido.

A adaptação da microbiota intestinal nos insetos leva ao desenvolvimento de mecanismos de supressão da resposta imune intestinal pelas bactérias (Ryu et al., 2008). Contudo, os insetos desenvolveram uma resposta imune eficiente para combater a invasão de outros micro-organismos não simbiotes (Christophides et al., 2002; Osta et al., 2004; Hillyer & Christensen, 2005). Ainda assim existe pouco conhecimento sobre o flebotomíneo como 'holobionte', ou seja, o inseto com todos seus microrganismos associados, como unidade evolutiva.

Tendo em vista estas considerações, o presente trabalho teve com objetivo isolar bactérias de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* coletados na Gruta da Lapinha, MG e avaliar sua interação e efeito lítico *in vitro* em espécies de *Leishmania*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar o papel da comunidade bacteriana intestinal do *Lu. longipalpis* no desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* spp.

3.2 Objetivo específicos

3.2.1 Isolar e identificar a microbiota intestinal do *Lu. longipalpis* em diferentes fases fisiológicas.

3.2.2 Investigar como a microbiota intestinal nativa do *Lu. longipalpis* pode modular positiva ou negativamente o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* spp. *in vitro*.

3.2.3 Investigar como a microbiota intestinal não nativa de *Lu. longipalpis* pode modular positiva ou negativamente o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* spp. *in vitro*.

3.2.4 Avaliar o papel da sacarose no processo de interação da microbiota com o parasito.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de *Lu. longipalpis*

Os flebotomíneos utilizados, *Lu. longipalpis*, foram provenientes de coletas semanais na Gruta da Lapinha, localizada na cidade de Lagoa Santa, a 60 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'W; latitude 19°03'S), estado de Minas Gerais, Brasil. As armadilhas utilizadas para captura dos insetos foram as luminosas tipo CDC (*Center for Disease Control light trap*) (Sudia & Chamberlain, 1962). Estas armadilhas foram colocadas no início da tarde (por volta das 14 horas) e retiradas no início da manhã do dia seguinte (por volta das 10 horas). Um exemplar de *Gallus domesticus* foi mantido no interior da caverna como possível fonte de atração para os flebotomíneos. As gaiolas com os flebotomíneos coletados foram levadas ao Laboratório de Entomologia Médica no Centro de Pesquisas René Rachou em Belo Horizonte (CPqRR/FIOCRUZ-MG) dentro de um isopor com algodão úmido, para manter temperatura e umidade. No laboratório os insetos foram mantidos em insetário a 24-26°C e com umidade em torno de 80%. Solução de 50% sacarose foi oferecida aos flebotomíneos em pequenos chumaços de algodão “ad libitum”.



Figura 7: Local de coleta de *Lu. longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG.

4.2 Colonização dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram alimentados em camundongo suíço, para o desenvolvimento dos ovos. As larvas e pupas provenientes desses ovos foram mantidas como descrito por (Secundino & Pimenta, 2000).

Os flebotomíneos foram identificados morfológicamente de acordo com Young e Duncan, de 1994.

4.3 Caracterização da diversidade microbiana de larvas, pupas e intestino médio de flebotomíneos - método cultivável.

Antes da dissecação, cada amostra foi esterilizada por um minuto em 1% de hipoclorito de sódio, 30 segundos em 70% de etanol e lavados três vezes em PBS (Lacey & Brooks, 1997).

4.3.1 Preparo das amostras: Os flebotomíneos foram anestesiados em freezer -20°C e separados em quatro distintos grupos de estudo:

- 1) Imaturo – larvas e pupas.
- 2)U-Adulto = em jejum ou com intestino vazios;
- 3)BF-Adulto = intestino contendo sangue
- 4)GR-Adulto = adulto grávida, intestino médio sem sangue e com ovários desenvolvidos.

4.3.2 Isolamento de bactérias

O intestino médio foi dissecado (retirando-se os tubos de Malpighi, o intestino anterior e o intestino posterior) sobre em uma lâmina contendo uma gota de PBS estéril com o auxílio de um estereoscópio e de estiletes, que foram previamente esterilizados com álcool 70% entre cada dissecação. Os intestinos dissecados e as formas imaturas (larva e pupa) foram maceradas seguindo os procedimentos descritos por Gaio, 2011 (com modificações) em tubos contendo 300 uL de infusões de cérebro e coração de boi (BHI) líquido, um meio de cultivo de bactéria não seletivo. Foi plaqueado 100 uL do macerado em meio BHI sólido e incubados a 27°C por 16 horas.

4.4 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

Após o crescimento por aproximadamente 16 horas, as UFCs foram caracterizadas observando a cor, forma, elevação e margem com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

As colônias selecionadas através da técnica de semeadura por esgotamento, foram submetidas a três repiques em placa de Petri com meio sólido BHI para garantir o isolamento puro. Os isolados de culturas puras foram resubmetidos a um crescimento em meio líquido BHI por 16 horas a 27°C.

Além da caracterização morfológica, as colônias bacterianas foram classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas utilizando o método de Gram. Para isso, uma gota (10 uL)

de cada cultura foi colocada em duas lâminas de vidro e uma delas foi recoberta com uma lamínula de vidro. Na outra lâmina, a gota foi espalhada com uma alça bacteriológica e quando seco, o material foi fixado utilizando uma chama do bico de Bunsen e corado de acordo com a técnica de Gram: a) 1 minuto com cristal violeta (10% em acetona), b) 30 segundos lugol, d) enxague com solução de acetona e álcool 1:1, d) enxague com água destilada e incubadas por 30 segundos em safranina 0,25%. As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio óptico com a objetiva de 100x (imersão). Foi registrada a coloração das células (rosa para Gram negativas ou violeta para Gram positivas).

As culturas puras provenientes do isolamento foram preparadas para serem congeladas em meio de congelamento bacteriano com 65% de glicerol, sulfato de magnésio a 0,1M e Tris HCl pH 8,0 a 0,025M na proporção 50% meio de congelamento 50% cultura e em seguida estocada em freezer a -70°C.

4.5 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen). Foi colocado em um tubo tipo *ependorf* 1mL de cultura de bactéria e centrifugado por 10 minutos a 5000xg (7500rpm). O sobrenadante foi descartado. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 180 µL de enzymatic lysis buffer com lisozima e incubado em banho maria por 1 hora a 37°C. Foi adicionado 25 µl de Proteinase K e as amostras foram homogeneizadas no vortex e em seguida incubadas em banho maria a 56°C *overnight*. Foi adicionado 200 µl de *buffer AL* (sem etanol) e homogeneizadas no vortex. Foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%) e homogeneizadas no vortex novamente e centrifugadas por 10 minutos a 15000 xg. O sobrenadante foi transferido para um tubo coletor de 2 mL com coluna e o pellet descartado. As amostras centrifugadas por 1 minuto 6000 xg. O tubo coletor foi descartado. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e adicionado 500 µL de *buffer AW1*, centrifugado por 1 minuto a 6000 xg e o tubo coletor descartado. Novamente a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e adicionados 500 µL de *buffer AW2*. Centrifugados por 3 minutos a 20000 xg. E o tubo coletor descartado. A coluna foi transferida para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL e adicionados 100 µL de *buffer AE* diretamente na membrana. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas por 1 minuto a 6000 xg. O DNA extraído foi quantificado e sua pureza analisada em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

O DNA de cada amostra foi submetido à amplificação em Reação de Cadeia de Polimerase utilizando iniciadores universais, tendo como alvo o gene codificante da subunidade 16S de RNA ribossomal, fornecidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies*), que amplificam uma região de aproximadamente 1500 pb (Polz e Cavanaugh, 1998). A reação em cadeia foi polimerizada com Beads do Kit *Ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads*, reagentes listados na Tabela 2 e processada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). Os ciclos de cada reação seguiram as condições descritas na Tabela 3. Esse processo foi realizado em triplicata para cada isolado para garantir um volume final compatível com a necessidade de uso na reação de sequenciamento.

Tabela 1: Componentes da reação em cadeia de polimerase para o gene ribossomal 16S.

Componentes	Concentração	Volume/reação
Beads		2 μ L
Iniciador senso	(10 pmol)	1 μ L
Iniciador antisenso	(10 pmol)	1 μ L
DNA molde	Mínimo de 50 ng/ μ L	Variável
Água DEPC		Variável
Volume final		25 μL

Tabela 2: Condições para a reação de PCR do DNA extraído dos isolados bacterianos do intestino médio de *Lu. longipalpis*.

