

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DAISY ALINE AZEVEDO BRITO

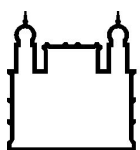
**Investigação da resposta imune inata
relacionada à via JAK-STAT em
Lutzomyia longipalpis infectada com
*Leishmania infantum chagasi***

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

Orientadora: Dra. Yara Maria Traub Csekö

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DAISY ALINE AZEVEDO BRITO

**Investigação da resposta imune inata relacionada à via
JAK-STAT em *Lutzomyia longipalpis* infectada com
*Leishmania infantum chagasi***

ORIENTADORA: Dra. Yara Maria Traub Csekö

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno (IOC/FIOCRUZ) - **Presidente**

Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (IBqM/UFRJ)

Prof. Dr. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva (IBqM/UFRJ)

Prof. Dr. Daniele Pereira de Castro (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Ana Cristina Bahia Nascimento (BCCF/UFRJ)

Rio de Janeiro, de agosto de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Azevedo Brito, Daisy Aline.

Investigação da resposta imune inata relacionada à via JAK-STAT em *Lutzomyia longipalpis* infectada com *Leishmania infantum* chagasi / Daisy Aline Azevedo Brito, Yara Traub Csekö - Rio de Janeiro, 2018.
84 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Yara Traub Csekö.

Bibliografia: f. 74-83

1. Imunidade. 2. modulação. 3. interação. 4. JAK-STAT. I. Csekö, Yara Traub. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esta dissertação
à minha maior surpresa
e presente do mestrado,
meu filho Gael.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, a quem devo a vida e todo o mérito de todas as minhas conquistas, pois dEle por Ele e para Ele são todas as coisas.

À minha mãe, Suzana, por toda a ajuda durante a escrita da dissertação, cuidando do Gael e de mim. Obrigada mammy!

Ao meu pai, Walter e meus irmãos, David e Drielle, que sempre estiveram ao meu lado me dando todo apoio e vários conselhos durante essa jornada.

Ao meu melhor amigo, companheiro e pai do meu filho, Murylo, por todo o suporte emocional nesse último ano de loucuras entre artigos e fraldas. À toda a nossa família (sou agregada rs), por todo o suporte durante esse último ano.

Agradeço principalmente por ter me dado a maior razão da minha vida, meu filho Gael, que me deu toda a força e ânimo para chegar aqui.

À minha melhor amiga, quase irmã, madrinha do meu filho, Msc. Thais. Minha gratidão por tudo que você fez e faz por mim e pelo Gael, seja dentro ou fora do laboratório, é algo que nunca conseguirei descrever. Te amamos.

À um dos caras mais inteligentes que eu conheço, meu mais que amigo, meu friend Gabriel. Sem você e suas piadas sem graça o laboratório não seria o mesmo. Ah, obrigada por realizar meu sonho de ser madrinha de casamento, não poderia ser mais especial pra mim. Geralmente eu digo o contrário, mas a Andreia também tem muita sorte de ter um cara como você pra sempre. Tamo junto, friend.

À minha colombiana preferida (o posto era da Shakira rs), Violeta. Obrigada por sua positividade, por sua boa vontade em ajudar a todos e por suas receitas incríveis. Sentirei muito a sua falta. Espero um dia poder te rever.

À minha orientadora, Dra. Yara Traub-Csekö, uma mulher e tanto, super profissional, feminista “raiz” e de uma competência que admiro demais.

Obrigada por acreditar em mim e me dar a oportunidade de fazer parte da sua equipe. Sem seus sábios conselhos eu definitivamente não estaria aqui.

Ao meu co-orientador Erich, uma pessoa excepcional, super profissional, íntegro e tantos outros adjetivos. Obrigada por toda sua paciência, por seus ensinamentos, por seus conselhos profissionais e pessoais que prometo nunca esquecer.

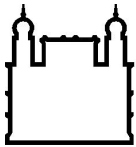
Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores que fizeram parte da minha vida durante esses dois anos: Andréa, Bruno, Daniel, João, David, Tempone, Monique&Livia (minha dupla preferida), Tatiana... Muito obrigada!

À agência de fomento CAPES e a FIOCRUZ pelo incentivo e suporte à pesquisa.

“Assim, permanecem agora estes três: a fé, a esperança e o amor.

O maior deles, porém, é o amor. ”

(1 Coríntios 13:13)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Investigação da resposta imune inata relacionada à via Jak-Stat em *Lutzomyia longipalpis* infectada com *Leishmania infantum chagasi*

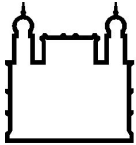
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daisy Aline Azevedo Brito

As leishmanioses são antroponoses de caráter crônico causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e a transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos. No Brasil *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum chagasi*. Além da *Leishmania*, fêmeas de flebotomíneos são expostas a diferentes patógenos e, para sobreviver a infecções, o inseto ativa vias de resposta imune inata, como Toll, IMD e JAK-STAT. Apesar dos poucos trabalhos, já foi possível identificar um papel para as vias IMD e Toll de *L. longipalpis* desafiados por *Leishmania* e outros patógenos. Em relação à via JAK-STAT, em mosquitos é sabido que a sua ativação está relacionada à resposta anti-viral, antibacteriana e à infecção por *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis*. Em *L. longipalpis* infectados por *Leishmania* a expressão de PIAS, uma molécula repressora da via JAK-STAT aumenta. Porém ainda não se sabe quais moléculas desta via têm participação efetiva em resposta à presença do parasita. Nosso objetivo agora é caracterizar as respostas da via JAK-STAT durante a infecção de *L. longipalpis* por *L. i. chagasi*. Neste sentido, identificamos alguns genes relacionados à esta via e avaliamos o perfil de expressão destes utilizando tanto células embrionárias LL5 de *L. longipalpis* como insetos adultos. Em trabalhos anteriores, células LL5 se mostraram um bom modelo para estudo da imunidade de flebotomíneos, com ativação das vias Toll e IMD frente a diferentes desafios. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a via JAK-STAT é ativada durante a infecção por *Leishmania* em células LL5. Além disso, a expressão dos genes desta via em células silenciadas para PIAS sugere que a ativação da via é inibida por outra molécula desconhecida, num possível mecanismo de defesa. Em insetos adultos os resultados indicaram que a *Leishmania* possivelmente pode modular a via JAK-STAT para o estabelecimento da infecção através da ativação de moléculas repressoras. Também observamos, através da análise de expressão dos genes 16s de bactéria e actina de *Leishmania*, uma possível correlação entre a microbiota e o parasit no tubo digestivo do inseto. Resultados preliminares da expressão