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

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 0,8%. Para isso foram aplicados no gel 5µL do produto da PCR com 2µL do corante *Blue/Orange 6x* (Promega). Foi aplicado também ao gel um padrão de peso molecular 100 pb (Promega). Os géis foram submetidos à corrida de eletroforese (100V) por 1 hora utilizando tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato, ácido bórico e EDTA). Após a corrida os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (2% ácido acético, 4% álcool etílico) incubados por 10 minutos. Os géis foram documentados no transiluminador UV 302 nm T26M *Easydoc 100* (BioAgency) com uma câmera digital acoplada.

O produto da PCR foi purificado usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). Foi adicionado o mesmo volume de *membrane binding solution* ao produto amplificado por PCR. A *SV minicolumn* foi inserida no tubo de coleta. O produto de PCR preparado foi transferido para a *minicolumn* e incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto em seguida, foi centrifugado a 16000 × g durante 1 minuto e o tubo coletor foi esvaziado. Foram adicionados 700 µL de *membrane wash solution* e o tubo foi centrifugado a 16000 × g durante 1 minuto, o tubo coletor foi esvaziado e reinsertado na

minicolumn. Novamente foram colocados 500 µl de *membrane wash solution* e o tubo foi centrifugado a 16000 x g durante 5 minutos. O tubo coletor foi esvaziado e o conjunto da coluna + tubo foi centrifugado novamente durante 1 minuto com a tampa da centrífuga aberta para permitir a evaporação de qualquer etanol residual. A *minicolumn* foi transferida cuidadosamente para um tubo tipo *eppendorf* limpo de 1,5 ml. E então foram adicionados 50 µL de *nuclease-free water* à *minicolumn* e incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto. O conjunto (tubo e coluna) foi centrifugado a 16000 x g durante 1 minuto e a *minicolumn* descartada e o DNA armazenado a -20 ° C em freezer.

Esse produto de PCR purificado foi quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando a plataforma de sequenciamento de DNA do CPqRR. Uma quantidade de 10 - 40 ng de produto amplificado foi usada para a reação de sequenciamento no sequenciador 3730XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*). Os produtos foram precipitados utilizando-se etanol e EDTA. Aos 10 µL iniciais da reação adiciona-se 1 µl de EDTA 125 mM, 1 µL de acetado de amônio e 50 µL de etanol absoluto. A placa foi fechada com adesivo resistente a etanol. Os produtos foram homogeneizados por inversão várias vezes. A reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. Após incubação, o produto foi centrifugado a 3700 x rpm por 45 minutos a temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante foi descartado e adicionado 100µl de etanol 70%. O produto foi centrifugado novamente a 3700 x rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa bem seca ressuspensa com formamida HI DI.

As sequências obtidas foram alinhadas, e uma sequência consenso (contig) foi gerada usando software DNAbaser v.4.36.0. Posteriormente, cada sequência consenso foi comparada com o banco de dados do GenBank, NCBI utilizando a ferramenta BLASTn; à consulta no banco de dados para comparação com sequências homologas e a escolha dos melhores alinhamentos foi feita segundo os critérios de “e-value”, (o mais próximo de zero), e a identidade mínima de 97%.

4.6 Cultivo de *Leishmania* spp.

Os parasitas utilizados pertencem às cepas *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46), *Leishmania (L.) amazonensis* (/BR/67/PH8/IFLA), *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/H2903) e *Leishmania (L.) major* (MHOM/ IL/80/FN). Os parasitos foram cultivados em meio M199 (Sigma), acrescido com 10% de soro fetal bovino

(SFB) (Cultilab), penicilina (100U/mL), streptomicina (50 µg/mL), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) e 2,5 µg/mL hemina (Sigma) cultivadas a 26 °C. (Nieves e Pimenta, 2002).

4.7 Avaliação do efeito *in vitro* de bactérias no desenvolvimento de *Leishmania* spp.

Todos os experimentos foram feitos utilizando promastigotas em fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram contados, centrifugados por 10 min a 3200 rpm e ressuspensos no meio DMEN fresco (*Modified Eagle Medium da Dulbecco*) na presença da bactéria nativa previamente isolada de intestinos dissecados de *Lu. longipalpis* ou de larvas de *Anopheles aquasalis* obtidos do insetário do LEM e cultivadas em infusão de cérebro e coração (BHI) e congeladas em meio específico. Os experimentos foram realizados utilizando as diferentes espécies de *Leishmania* na concentração de 4×10^6 parasitas/mL cada e as diferentes bactérias em concentrações de 1×10^8 UFC/mL.

As cepas de parasitos foram incubadas na presença de um único isolado bacteriano e/ou na presença ou ausência de 15% de sacarose adicionada ao meio DMEM. As amostras foram co-cultivadas a 25°C ao longo de um período de 2 horas, ou até 144 horas (Moraes *et al*, 2008, com modificações). O número de parasitos vivos e morfotipos foram determinados por contagem na câmara de Neubauer.

4.8 Análises estatísticas.

O teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney foi realizado depois da confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste Shapiro-Wilk. Ambos os testes foram realizados usando o programa *GraphPad Prims* (Prism Windows 6.07; GraphPad Software Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Composição da comunidade bacteriana nativa associada à *Lu. longipalpis*

O perfil taxonômico obtido para cada amostra de *Lu. longipalpis* revelou que existem diferenças na composição (avaliada em função da riqueza de taxa) da comunidade bacteriana associada ao flebotomíneo durante as distintas fases vida, bem como nas condições fisiológicas do inseto adulto testadas.

Considerando os diferentes grupos, foram obtidas 60 UFCs (Unidades Formadoras de Colônias), as quais foram classificadas taxonomicamente em 10 gêneros bacterianos. Destes 10 gêneros, seis são Gram-negativos (60%) e quatro Gram-positivos (40%).

No grupo das formas imaturas, (fases de larva e pupa), foram identificadas UFCs pertencentes a 3 gêneros e 2 famílias, sendo o gênero *Pseudomonas* comum em ambos grupos(larva e pupa) e o gênero *Lysinibacillus* em larvas. Além disso, a bactéria Gram-positiva do gênero *Bacillus* foi encontrada em duas das fases da vida estudadas, pupas e adulto (Tabela 3).

O grupo adulto apresentou a maioria dos gêneros de bactérias com 7 diferentes gêneros, 3 isolados bacterianos Gram-positivos representadas por *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* e 4 isolados Gram-negativos pertencentes ao gêneros *Erwinia*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Providencia*. Com exceção dos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*, todos os outros isolados são pertencentes a família Enterobacteriaceae.

No grupo de flebotomíneos que apresentavam sangue no intestino (BF-adulto), foi isolada apenas uma UFC identificada taxonomicamente como pertencente ao gênero *Serratia*, uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae.

Nos insetos pertencentes ao grupo GR-adultos (intestino médio sem sangue e com ovários desenvolvidos) foram identificados dois gêneros, ambos Gram-negativos e da família Enterobacteriaceae; *Erwinia* e *Providencia*.

Tabela 3: Gêneros de bactérias isoladas de diferentes estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas de *Lu. longipalpis*

Genus/Gram	<i>Lu. longipalpis</i>				
	Larva	Pupa	U-Adulto	BF-Adulto	GR-Adulto
<i>Bacillus</i> (+)		X	X		
<i>Enterobacter</i> (-)			X		
<i>Enterococcus</i> (+)			X		
<i>Erwinia</i> (-)			X		X
<i>Escherichia</i> (-)			X		
<i>Lysinibacillus</i> (+)	X				
<i>Providencia</i> (-)			X		X
<i>Pseudomonas</i> (-)	X	X			
<i>Serratia</i> (-)				X	
<i>Staphylococcus</i> (+)			X		

(+) Gram-positiva e (-) Gram-negativa; Grupos: U-Adulto = em jejum ou com intestino vazios; BF-Adulto = intestino contendo sangue; GR-Adulto = adulto grávida, intestino médio sem sangue e com ovários desenvolvidos.

5.2 Avaliação do efeito *in vitro* de bactérias nativas associadas à *Lu. longipalpis* sobre a sobrevivência de espécies de *Leishmania* spp.

O efeito *in vitro* foi analisado por co-cultura de cada uma das 10 bactérias nativas isoladas de *Lu. longipalpis*: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Lysinibacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus*; com promastigotas de *L. infantum chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* por um período de até 2 horas.