dos genes da via em insetos tratados com antibióticos mostraram que as bactérias não interferem na ativação da via JAK-STAT. Entretanto o peptídeo antimicrobiano atacina parece ter um papel importante em resposta a infecções bacterianas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Investigation of the innate immune response related to JAK-STAT pathway in *Lutzomyia longipalpis* infected with *Leishmania infantum chagasi*

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION

Daisy Aline Azevedo Brito

Leishmaniasis is a chronic anthroponosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Transmission occurs through the bite of female phlebotomine sand flies. In Brazil, *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum chagasi*. In addition to *Leishmania*, sandfly females are exposed to different pathogens and in order to survive they activate immune responses, such as Toll, IMD and JAK-STAT. Despite relatively little information available for these immune pathways in the sand fly model, previous studies have identified roles for IMD and Toll pathways, during *L. longipalpis* infection with *Leishmania* and other pathogens. In the *Anopheles aquasalis* model it has been observed that the activation of the JAK-STAT pathway is related to antiviral, antibacterial and in response to *Plasmodium vivax* infection. During *Leishmania* infection, analysis showed an elevated expression of PIAS, a repressor molecule of the pathway, indicating a potential mechanism of immune interference by the parasite in JAK-STAT activation. It is not yet known which molecules of this pathway participate in the host's response to *Leishmania*. Our objective is to characterize the JAK-STAT pathway responses during *L. longipalpis* infection by *L. i. chagasi*. We identified JAK-STAT-related genes and evaluated their expression profile using LL5 embryonic cells and adult insects. Previous studies have demonstrated activation of LL5 Toll and IMD pathways in response to various pathogen challenges. As such, this cell line represents a useful model by which to assess the response of sand flies to the *Leishmania* parasite. The results obtained in this work indicate that the JAK-STAT pathway is activated during *Leishmania* infection in LL5 cells. In addition, expression of the pathway genes in PIAS-silenced cells suggests that JAK-STAT activation is inhibited by another unknown molecule, resulting perhaps from a defensive mechanism. Experiments with adult insects indicated that *Leishmania* may modulate the JAK-STAT pathway for the establishment of infection through the activation of repressor molecules. In addition, through the expression analysis of the bacteria 16s and *Leishmania* actin genes we observed a possible interaction between the microbiota and the parasite in the digestive tract of the insect. Preliminary results of JAK-STAT pathway genes expression in insects treated with

antibiotics have shown that bacteria do not interfere in the activation of the JAK-STAT pathway. However, the antimicrobial peptide attacin appears to play an important role in response to bacterial infections.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Símbolos/Abreviaturas	Significado
°C	Graus Celsius
rRNA 16S	RNA ribossomal 16S
AMP	Peptídeo antimicrobiano (<i>antimicrobial peptide</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementary DNA</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA	RNA dupla-fita (<i>double stranded rna</i>)
GP63	Glicoproteína 63
IMD	Deficiência imunológica (<i>Immunodeficiency</i>)
LL5	Linhagem celular embrionária de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
Min	Minutos
pb	Pares de base
PBS	Tampão salina fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chainreaction</i>)
PTP	Proteína tirosina-fosfatase
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleicacid</i>)
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SHP-1	Tirosina fosfatase 1
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1.1: Mapa da distribuição mundial de leishmaniose	1
Figura 1.2: O ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i> sp.	2
Figura 1.3: Morfologias da <i>Leishmania</i> durante seu ciclo de vida.	4
Figura 1.4: Estágios de desenvolvimento de <i>L. longipalpis</i>	5
Figura 1.5: Espécies de microrganismos encontrados em flebotomíneos	7
Figura 1.6: Células embrionárias de LL5 de <i>L. longipalpis</i>	9
Figura 1.7: Esquema das principais vias de imunidade de inseto	11
Figura 1.8: Esquema da via Toll em <i>Drosophila</i>	12
Figura 1.9: Esquema da via IMD em <i>Drosophila</i>	13
Figura 2.0: Esquema da via JAK-STAT em <i>Drosophila</i> .	15
Figura 2.1: Alinhamento das sequências de proteína de STAT das espécies <i>Anopheles</i> , <i>Drosophila</i> , <i>Lutzomyia</i> e <i>Culex</i>	20
Figura 2.2: Análise dos domínios conservados na sequência de STAT de <i>L. longipalpis</i> obtidas	20
Figura 2.3: Esquema de estratégia utilizada para síntese <i>in vitro</i> de dsRNA	23
Figura 2.4: Eletroforese em gel de agarose 2% das PCRs realizadas para geração da dsRNA	24
Figura 2.5: Microscopia ótica de campo claro de leishmanias aderidas às células embrionárias de LL5 de <i>L. longipalpis</i> após 2 horas de interação	25
Figura 2.6: Aparelho Hemotek utilizado para as alimentações artificiais dos flebotomíneos	26
Figura 2.7: Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR para verificação da eficiência do tratamento por DNase	28
Figura 2.8: Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR teste de eficiência da síntese de cDNA	29
Figura 4.1: Resultados prévios da expressão relativa de PIAS em células LL5 transfectadas com RNA dupla-fita	31
Figura 4.2: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS	32

Figura 4.3: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS	33
Figura 4.4: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por <i>L. i. chagasi</i> .	35
Figura 4.5: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por <i>L. i. chagasi</i>	36
Figura 4.6: Expressão relativa de SHP-1 em células LL5 desafiadas por <i>L. i. chagasi</i>	37
Figura 4.7: Expressão relativa de genes da via das MAPKs em células LL5 desafiadas por <i>L. i. chagasi</i>	39
Figura 4.8: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em <i>L. longipalpis</i> infectadas por <i>L. i. chagasi</i>	40
Figura 4.9: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em <i>L. longipalpis</i> infectadas por <i>L. i. chagasi</i>	42
Figura 4.10: Expressão do gene 16S de bactéria e actina de <i>Leishmania</i> em <i>L. longipalpis</i> infectados por <i>L. i. chagasi</i>	43
Figura 4.11: Expressão de genes da via JAK-STAT em <i>L. longipalpis</i> infectados por <i>L. i. chagasi</i> na presença de antibióticos	44
Figura 5.12: Modulação da via JAK-STAT pela <i>Leishmania</i> em macrófago	52
Tabela 3.1: Tabela de oligonucleotídeos iniciadores para PCR	27

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leishmanioses	1
1.2	<i>Leishmania sp.</i>	3
1.3	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	4
1.4	Linhagens celulares de insetos	7
1.4.1	Linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i>	8
1.5	Sistema imune de insetos	9
1.5.1	Via Toll	12
1.5.2	Via IMD	13
1.5.3	Via JAK-STAT	14
1.6	Imunidade de flebotomíneos	15
1.7	Microbiota de flebotomíneos	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Identificação dos genes STAT em <i>L. longipalpis</i> .	19
	Tabela 3.1: Tabela de oligonucleotídeos iniciadores para PCR	21
3.2	Insetos	21
3.3	Parasitas	22
3.4	Cultivo de células LL5	22
3.5	Produção de dsRNA	22
3.6	Transfecção das células LL5	24
3.7	Desafios das células LL5 por <i>L. i. chagasi</i>	25

3.8	Infecção com <i>Leishmania</i>	25
3.9	Infecção com <i>Leishmania</i> e tratamento com antibióticos	26
3.10	Extração de RNA	27
3.11	Tratamento por DNase do RNA extraído	27
3.12	Síntese de cDNA	28
3.13	Análise da expressão por PCR quantitativo (qPCR)	29
3.14	Análises estatísticas	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Avaliação das respostas mediadas pela Via JAK-STAT em células embrionárias LL5 de <i>L. longipalpis</i> .	30
4.1.1	Silenciamento do repressor PIAS por RNA de interferência em células LL5	30
4.2	Expressão dos genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS	31
4.3	Expressão dos genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS	33
4.4	Expressão de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por <i>Leishmania</i>	34
4.5	Expressão de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por <i>Leishmania</i>	36
4.6	Expressão de SHP-1 em células LL5 desafiadas por <i>Leishmania</i>	37
4.7	Expressão de genes da via de MAPK em células LL5 desafiadas por <i>Leishmania</i>	38
4.8	Avaliação das respostas mediadas pela via JAK-STAT em fêmeas de <i>L. longipalpis</i> .	39
4.8.1	Expressão dos genes reguladores da via JAK-STAT em insetos adultos infectados por <i>Leishmania</i>	39

4.8.2	Expressão de genes efetores da via JAK-STAT em <i>L. Longipalpis</i> infectados por <i>L. i. chagasi</i> .	41
4.9	Análise da microbiota de <i>L. longipalpis</i> durante a infecção por <i>L. i. chagasi</i> .	42
4.9.1	Expressão dos genes 16S de bactérias e actina de <i>L. i. chagasi</i> em insetos infectados	42
4.10	Expressão de genes da via JAK-STAT em insetos adultos infectados por <i>Leishmania</i> e tratados com antibióticos	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	53
7	Referências Bibliográficas	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem animais domésticos, silvestres e o homem. As leishmanioses são propagadas por disseminação vetorial através da picada de fêmeas de flebotomíneos. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que as leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública e no território brasileiro observa-se uma grande incidência da doença, onde os números de casos reportados são superiores a 1000 em todo o país (Figura 1.1) (WHO, 2011)

A leishmaniose pode se manifestar de diferentes formas clínicas, tais como cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral, sendo a última a forma mais grave da doença. As manifestações dessas formas variam dependendo da espécie do parasita e do estado imunológico do hospedeiro vertebrado. A leishmaniose visceral constitui a forma da doença com maior relevância clínica, uma vez que acomete órgãos vitais do hospedeiro e, quando não tratada, evolui para óbito em mais de 90% dos casos registrados (Ministério da Saúde, 2014).