Depois de 30 minutos de co-cultivo de promastigotas de *Leishmania* com as bactérias nativas, observou-se uma redução no número de parasitos para todas as espécies testadas. Considerando o efeito da mortalidade das bactérias em cada uma das espécies de *Leishmania*, comparando com o ponto de tempo 0 hora (Figura 8), o co-cultivo com *Lysinibacillus* e *Serratia* eliminou 13,25% e 8,75% de parasitas de *L. infantum chagasi*, respectivamente. Ao considerar as bactérias acima mencionadas e *L. amazonensis*, foram registrados 12,07% e 8,25% de mortalidade. Por último, o co-cultivo das bactérias acima indicadas, com *L.*

braziliensis e *L. major* reduziu 10,4% e 7%; e 13,3% e 9,6% na quantidade de parasitos totais respectivamente.

Aos 60 minutos, a tendência de diminuição do número de parasitas persistiu para a maioria dos co-cultivos. Consequentemente, quando se avaliou a co-cultura com *Lysinibacillus* e *Serratia*, as percentagens de mortalidade observadas aos 120 minutos (comparado com a densidade de parasitos no tempo 0 hora) foram: 25,4% e 15%, 25,8 e 15%, 22,9% e 14,5%, e 23,4% e 27,9%, para *L. infantum chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente.

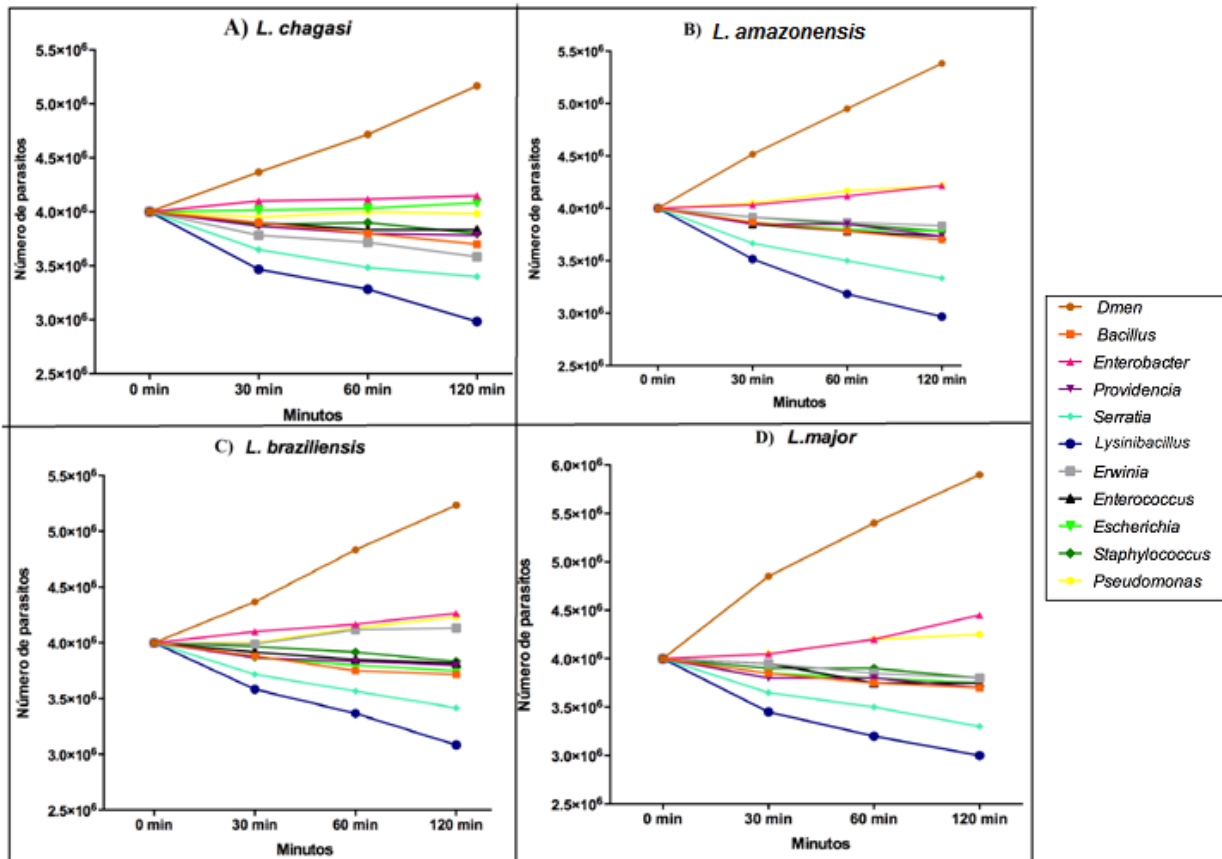


Figura 8: Atividade lítica observada ao longo do tempo com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonensis*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. braziliensis*. D)

Quando avaliada a redução da densidade parasitária ou mortalidade, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos grupos em relação ao controle ($\alpha = 0,05$). Não foram observadas reduções significativas quando qualquer dos parasitas

foram expostos a *Enterobacter* e quando *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* foram co-cultivados com *Escherichia*.

5.3 O efeito contínuo in vitro, ao longo de 144 horas de co-cultura de bactérias isoladas de *Lu. longipalpis* e as espécies de *Leishmania* testadas

A atividade lítica prolongada das bactérias nativas isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis* foi avaliada por co-cultura com promastigotas de *L. infantum chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* durante um período de 144 horas.

Após 24 horas de co-cultura com bactérias isoladas do intestino médio de flebotomíneos, o número de promastigotas de *Leishmania* diminuiu para todos os grupos testados. Quando co-cultivadas com *Serratia*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* apresentaram uma mortalidade de 36,25%, ao passo que 41,30% de promastigotas de *L. major* morreram quando comparado com o número de parasitas no tempo inicial (Figura 9) em presença deste gênero bacteriano. Quando os parasitas foram expostos a *Lysinibacillus* todos os parasitas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* morreram, enquanto a taxa de mortalidade de *L. braziliensis* e *L. major* foi 88,75% e 81,25% respectivamente.

Após 48 horas foi mantida a tendência de diminuição no crescimento do parasito. No co-cultivo com *Serratia* as diminuições registadas para *L. infantum chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* foram 28,90%, 33,40%, 43,10% e 40,40%, respectivamente, quando comparado com o tempo de 24 horas. Neste mesmo tempo, quando, *L. braziliensis*, *L. major* foram co-cultivados com *Lysinibacillus* todos os parasitas foram observados mortos.

Após 72h, os grupos restantes mantiveram a tendência de queda. Todos os parasitos co-cultivados com *Serratia* foram determinados como mortos.

Entre 96 a 144 horas, para a os demais grupos, observou-se a lise de todos os parasitas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis*, com exceção dos grupos co-cultivados com *Pseudomonas* e *Enterobacter*. De *L. braziliensis*, apenas não foi observada a lise dos grupos co-cultivados com *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Erwinia* e de *L. major* co-cultivados com *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Enterococcus*.