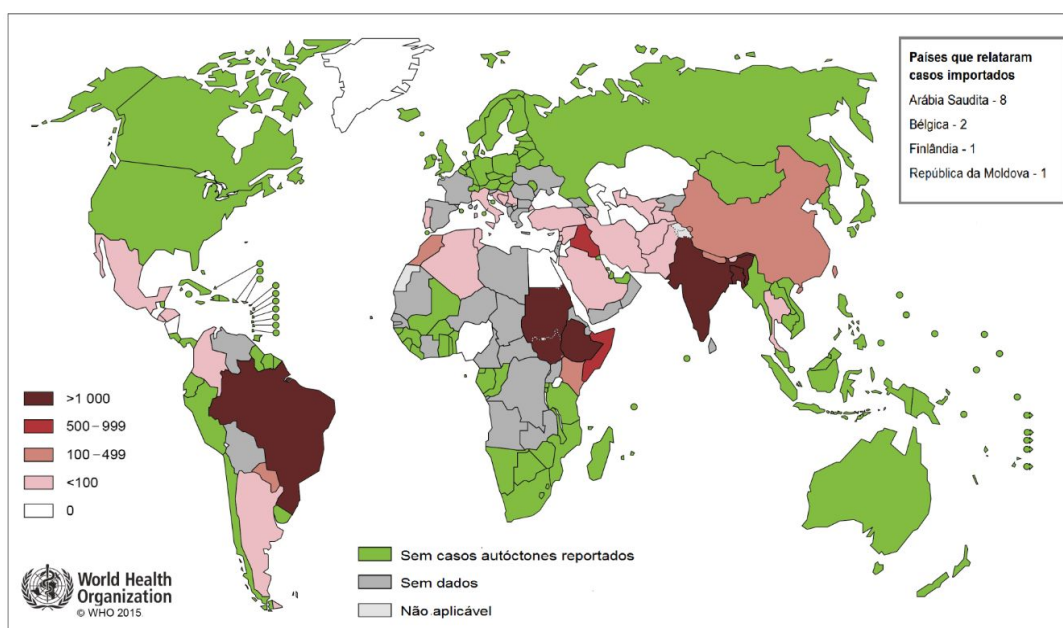


Figura 1.1: Mapa da distribuição mundial de leishmaniose. Observam-se nas áreas mais escuras do mapa, regiões com números de casos reportados maiores que 1000 (WHO, 2015)

Pelo menos 21 espécies de *Leishmania* são capazes de infectar humanos (CDC, 2007). Nas Américas, o principal agente etiológico é a *Leishmania infantum chagasi* e o principal vetor é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Deane and Deane 1954).

O ciclo da leishmaniose se inicia quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. No tubo digestivo do inseto, os macrófagos se rompem e liberam os parasitas, que se diferenciam nas formas promastigotas metacíclica, que é a forma infectiva do parasita (Kamhawi, 2006). Em um próximo repasto sanguíneo, o inseto infectado regurgita as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, infectando-o (Bates, 2007) (Figura 1.2).

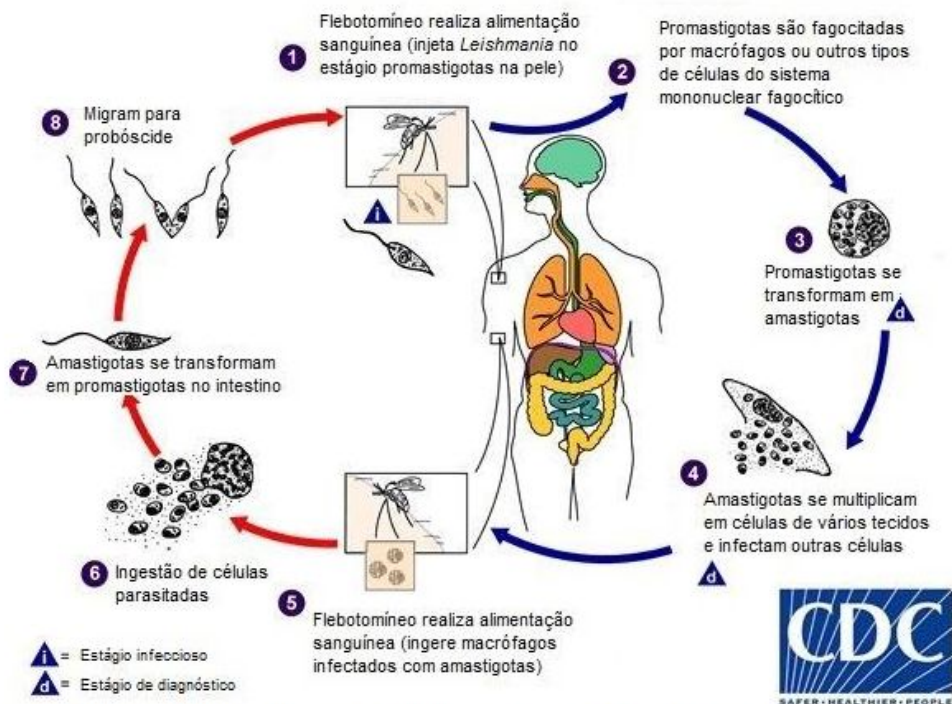


Figura 1.2: O ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp.: Do lado esquerdo (5 - 8) está representada etapas da infecção por *Leishmania* no hospedeiro invertebrado; do lado direito (1 - 4) está representada etapas da infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado.

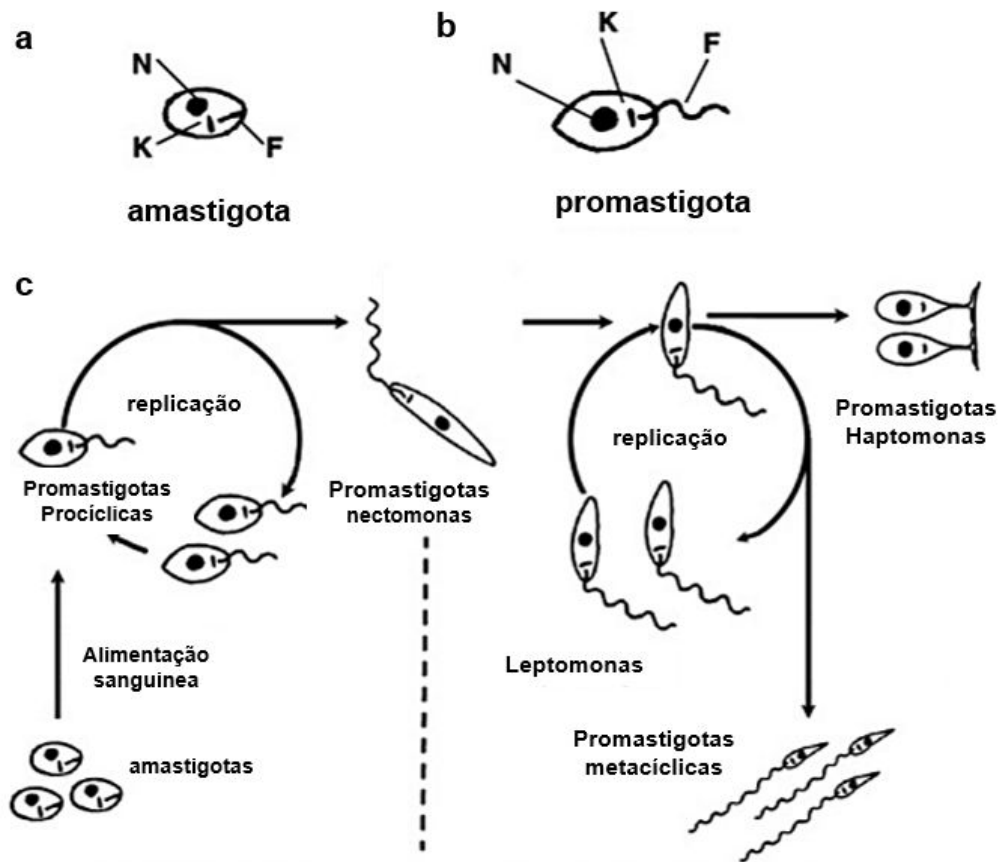
1.2 *Leishmania sp.*

Protozoários do gênero *Leishmania* são pertencentes à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida. Essas possuem ciclo de vida digenético, com uma forma aflagelada intracelular no hospedeiro vertebrado e uma forma flagelada no hospedeiro invertebrado (Neves *et al.* 2007).

Ao serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, que são pequenas, flageladas, ovóides e possuem alta taxa de multiplicação. Essas formas procíclicas passam por uma série de divisões originando as nectomonas que, por sua vez, se aderem às microvilosidades do epitélio intestinal do inseto. Esse processo ocorre em torno de 72h após o repasto sanguíneo. Após 4 a 5 dias, as formas nectomonas são encontradas na porção torácica do intestino médio, onde ocorrem transformações em novas formas promastigotas, dentre elas as promastigotas metacíclicas, a forma infectiva do parasita (Lainson *et al.* 1987).

As promastigotas metacíclicas possuem forma mais alongada com a existência de flagelo extenso quando comparadas as outras formas do parasita (Pimenta *et al.* 2012). As formas metacíclicas migram e formam um tampão na válvula estomodeal do inseto, que dificulta a realização da alimentação sanguínea, acarretando a regurgitação dessas formas infectivas ao picar o hospedeiro vertebrado (Figura 1.3) (Schlein *et al.* 1992).

Durante o ciclo de vida dentro do inseto, *Leishmania* encontra diversas barreiras físicas e químicas presentes no tubo digestivo tais como a formação da matriz peritrófica, a atividade de enzimas digestivas (Ramalho-Ortigao *et al.* 2010, Telleria *et al.* 2010) e a imunidade inata (Sacks and Kamhawi, 2001, Telleria *et al.* 2013, Telleria *et al.* 2012). O parasita consegue sobreviver mesmo mediante tais barreiras no tubo digestivo do inseto e, dessa forma, estabelecer a infecção (Pimenta *et al.* 2003; Telleria *et al.* 2007; Ramalho-Ortigão *et al.* 2007).



Adaptado de Paz et al. 2010 (Paz 2010)

Figura 1.3: Morfologias da *Leishmania* durante seu ciclo de vida. (A) Forma encontrada no hospedeiro vertebrado; (B) forma encontrada dentro do intestino do vetor (N = núcleo; K= cinetoplasto; F = flagelo); (C) Variedade de formas promastigotas encontradas no hospedeiro vertebrado após alimentação sanguínea.

1.3 *Lutzomyia longipalpis*

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (2-3 mm) pertencentes à ordem Diptera, da família Psychodidae. Esses são caracterizados por desenvolverem todo seu estágio larval em matéria orgânica. São holometábolos, com ciclo de vida constituído de uma fase de ovo, quatro estágios de larva, um estágio de pupa e um estágio final de adulto (Figura 1.4).

Quando adultos, tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de seiva e néctar de vegetais, sendo as fêmeas também hematófagas, ou seja, realizam a ingestão de sangue, necessária para realizar a ovogênese (Brazil *et al.* 2003).

Das 800 espécies de flebotomíneos descritas, tanto no Novo Mundo quanto no Velho Mundo (Akhoundi, Kuhls *et al.* 2016), cerca de 60 são capazes de transmitir *Leishmania* e apenas 30 tem relevância epidemiológica (Sharma e Singh 2008), sendo as principais espécies pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (WHO, 2015). No Brasil, 19 espécies de flebotomíneos são consideradas como vetores de leishmanioses (Young e Duncan 1994; dos Santos *et al.* 1998), sendo a espécie *L. longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) o principal vetor da leishmaniose visceral causada pelo protozoário da espécie *L. i. chagasi* (Lainson and Rangel 2005).