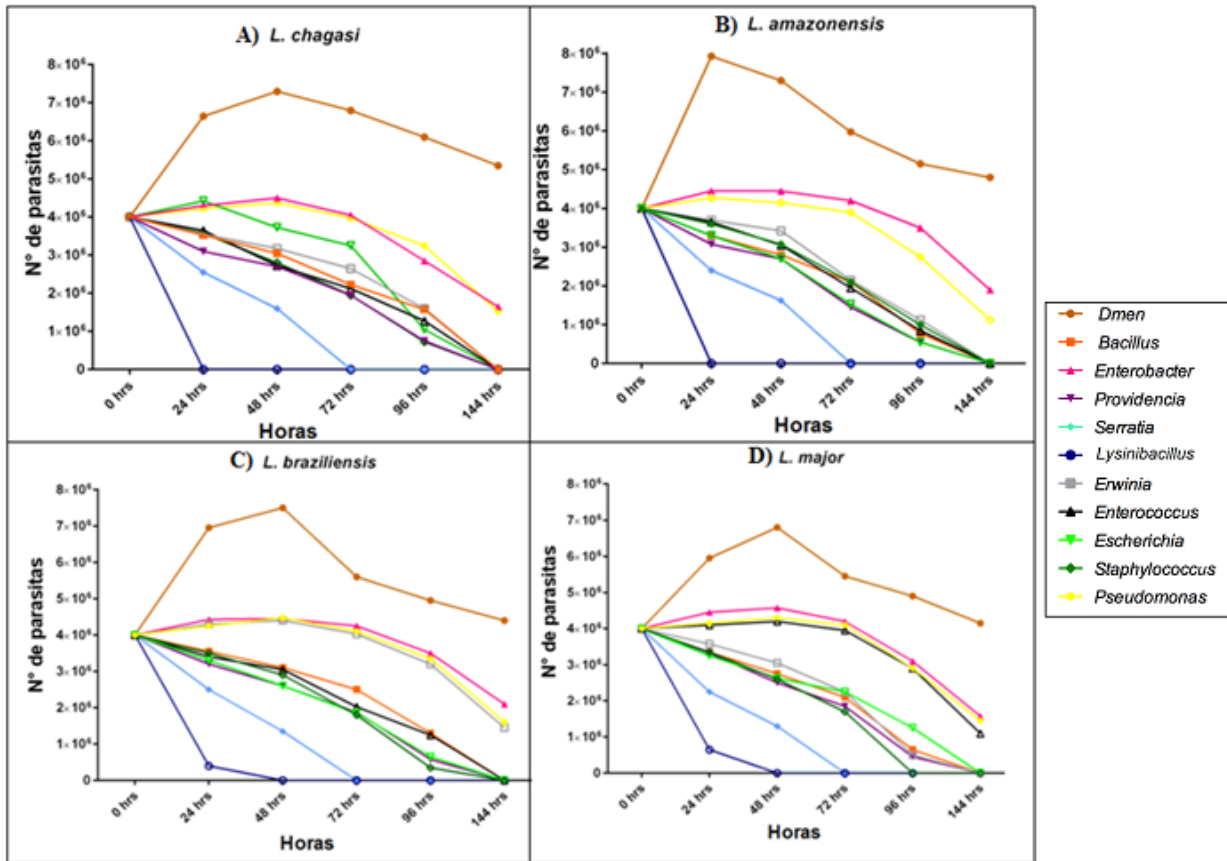


Figura 9: Atividade lítica observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonensis*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. braziliensis*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.

Em relação à redução da densidade parasitaria, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos os grupos, quando comparado com o controle ($\alpha = 0,05$).

5.4 Efeito de bactérias não nativas de *Lu. longipalpis* na co-cultura com *Leishmania* spp.

A atividade lítica de três gêneros bacterianos, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, isolados a partir de larvas de *Anopheles aquasalis* foi analisada por co-cultura com promastigotas de *Leishmania*.

Após 24 horas, as promastigotas de *Leishmania* de todas as espécies testadas, apresentaram uma grande redução no número de parasitos (Figura 10), atingindo as seguintes percentagens de morte: 55,4%, 62%, 70% e 50% para *L. infantum chagasi*, *L. amazonensis*, *L.*

braziliensis e *L. major*, respectivamente. Chama a atenção que, neste tempo, todos os grupos de co-cultura envolvendo *Lysinibacillus* apresentaram a morte completa dos parasitas.

Em 48 horas a tendência de redução persistiu, apresentando a seguinte porcentagem de mortalidade: 15,3%, 43,6%, 29,2% e 24,3 % para cada espécie de *Leishmania* seguindo a ordem descrita anteriormente, comparando com os números de parasitos do tempo anterior (24 horas). Ao avaliar o efeito da bactéria *Aeromonas* isolada de anofelinos no co-cultivo, todos os parasitas foram registrados como mortos neste tempo. Após 72h, e referindo-se à exposição à *Enterobacter*, foram registradas as seguintes porcentagem de redução: 56,3%, 33,4%, 41,3% e 6.45% para cada espécie *Leishmania* quando se compara com a quantidade de parasitas vivos em 48 horas de co-cultura. Depois de 96 horas a grande maioria dos parasitos já tinham morrido.

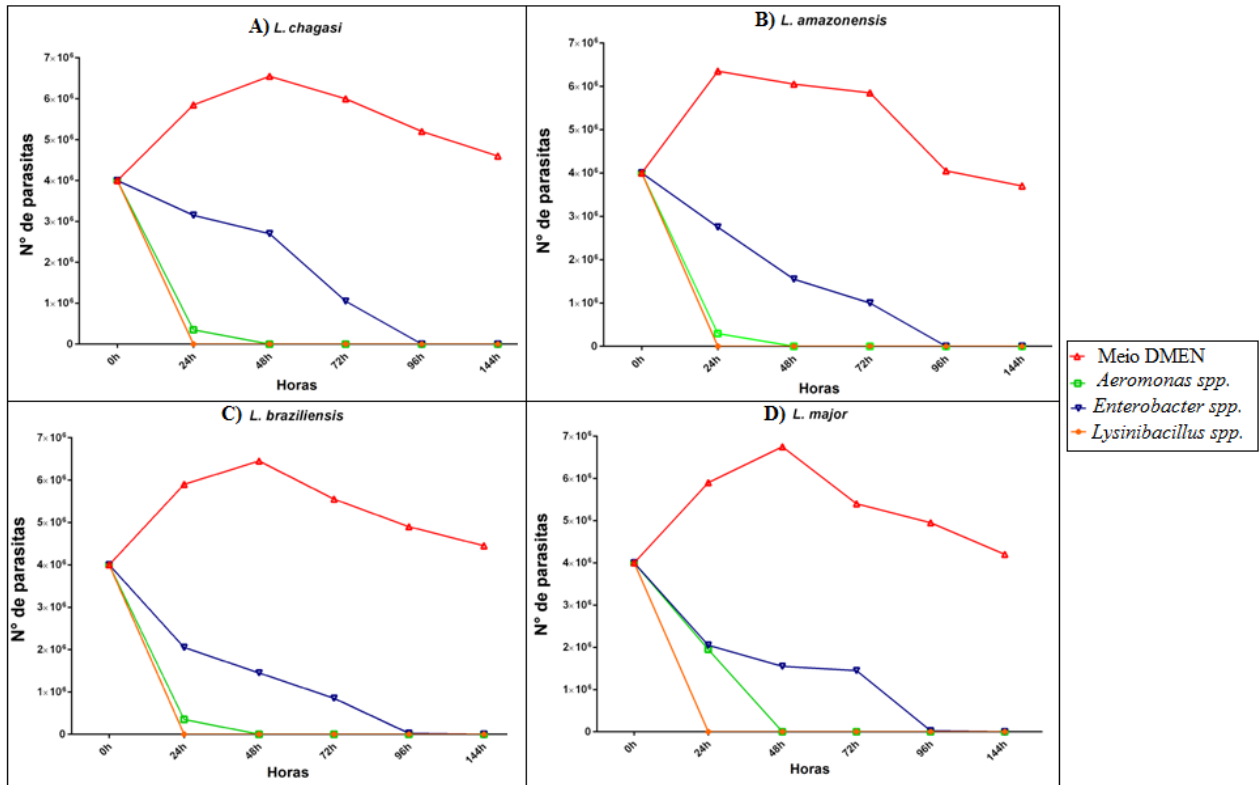


Figura 10: Atividade lítica observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com 3 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *An. aquasalis*. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonensis*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. braziliensis*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L. major*.

Em relação à redução da densidade parasitária, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos os grupos, quando comparado com o controle ($\alpha = 0,05$).

5.5 O efeito modulador de sacarose na co-cultura e na metaciclôgenese dos parasitas

Após 24 horas de co-cultura suplementada com 15% de sacarose as formas metacíclicas aumentaram de zero para $1,75 \times 10^6$, $1,85 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $1,35 \times 10^6$ para *L. infantum chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente (Figura 11).

Depois de 48 horas, foi possível observar um acréscimo no número de parasitas na forma metacíclica, quando comparado com o controle, de 1.3, 1.8, 1.2 e 1.9 vezes, seguindo a mesma ordem de espécies de *Leishmania* descrita anteriormente. Após 72 horas de crescimento a tendência tornou-se negativa em todos os grupos de teste e de tratamentos, na

medida em que, no sexto dia todos os parasitas estavam mortos. Nos grupos co-cultivados sem a adição de sacarose não foram observadas as formas metacíclicas.