Imagem: Gabriel Negreira

Figura 1.4: Estágios de desenvolvimento de *L. longipalpis*. Ovo (1); larvas L1 a L4 (2-5); pupa (6) e adulto (7).

Além da *Leishmania*, flebotomíneos podem ser infectados por diversos patógenos, como bactérias, vírus, fungos, helmintos e outros tripanosomatídeos. Além de se infectarem, algumas espécies possuem competência vetorial para transmitir alguns desses patógenos. Estima-se que cerca de 33 espécies de flebotomíneos estejam relacionados com a

transmissão de doenças causadas por bactérias, vírus e protozoários (Cáceres 1993).

Das bactérias que infectam flebotomíneos, pode-se destacar a bactéria Gram-negativa *Serratia marcescens* (Figura 1.5A), que possui alta letalidade para estes insetos (Gouveia *et al.* 2008). Experimentos com *L. longipalpis* infectadas com *L. mexicana* mostraram que os insetos foram resistentes à infecção por *Serratia*, mostrando haver um efeito protetor da infecção por *Leishmania* contra o desafio de *Serratia*. Além da *Serratia*, os insetos também podem ser infectados e transmitir bactérias do gênero *Bartonella* (Figura 1.5B), agente etiológico da bartonelose (Maco *et al.* 2004), doença caracterizada por sintomas como febre, anemia hemolítica e lesões cutâneas nodulares (Maguina *et al.* 2009)

Flebotomíneos também são vetores de alguns vírus das famílias Rhabdoviridae, Bunyaviridae e Reoviridae. Um exemplo é o Toscana vírus da família Bunyaviridae, encontrado em países do Mediterrâneo que pode causar infecções neurológicas (Valassina *et al.* 2003). Outros vírus como Flavivirus (vírus do oeste do Nilo) (Figura 5.1C) e Alphavirus (Mayaro vírus) são capazes de infectar células embrionárias de *L. longipalpis* (LL5) (Tesh e Modi 1983; Pitaluga *et al.* 2008), sugerindo que os insetos sejam potenciais vetores para outros vírus (Alka *et al.* 2013)

Os flebotomíneos ainda podem ser infectados por fungos como *Beauveria bassiana* (Figura 1.5D), que é patogênica para o inseto (Warburg 1991) e helmintos como *Anandarema phlebotophaga* (Rhabditida) (Figura 1.5E), que pode comprometer uma colônia de insetos (Poinar *et al.* 1993, Secundino *et al.* 2002).

Dentre os protozoários que infectam flebotomíneos, a *Leishmania* possui a capacidade de se aderir ao epitélio intestinal e de sobreviver às barreiras físicas e químicas presentes no tubo digestivo do inseto como a matriz peritrófica, a ação de enzimas digestas e a ativação das vias de imunidade e estabelecer a infecção (Pimenta *et al.* 2003; Telleria *et al.* 2007; Ramalho-Ortigão *et al.* 2007). Outros protozoários também podem ser encontrados em flebotomíneos, como os pertencentes aos gêneros

Leptomonas (Deane LM 1954), *Crithidia* (Shaw *et al.* 1987), *Endotrypanum* (Shaw 1964), *Trypanosoma* (Brazil e Ryan 1984) e *Ascogregarina* (Warburg 1991).

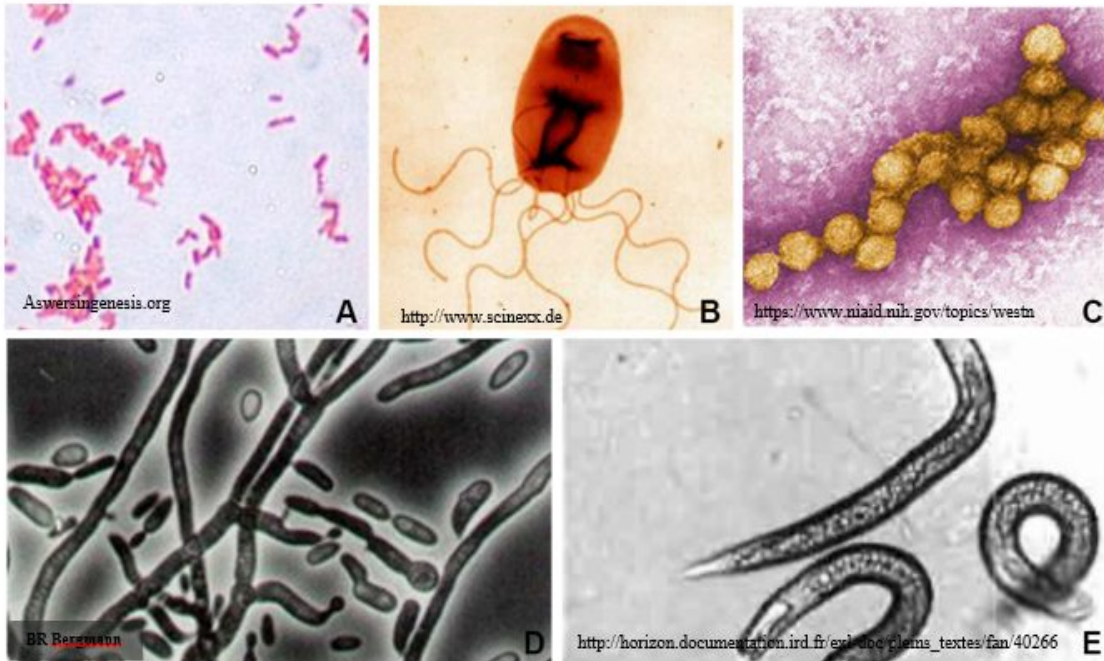


Figura 1.5: Espécies de microrganismos encontrados em flebotomíneos

1.4 Linhagens celulares de insetos

Linhagens celulares constituem um sistema simples, homogêneo, sensível e reprodutível, sendo assim, uma importante ferramenta devido à sua capacidade de detectar pequenas mudanças em resposta a diferentes estímulos. Diversas linhagens celulares de insetos têm sido utilizadas como modelo para o estudo de aspectos da biologia de insetos.

Estudos anteriores mostram que algumas linhagens tais como células S2 de *Drosophila melanogaster*, células C7-10 e C6/36 de *Aedes albopictus*, Aag-2 de *Aedes aegypti*, Lulo de *L. longipalpis*, entre outras, são modelos eficazes para a compreensão de eventos imunológicos de insetos (Tanji *et al.* 2007; Moon *et al.* 2011; Barletta *et al.* 2012). Com o uso de células S2 (*Drosophila*), foi possível demonstrar que as vias Toll e IMD são potencialmente ativas de forma sinérgica no inseto (Tanji *et al.* 2007).

Em mosquitos, as linhagens C6/36 (*Ae. Albopictus*) e Aag-2 (*Ae. Aegypti*) expressam várias moléculas efetoras da imunidade, incluindo peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Moon *et al.* 2011). Além disso, células Aag-2 foram usadas para demonstrar respostas imunes aos desafios bacterianos e virais com ativação das Toll, IMD e Jak / STAT em resposta aos diferentes estímulos, caracterizando a imuno-competência da linhagem celular (Barletta *et al.* 2012).

Em *L. Longipalpis*, duas linhagens celulares foram estabelecidas: células LL5 (Tesh e Modi 1983) (Figura 6) e células Lulo (Rey *et al.* 2000), ambas derivadas de tecidos embrionários.

1.4.1 Linhagens celulares de *L. longipalpis*

Devido às limitações de manutenção e manipulação de flebotomíneos, linhagens celulares são uma excelente ferramenta para o estudo das bases moleculares da imunidade desses insetos. Trabalhos anteriores mostraram que células Lulo podem interagir com *L. i. chagasi* (Bello *et al.* 2005). Além disso, a linhagem pode ser infectada por outras espécies de *Leishmania*, como *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* com grande potencial para aderir às células (Cortes *et al.* 2011).

A competência imunológica das células LL5 foi demonstrada anteriormente para infecções virais quando, ao serem transfectadas com qualquer RNA dupla-fita, desenvolveram uma resposta antiviral não específica semelhante às respostas mediadas por interferon em mamíferos (Pitaluga 2008). Recentemente, as moléculas efetoras envolvidas nessa resposta antiviral foram investigadas (Martins-da-Silva *et al.* 2018). Através de espectrometria de massa do meio condicionado de células LL5 após transfecção com dsRNA, foram identificadas 304 proteínas, dentre elas o fosfolípido scramblase, uma proteína induzida por interferon em mamíferos que medeia a atividade antiviral.

Nosso grupo também demonstrou atividade das vias de imunidade Toll e IMD em células LL5 frente ao desafio por bactérias, fungos e *Leishmania*.

Através da análise da expressão de genes reguladores foi observado uma possível ativação das vias Toll e IMD frente aos desafios. Além disso, os AMPs atacina, cecropina e defensina apresentaram aumento de expressão em alguns horários após infecção, indicando a existência de resposta imunológica frente aos desafios (Tinoco-Nunes *et al* 2016). Dessa forma, a linhagem celular LL5 foi viabilizada como um bom modelo para o estudo da imunidade em flebotomíneos (Figura 1.6).

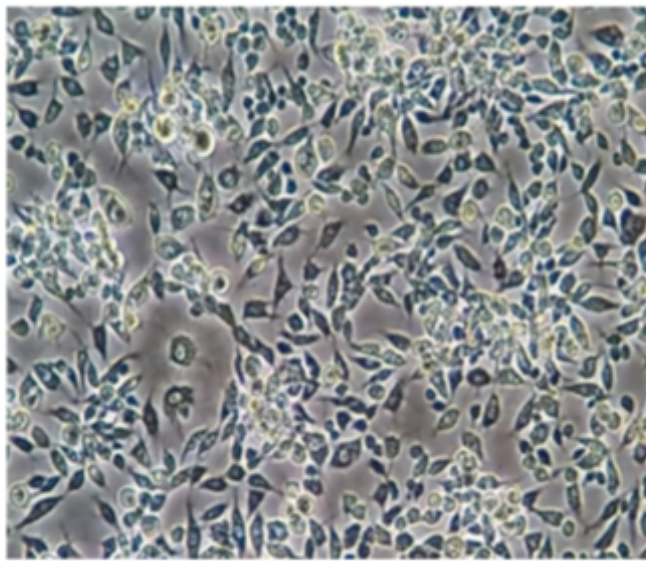


Imagem: Ilya Violeta Llanos

Figura 1.6: Células embrionárias de LL5 de *L. longipalpis*. Microscopia ótica de campo claro de células embrionárias aderidas (aumento de 200 vezes).

1.5 Sistema imune de insetos

Ao longo do ciclo de vida, insetos estão expostos a uma variedade de microrganismos e, para sobreviver a tais infecções, eles desenvolveram vários mecanismos de defesa, sejam estruturais ou através de respostas imunológicas.