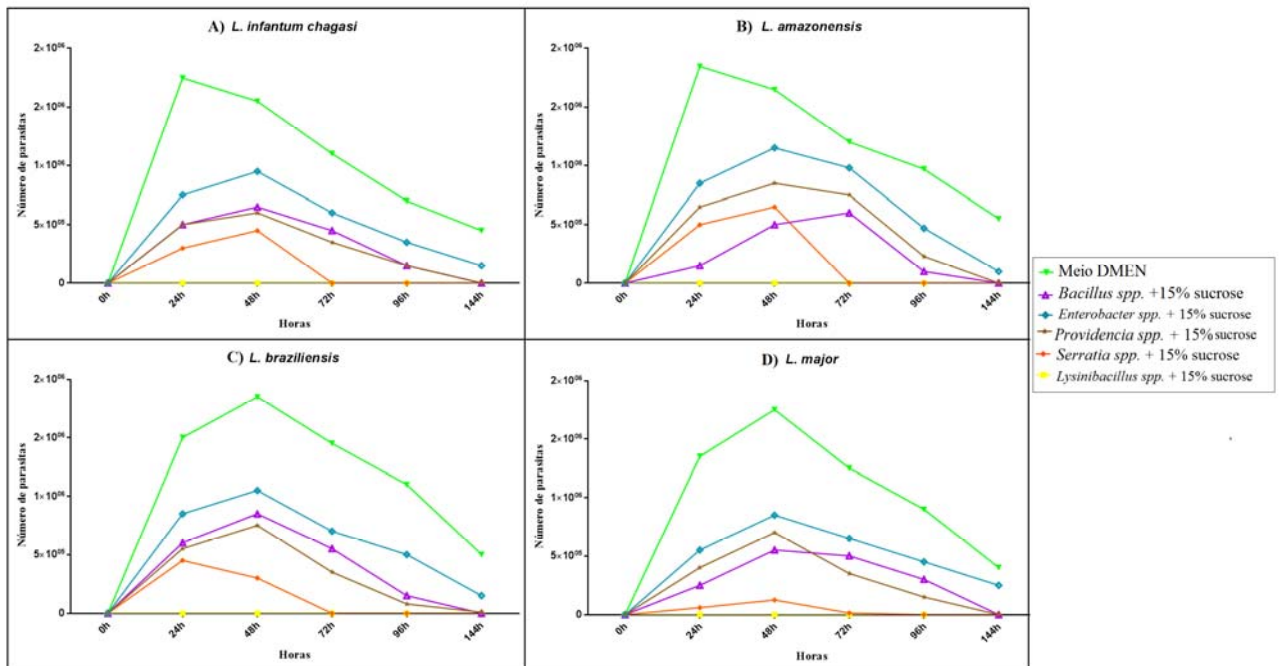


Figura 11: Atividade lítica e metaciclo gênese observada ao longo de 144 horas com as quatro espécies de *Leishmania* co-cultivadas com os 10 gêneros de bactérias isoladas do intestino médio de *Lu. longipalpis* suplementadas com sacarose. A) Co-cultivo das bactérias com a *L. infantum chagasi*. B) Co-cultivo das bactérias com a *L. amazonensis*. C) Co-cultivo das bactérias com a *L. braziliensis*. D) Co-cultivo das bactérias com a *L.*

Em relação à redução da densidade parasitaria, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todos os grupos, quando comparado com o controle ($\alpha = 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde a segunda maior doença infecciosa em todo o mundo (OMS, 2016) e afeta mais de 1,5 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde estima que cerca de 3 mil pessoas sejam infectadas pela doença anualmente. Conhecimentos acerca da microbiota associada aos flebotomíneos são essenciais para compreender as interações existentes com o patógeno, assim como elucidar o seu impacto na transmissão vetorial. .

A diversidade da microbiota intestinal associada a larvas e adultos de insetos, em geral, é distinta e influenciada, muitas vezes, pelo local onde vivem e por seu comportamento alimentar (Minard et al., 2013). Em flebotomíneos, os estágios larvais estão sujeitos a adquirirem diversos microrganismos, pois se alimentam de fungos e bactérias que crescem em solo rico em matéria orgânica (Mukhopadhyay et al. 2012). Essa microbiota adquirida durante a fase larvar pode permanecer até a fase adulta, para isso as bactérias precisam passar por todo o processo de metamorfose do inseto, o que se conhece como transmissão transtadial (Moll et al.,2001; Wang et al., 2011;Volf et al., 2002).

Em mosquitos, foi demonstrado que os gêneros bacterianos *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Cryseobacterium* e *Serratia* podem resistir ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento (Rani et al., 2009). Além da microbiota adquirida durante a fase larvar, os adultos por se alimentarem de diversas fontes de açúcar, como néctar floral, frutas em decomposição e açúcares de plantas e sangue, também estão propensos a adquirirem outros microrganismos; assim como na alimentação sanguínea (Buck et al.,2016).

A comunidade bacteriana intestinal pode desempenhar diversas funções, entre elas, aumento dos movimentos peristálticos, proteção indireta do hospedeiro através do estímulo do sistema imune, competição por nutrientes e sítios de adesão do parasita (Dillon et al., 2005; Minard et al., 2013; Engel & Moran, 2013). Ausência ou eliminação da fauna microbiana, ou até mesmo a modificação da composição dessa fauna pode reduzir o *fitness* do inseto (Thomas et al., 2012).

Neste estudo, foi identificada a microbiota nativa de *Lu. longipalpis* em seus diferentes estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas, com a finalidade de reconhecer a mesma. Para tanto, utilizamos o método cultivável, isolamos 10 gêneros bacterianos, seis Gram-negativos (60%) e quatro Gram-positivos (40%). Estes achados estão de acordo com

Oliveira e colaboradores (2000; 2001) que caracterizaram a microbiota intestinal como prevalentemente de bactérias Gram negativa; em *Lu. longipalpis* provenientes de diferentes localidades. Utilizando a análise metagênômica, McCarthy (2011) e Monteiro e colaboradores (2016) também encontraram uma predominância de bactérias Gram negativas em seus estudo, embora o primeiro analisou machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* e o segundo fêmeas de *Lu. intermedia*.

Em nosso trabalho apenas um gênero bacteriano, *Bacillus*, foi comum a fase imatura (pupa) e adulta, sugerindo que essa bactéria pode-se associar transtadialmente ao hospedeiro flebotomíneo. Volf e colaboradores (2002), demonstraram que *P. dubosqui* apresenta bactérias associadas ao intestino imediatamente após a emergência do adulto, e que o perfil taxonômico dessa comunidade bacteriana é muitas vezes distinto ao determinado nos adultos e Dillon e colaboradores (1996), em um estudo realizado com *P. papatasi*, sugeriram que a diversidade bacteriana presente no intestino flutua durante sua vida.

Nas fases imaturas foram encontrados os gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Pseudomonas*. Em outros estudos com larvas de flebotomíneos colonizadas em laboratório foram encontrados um gênero de bactéria *Enterobacter* e uma classe *Bacilli* (onde é incluído o gênero *Bacillus*) (Maleki-Ravasan *et al.*, 2014, Peterkova-Koc *et al.*, 2012).

Em insetos adultos os isolados bacterianos dos intestinos médios revelaram predominantemente gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae (Gram negativa), são eles: *Erwinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia* e *Providencia*. Também foi observado por Dillon e colaboradores (1996) e Volf e colaboradores (2002). Enterobacteriaceae parece ser a família mais abundante identificada em insetos quando utilizado métodos cultiváveis. Esse fato pode ser explicado devido às bactérias se desenvolverem rapidamente em cultura, dificultando o crescimento de outras espécies (Dillon *et al.*, 1996).

Dentre os gêneros encontrado, *Erwinia* e *Enterobacter* já foram identificados em plantas (Zhang *et al.*, 2014 e Hoffmann *et al.*, 2008). Portanto acreditamos que esse encontro pode ser explicado por serem encontradas em superfícies de plantas, fonte alimentar dos flebotomíneos adultos. O gênero *Escherichia* já foi descrito em flebotomíneos do Novo e Velho Mundo (Schlein *et al.*, 1985; Gouveia *et al.*, 2008; Akhoundi *et al.*, 2012; Maleki-Ravasan *et al.*, 2014). *Serratia* é um gênero frequentemente presente em flebotomíneos (Warburg *et al.*, 1991; Dillon *et al.*, 1996; Oliveita *et al.*, 2001; Volf *et al.*, 2002; Gouveia *et al.*, 2008; Akhoundi *et al.*, 2012; Sant'anna *et al.*, 2012; Maleki-Ravasan *et al.*, 2014, Monteiro *et al.*, 2016). *Providencia* é usualmente encontrado em ambientes aquáticos e terrestres (Yoh

et al., 2005) e já foi descrita na hemolinfa da *Drosophila melanogaster* (Ryan et al., 2004) e em intestino médio de *Culex quinquefasciatus* (Chandel et al., 2013) mas em flebotomíneos é a primeira descrição.

Os gêneros bacterianos Gram positivos; *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Lysinibacillus* foram encontrados nas fases imaturas e o gênero *Staphylococcus* no grupo jejum (U-adulto). Apesar de serem menos predominantes parecem fazer parte da microbiota comum de flebotomíneos do Velho e Novo mundo. Nos insetos do Velho Mundo, Maleki-Ravasan e colaboradores (2014; 2015) descreveram as bactérias Gram positiva; *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* e Hillesland e colaboradores (2008) descreveram os gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus* em seus estudos com *Phlebotomus argentipes*. Em estudos no Novo mundo, Oliveira e colaboradores (2000) também encontraram *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*.

O gênero *Lysinibacillus*, inicialmente designada como *Bacillus* spp, é cosmopolita saprófita de solos e ambientes aquáticos, sendo capazes de produzir esporos quando submetidas a condições adversas (Crickmore, 2016). Sua espécie mais conhecida é a *Lysinibacillus sphaericus*, inicialmente denominada como *Bacillus sphaericus*, é utilizada em preparações comerciais de biolarvicidas e eficaz para o controle de insetos e possui ação tóxica para dípteros, em especial para culicídeos, sendo utilizados em vários países, inclusive no Brasil (Mittal, 2003; Regis et al., 2001; Thiery et al., 1996).

Apesar da limitação da técnica utilizada por nós, ou seja, métodos que dependem de cultivo em que apenas 1% das bactérias já descritas são cultiváveis (Amann et al., 1995). Para nós essa metodologia foi satisfatória, pois outros estudos realizados com insetos, inclusive usando métodos não-cultiváveis de identificação apresentaram baixa riqueza de espécies (Demaio et al., 1996; Oliveira et al., 2000; 2001; Gouveia et al., 2008; Gusmão et al., 2010; McCarthy et al., 2011). Outro ponto que favorece a utilização destes métodos é o fato dos isolados bacterianos poderem ser utilizados nos estudos de interação parasita-vetor-bactéria.

Alder e Theodor, 1927, foram os primeiros a sugerirem que a presença de outros microrganismos poderia modificar o desenvolvimento de *Leishmania* spp.. Pumpuni e colaboradores, em 1996, sugeriram que a presença de bactérias livres no lúmen intestinal modifica o “ambiente” podendo inibir o desenvolvimento do parasita da malária levando a uma redução significativa nas taxas de infecção e densidade de oocistos.

Alguns estudos já vêm demonstrando a interferência de bactérias na infecção do vetor por patógenos, demonstrando que os microrganismos existentes naturalmente no intestino

médio de insetos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos parasitas em insetos vetores. Em estudo *in vivo*, Sant'Anna e colaboradores (2014) recolonizaram o intestino de fêmeas de *Lu. longipalpis* (Jacobina, Bahia) com bactérias e leveduras extraídas de seus intestinos. A recolonização do intestino dessas fêmeas com estes microrganismos interferiu na capacidade da *L. mexicana* em colonizar *Lu. longipalpis*. Foi observada uma redução no número de flebotomíneos infectados que haviam sido pré-alimentados com *Pseudozyma sp.*, *Asaia sp.* e *Ochrobactrum intermedium* e redução da carga parasitária.

Em estudos, *in vitro*, Azambuja e colaboradores, 2004, avaliaram os efeitos das bactérias residentes no estômago de *Rhodnius prolixus* na infecção por *Trypanosoma cruzi* e observaram que a espécie bacteriana *Serratia marcescens* foi capaz de lisar *T. cruzi*. Em se tratando de *Leishmania* spp. foi demonstrado o efeito da microbiota na sobrevivência do parasita quando co-cultivado com algumas espécies de bactérias, mostrando que *Serratia*, *Bacillus* e *Haemophilus parainfluenzae* induziram lise das formas promastigotas (Moraes *et al.*, 2008; 2009, Hassan *et al.*, 2014).

Os isolados bacterianos provenientes dos estágios imaturos e diferentes estados fisiológicos do *Lu. longipalpis* (10 isolados), foram testados com intuito de encontrar bactérias patogênicas com potencial para influenciar o desenvolvimento de *Leishmania* spp. Observamos em nossos estudos a atividade lítica ou efeito *in vitro* dos gêneros bacterianos em promastigotas de *L. infantum chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Os gêneros *Lysinibacillus* e *Serratia*, foram os que mais chamaram atenção por apresentarem uma maior redução no número de parasitas para todas as espécies testadas.

Uma possível explicação para a mortalidade dos parasitas é a formação de uma comunidade bacteriana estruturada reconhecida como biofilmes (Watnick e Kolter, 2000, Weitere *et al.*, 2005 e Queck *et al.*, 2006). Moraes e colaboradores (2008; 2009) através de microscopia eletrônica de varredura observaram que a bactéria *S. marcescens* (cepa SM365) adere a todo o corpo celular e flagelo de *L. chagasi* e *L. braziliensis* quando incubadas, ocorrendo a formação de diversas estruturas filamentosas identificadas como biofilmes levando a lise da membrana celular dos parasitas.

Ao avaliarmos o efeito de bactérias não nativas, previamente isolada de larvas de *An. aquasalis* (*Aeromonas* e *Lysinibacillus*) no co-cultivo foi observado que todos os parasitas haviam morrido após 48 horas de incubação com o primeiro gênero e em até 24 com o segundo. Mourya e colaboradores (2002) observaram um aumento na susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao vírus da dengue quando os mosquitos foram alimentados com *Aeromonas*

previamente isolada de *Culex quinquefasciatus*. Esses resultados sugerem que isolados bacterianos provenientes de outras espécies podem ter algum tipo de ação (modulação), positiva ou negativa na interação vetor-patogeno assim como no sucesso da transmissão.

Os nossos isolados bacterianos pertencentes à família Enterobacteriaceae (exceção *Serratia*) causaram pequena mortalidade em todas as espécies de *Leishmania* testadas, entretanto estudos com *Anopheles arabiensis* sugerem que a presença de espécies da família Enterobacteriaceae no seu intestino atuam bloqueando do desenvolvimento do *Plasmodium falciparum*, matando o parasita antes de sua invasão no epitélio intestinal tornando esta população refratária à infecção. Este fenômeno foi associado à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Crimotich *et al.*, 2011). Wang e colaboradores (2011) propuseram que bactérias podem induzir uma modificação no ambiente intestinal de *Anopheles gambiae*, tornando-o um ambiente redutivo, auxiliando assim na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), fato que permitiria uma resposta imune agressiva do mosquito quando infectados pelo parasita.

Em mosquitos, estudos anteriores sugerem que a presença de bactérias no intestino modifica o ambiente intestinal, levando a uma super-expressão do sistema imune e conseqüentemente, ao aumento na taxa de produção de peptídeos antimicrobiano, inibindo assim o desenvolvimento de parasitas (Pumpuni *et al.*, 1996; Ratcliffe & Whitten, 2004; Michel & Kafatos, 2005). Esses peptídeos provavelmente possuem um papel chave no controle de bactérias e no desenvolvimento de infecções por parasitos (Beard *et al.*, 2001; Boulanger *et al.*, 2004). Meister e colaboradores (2009) demonstraram que o sistema imune do mosquito age contra a proliferação de bactérias e modula a intensidade da infecção no mosquito quando infectado com *P. berghei* ou com *P. falciparum*, eliminando um grande número de parasitas.

Com intuito de mimetizar o que ocorre *in vivo* e suprir os nutrientes do meio de cultivo, o papel da sacarose foi testado ao adicioná-la no co-cultivo. A seiva vegetal e o açúcar e ou podem representar uma fonte de energia para a microbiota nativa e ou *Leishmania ssp.* já que os insetos tanto machos quando femeas se alimentam de plantas ou seivas. Esse tipo de alimento é estocado no divertículo esofágico e posteriormente absorvido pelo inseto, ou seja, os subprodutos desse tipo de alimentação estarão em contato com a microbiota e parasitos. Como resultado, a adição de sacarose não modificou a mortalidade dos parasitas mas levou a uma maior metaciclogênese em todos os grupos, exceto quando incubadas com *Lysinibacillus ssp.* onde não foram observados metacíclicos.

Não sabemos o mecanismo, mas não podemos excluir a possibilidade de que os produtos tanto de promastigota como de metabolismo bacteriano contribuam para uma queda no pH o que estimula a metaciclogênese, corroborando com estudos *in vitro* que tem demonstrado que "condições estressantes" levaram a diferenciação dos parasitas de *Leishmania spp.* para a forma metacíclica. Além disso, a falta de nutrientes, a diminuição do pH e baixos níveis da coenzima tetrahidrobiopterina influenciam na metaciclogênese (Sacks & Perkins, 1984, Bates & Tetley, 1993; Bates et al., 2008). A espécie do parasita e as condições de cultura (composição do meio, temperatura, fase de cultura e densidade do parasita) influenciam significativamente no desenvolvimento de promastigotas metacíclicos (Cunningham *et al.*, 2001). Serafim e colaboradores (2008) demonstram que a indução á metaciclogênese pode ser controlada pela presença de adenosina. A adição de adenosina a culturas de promastigotas metacíclicos de *Leishmania* induz a diferenciação destes parasitas *in vitro*. Entretanto, *in vivo* a adição de adenosina inibe a metaciclogênese.

Com nossos estudos *in vitro* foi possível observar que os gêneros *Lysinibacillus* e *Serratia* apresentaram efeitos líticos sobre as espécies *L. i. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. Estudos adicionais *in vivo* utilizando principalmente esses dois gêneros bacterianos são necessários para compreender como a microbiota interfere na capacidade vetorial.

7 CONCLUSÃO

I. Foram identificados os seguintes gêneros bacterianos em *Lu. longipalpis* provenientes da Gruta da Lapinha, MG: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Lysinibacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus*.

II. Dos isolados bacterianos identificados, 60% são Gram- negativos e a família Enterobacteriaceae é a prevalente.

III. Quando os parasitas foram co-cultivados com o gênero bacteriano *Lysinibacillus* todos os parasitas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* morreram em até 24h. E *L. braziliensis* e *L. major* em até 48h de co-cultivo.

IV. A atividade lítica de três gêneros bacterianos, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, isolado a partir de larvas de *Anopheles aquasalis* foi analisada por co-cultura com promastigotas de *Leishmania* e após 96 horas de co-cultura a grande maioria dos parasitas já tinham morrido.

V. Nos grupos co-cultivados sem a adição de sacarose não foram observadas as formas metacíclicas.

VI. Os gêneros *Lysinibacillus* e *Serratia* apresentaram maior efeito lítico sobre todas as quatro espécies de *Leishmania* testadas, sendo duas bactérias candidatas para testes *in vivo*.

Os gêneros bacterianos; *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Lysinibacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus*, foram isolados de estágios imaturos (larva e pupa) e adultos de *Lu. longipalpis* em diferentes condições fisiológicas, sendo a família Enterobacteriaceae predominante.

Nosso estudo de co-cultivo revelou que os gêneros bacterianos *Lysinibacillus* e *Serratia* provocaram mortalidade em todas as espécies de *Leishmania* estudadas. O co-cultivo e a suplementação do meio com sacarose (15%) causou a mesma mortalidade aos parasitas, entretanto foi possível observar a diferenciação dos parasitas para a forma metacíclica.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi M, Bakhtiari R, Guillard T, et al. Diversity of the Bacterial and Fungal Microflora from the Midgut and Cuticle of Phlebotomine Sand Flies Collected in North-Western Iran. Chaturvedi S, ed. PLoS ONE. 2012; 7(11):e50259.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995, 59: 143–169.
- Ashford RW. A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. *Parassilologia* JJ 1991.
- Azambuja P., Feder D. Garcia E.S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 2004,107: pp. 89–96
- Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. PLoS Neglected Tropical Diseases 2010;4(3):e627.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64:1-109.
- Basset A, Tzou P, Lemaitre B, Boccard F. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO reports*. 2003 ,4(2):205–9.
- Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11: 340–344.
- Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp Parasitol*, 1993, 76: 412–423. 4.
- Baton LA, Robertson A, Warr E, Strand MR, Dimopoulos G. Genome-wide transcriptomic profiling of *Anopheles gambiae* hemocytes reveals pathogens specific signatures upon bacterial challenge and *Plasmodium berghei* infection. *BMC Genomics* 2009, 10: 257-270.
- Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int J Parasitol*, 2001; 31: 621-627. PM:11334952
- Bignell DE. Introduction to symbiosis; *In* Abe T, Bignell DE, Higashi M, eds, 2000, 189–208. *Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*. Dordrecht, Neth.: Kluwer.

- Borovsky D, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1987; 1(3):235-42.
- Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, Svobodova M, Beverley SM, Spath G, Brun R. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2004; 72: 7140-7146. PM:15557638
- Buck, M. et al. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Sci. Rep.* 2016: 6, 22806.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib, H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral Leishmaniasis: what are the need for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:S7-S16.
- Chandel K, Mendki MJ, Parikh RY, Kulkarni G, Tikar SN, Sukumaran D, et al. Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India. *PLoS ONE*, 2013: 8(11): e80453. doi:10.1371/journal.pone.0080453
- Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC.. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002 ,5591 159-165.
- Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2011;332(6031):855-8.
- Costa JR. J. W., Mucocutaneous leishmaniasis in a US Citizen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathl Oral Radiol Endod*; 96:573-7.2003
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2016) <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 29 de Dezembro de 2016.
- Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science*, 2001: 292: 285–287.
- DeMaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psophora columbiae* mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 1996; 54: 219-223.

- Descoteaux A, Turco JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 341-52.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.
- Dillon R, Charnley K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* 2002, 153:503–9.
- Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2004; 49: 71–92.
- Dillon RJ, el Kordy E, Shehata M, Lane RP. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Dec;90(6):669-73.
- Dillon RJ, Lane RP. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langerone*. *Parasitol Res* 1993; 79: 492-6.
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol Letters* 2005, 8: 1291–1298.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, 2009; 5:e1000423.
- Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors*, 2012; 5: 276.
- Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J MedEntomol* 1997; 34:719-28.
- Gaio ADO, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina M a, Pimenta PFP, Lemos FJ a. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & vectors*. 2011 Jan;4(1):105.
- Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *Journal of Medical Entomology*, 2003; 3:371-4.
- Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SMP. Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated to Different Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol* 2008, 37: 597-601.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches on disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35:1169-80

Grice, EA., Kong, HH, Renaud, G., Young, AC., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, GG., Blakesley, RW., Wolfsberg, TG., Turner, ML., Segre, JA. Adiversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* 2008; 18: 1043-1050.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci Jr M, Berbert-Molina MA, Lemos FJA. Culturedependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 2010, 115:275-81.

Hassan MI, Al-Sawaf BM, Fouda MA, Al-Hosry S, Hammad KM. A Recent Evaluation of the Sandfly, *Phlebotomus Papatasi* Midgut Symbiotic Bacteria Effect on the Survivorship of *Leishmania Major*. *J Anc Dis Prev Rem.* 2014. 2: 110.

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

Hillyer JF, Christensen BM.. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *J Histochem Cytochem.* 2005, 53:689-98.

Hoffman JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol* 2002, 3: 121-126.

Hoffmann, H et al. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Syst Appl Microbiol*, Gauting, Germany, v. 82131, n. 2, p.206-2012, 28 abr. 2008. PMID: 15900967.

Jobling B. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher; 1987, 119p.

Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PFP, Rowton E, Sacks DL. . The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitol.* 2000. 121:(1)23-33.

Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, Kirby JR, Valenzuela JG, Kamhawi S, Wilson ME. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *mBio*, 2017. 8:e01121-16

Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1977a, 13: 429-440

Killick-Kendrick R. The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clin Dermatol* 1999;17:279-89.

Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J, Raffa KF. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ. Entomol.* 2009, 38:67-77.

Kuzina LV, Miller ED, Ge BX, Miller TA.. Transformation of *Enterobacter gergoviae* isolated from pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) gut with *Bacillus thuringiensis* toxin. *Curr. Microbiol.* 2002, 44:1-4

Lacey LA, Brooks WM. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: Lacey LA, editor. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. 1st ed. San Diego: Academic Press Press; 1997. P. 409

Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1979. 73: 239-242.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-27.

Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31-43.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J, Soteriadou K, Dedet J, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(22): 9375-80.

Maleki-Ravasan N1, Oshaghi MA1, Hajikhani S2, Saeidi Z1, Akhavan AA1, Gerami-Shoar M3, Shirazi MH2, Yakhchali B4, Rassi Y1, Afshar D2. Aerobic Microbial Community of Insectary Population of *Phlebotomus papatasi*. *J Arthropod Borne Dis.* 2014 Dec 18;8(1):69-81.

Maleki-Ravasan, N.; Oshaghi, M.A.; Afshar, D.; Arandian, M.H.; Hajikhani, S.; Akhavan, A. A.; Yakhchali, B.; Shirazi, M.H.; Rassi, Y.; Jafari, R.; Aminian, K.; Fazeli-Varzaneh, R.A.; Durvasula, R. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. *Parasit Vectors.* 2015 Jan 29;8:63.

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

McCarthy CB, Diambra LA, Pomar RVR. Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, using an unbiased High-Throughput Approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 5(9): e1304.

McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *J Biol Chem* 1990; 265:19611-23.

Meister S, Agianian B, Turlure F, Religio A, Morlais I, Kafatos FC, Christophides GK. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000542. PM:19662170

Michel K, Kafatos FC. Mosquito immunity against Plasmodium. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005; 35: 677-689. PM:15894185

Minard et al.: Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors* 2013 6:146

Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância epidemiológica em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Ed. Ministério da Saúde, 182p. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>. Acesso em de 05 de Janeiro de 2017.

Mittal, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal of Vector Borne Diseases*, Delhi, v. 40, n. 1-2, p. 20-32, 2003.

Moll, RM., Romoser, WS., Modrzakowski, MC, Moncayo, AC., Lerdthusnee, K. Meconial perithophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol*, 2001. 38: 29-32.

Monteiro, CC et al. Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites & Vectors*, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, v. 480, n. 9, p.1-6, 31 ago. 2016.

Mourya, DT., Pidiyar, V., Patole, M., Gokhale, MD., Shouche, Y. Effect of Midgut Bacterial Flora of *Aedes aegypti* on the susceptibility of Mosquitoes to Dengue Viruses. *Dengue Bulletin.* 2002. 26: 190-194.

Moraes CS, Seabra SH, Castro DP, Genta FA, Brazil R P, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Experimental Parasitology* 2008, 118 561–568.

Moraes CS, Seabra SH, Albuquerque-Cunha JM, Castro DP, Genta FA, de Souza W, Brazil R P, Garcia ES, Azambuja P. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Experimental Parasitology* 2009, 122 84–90.

Mukhopadhyay J, Braig HR, Rowton ED, Ghosh K . Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, Vector of *Leishmania major* in the old world. *PLoS ONE*, 2012. 7(5): e35748.

Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 2000; 37(1): 134-40.

Oliveira SMP; Moraes BA; Gonçalves CA; Giordano-Dias CM; Vilela ML; d'Almeida JM; Asensi MD; Mello RP. Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Psychodiade feeding in blood meal and saccharose plus blood meal. *Cadernos de Saúde Publica do Rio de Janeiro*, 2001, 17(1) 229-232.

Oliveira SMP; Moraes BA; Gonçalves CB; Giordano-Dias CM; d'Almeida JM; Asensi MD; Mello RP, Brazil RP. Prevalence of the microbiota in the digestive tract of wild caught females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Psychodiade. *Revista da Sociedade brasileira de Medicina tropical* 2000, 33(3): 319-322.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100:1803–7

Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* 2004:2551-63.

Peloquin JJ, Lauzon CR, Potter S, Miller TA. Transformed bacterial symbionts re-introduced to and detected in host gut. *Curr. Microbiol.* 2002, 45:41–45

Peterkova-Koci K, Robles-Murguía M, Ramalho-Ortigao M, Zurek L. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors.* 2012; 5:145. Epub 2012/07/26.

Pimenta PFP, Saraiva EM, Rowton E, Mogi GG, Garraway LA, Beverley SM, Turco S, Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9155-9.

Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitol.* 1997; 115: 359-369.

Polz, M.F. and Cavanaugh, C.M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3724–3730.

Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR. *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Experimental Parasitology*, 1993; 77: 195.

Pumpuni CB, DeMaio J, Kent M, Davis JR, Beber JC. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on Plasmodium sporogonic development. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1996; 54: 214-218.

Queck S.Y., Weitere M., Moreno A.M., Rice S.A., Kjelleberg S. The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, 8 (2006), pp. 1017–1025

Rangel EF, Lainson R. Importância Médico-Veterinária. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ; 2003. p.15-9.

Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA (1995).

Rani A., Sharma, A., Rajagopa, R., Adak, T., Bhatnagar, RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BCM Microbiol.* 2009. 9: 96-118.

Ratcliffe NA, Whitten MMA. *Vector immunity*. 2004; 199-262

Regis, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodinus prolixus*. *Biochem. J.* (1995), 308:243-249.

Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31-43.

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

Ryan KJ; Ray CG (editors). *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. ed. McGraw Hill, 2004. ISBN 0-8385-8529-9

Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ () Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 2008, 319:777– 782

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

Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: 202 Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk; 2008. p. 205-38.

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

Sangiorgi B, Miranda DN, Oliveira DF, et al. Natural Breeding Places for Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Semiarid Region of Bahia State, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*. 2012;2012:124068.

Sant'Anna MRV, Darby AC, Brazil RP, Montoya-Lerma J, Dillon VM, Bates PA, et al. Investigation of the Bacterial Communities Associated with Females of *Lutzomyia* Sand Fly Species from South America. *PLoS ONE*, (2012) . 7(8): e42531.

Sant'anna, MRv et al. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & Vectors*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.329-339, 2014.

Schlein Y, Polacheck I, Yuval B. Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*. 1985, (1) 57-66.

Secundino NF, de Freitas VC, Monteiro CC, Pires AC, David BA, Pimenta PF. The transmission of *Leishmania infantum* chagasi by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. *Parasit Vectors*. 2012 Jan 19;5:20. doi: 10.1186/1756-3305-5-20.

Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *J. Med. Entomol*. 42(6): 928Ð938 (2005)

Secundino NF; Pimenta PFP. Scanning electron microscopy study of the egg and immature stages of the sandflies *Lutzomyia longipalpis*. *Acta Microscópica*, v. 8, p. 33-38, 2000.

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

Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PAC, Marques-da-Silva EA, Gonçalves R, et al. *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. *PLoS Negl Trop Dis*. (2012). 6(9): e1833.

Shaw JJ, Lainson R. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p.1-121

Smith DC, Douglas AE. *The Biology of Symbiosis*. London: Arnold, 1987; 302 pp.

Soares R, Turco S. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *An. Acad. Bras. Cienc*. 2003. 75: 303–330.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. Microbial Manipulator of Arthropod. *Reproduction*. 1999; 1:71–102.

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

Tanada, Y., Kaya, H., *Insect Pathology*, San Diego: Academic Press. 1993

Teixeira, DE, Benchimol M, Rodruigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W, Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

Telleria EL, Araújo APO de, Secundino NF, & Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* - expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS One*, 2010. 5: 1–8.

Thiery, I. et al. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités*, Paris, v. 7, p. 247-260, 1996.

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp*. 2012; 2: 3. PM:22587947

Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*. 1988; 239:1306–1308.

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

Volf P, Kiewegova A, Nemeč A. Bacterial colonization in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera:Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica* 2002, 49: 73-77.

Walters LL, Irons KP, Guzman H, Tesh RB. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, 1993, 30:179-198.

Wang Y, Gilbreath III TM, Kikutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS one*. 2011;6(9):e24767.

Warburg, A. Entomopathogens of Phlebotomine sand flies: Laboratory experiments and natural infections. *Journal of invertebrate pathology* 58, 189-202 (1991).

Weiss B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 2011; 20: 1–9.

Watnick P., Kolter R., Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182 (2000), pp. 2675–2679

Weitere M., Bergfeld T., Rice S.A., Matz C., Kjelleberg S., Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode. *Environmental Microbiology*, 7 (2005), pp. 1593–1601

Welburn, S.C and Maudlin, I. (1999) TseTse-trypanosome interaction: rites of passage. *Parasitol. Today* 15, 399-403

World Health Organization, 2016. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/. Acesso em de 15 de Dezembro de 2016.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst*, 1994. 54: 1-881.

Yoh, M. Importance of *Providencia* species as a major cause of travelers diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, n. 11, p. 1077 -1082, nov. 2005.

Zhang, Zhenfen; NAN, Zhibiao. *Erwinia persicina*, a possible new necrosis and wilt threat to forage or grain legumes production. *European Journal Of Plant Pathology*, Lanzhou, v. 139, n. 2, p.343-352, jul. 2014.