As barreiras estruturais constituem os primeiros mecanismos de defesa contra microrganismos. Um exemplo é o exoesqueleto, uma estrutura rígida constituída por duas camadas, a epicutícula, formada por proteínas e lipídeos

importantes para a impermeabilidade da estrutura, e a procutícula, formada por quitina e responsável por conferir resistência ao exoesqueleto. O exoesqueleto constitui uma barreira externa que protege os órgãos e a hemolinfa do inseto da exposição aos microorganismos, além disso, participa dos processos de melanização e coagulação após alguma lesão (Söderhäll e Cerenius, 1998, Theopold *et al* 2002). Além do exoesqueleto, há a existência de uma barreira interna no tubo digestivo, a matriz peritrófica. A matriz peritrófica é uma estrutura composta de quitina, proteínas e glicoproteínas formando uma camada semipermeável que separa o sangue ingerido do epitélio do intestino, compartimentalizando a digestão, além de conferir proteção contra as enzimas digestivas e proteger o epitélio intestinal do contato direto com microorganismos (Volf *et al.* 2015; Richards & Richards 1977; Rudin e Hecker, 1982).

Além das barreiras físicas, enzimas digestivas, fatores citotóxicos e respostas imunológicas no trato digestivo podem impedir a infecção de patógenos. Porém apesar da existência de tais barreiras, a *Leishmania* possui mecanismos para burlar esses mecanismos e estabelecer a infecção, como redução da atividade de tripsinas no tubo digestivo (Telleria *et al.* 2010; Pimenta *et al.* 1997; Schlein e Jacobson, 1998), a interação do flagelo com receptores das células epiteliais via LPG para aderir ao intestino (Soares e Turco 2003) e a secreção de moléculas que inibem a resposta imunológica, dentre elas GP63, envolvida na modulação das vias Toll e JAK-STAT em macrófagos (Blanchette *et al.* 1999).

A imunidade em insetos é didaticamente dividida em imunidade celular e humoral. Respostas mediadas pela imunidade celular envolvem o recrutamento de hemócitos presentes na hemolinfa, enquanto as humorais envolvem a síntese de proteínas e moléculas em diversos tecidos e que possuem atividade antimicrobiana. Essas respostas celulares e humorais são ativadas por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que se ligam especificamente a padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (Medzhitov e Janeway 2002). Os PAMPs, por sua vez, ativam uma cascata de sinalização celular que elimina os patógenos de forma direta por fagocitose, nodulação ou

encapsulamento ou indiretamente pela ativação de vias de sinalização intracelular (Hoffmann *et al.* 1996; Hoffmann e Reichhart 2002).

As principais vias de imunidade intracelular em insetos são: Toll, IMD, JAK-STAT e RNAi. Estas, quando ativadas, desencadeiam cascatas de sinalização que culminam na expressão de AMPs, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e genes efetores para a eliminação do patógeno (Nappi e Vass, 1993, Dziarski e Gupta, 2006, Lemaitre and Hoffmann, 2007). Além disso, estas vias parecem ser específicas para determinados patógenos (Dimopoulos *et al.* 2002).

Em *Drosophila*, a via Toll é ativada por bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto que a via IMD a ativação está relacionada à infecção por bactérias Gram-negativas (Kounatidis and Ligoxygakis, 2012). A via JAK-STAT tem sua ativação desencadeada principalmente por infecção viral, com expressão de AMPs como atacina e outros genes efetores como VIR-1, respectivamente (Goto *et al.* 2010; Huang *et al.* 2013; Agaisse *et al.* 2003; Ekengren and Hultmark, 2001, Dostert *et al.* 2005) (Figura 1.7).

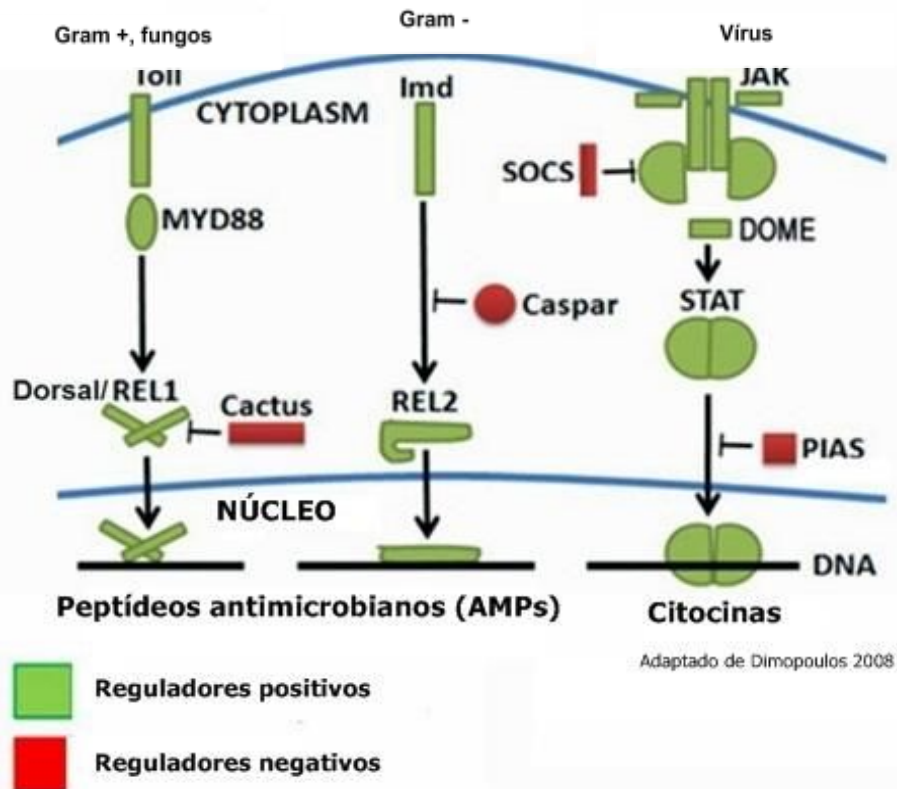


Figura 1.7: Esquema das principais vias de imunidade de inseto. As vias Toll, IMD e JAK-STAT, em destaque seus principais componentes em verde e os reguladores negativos cactus (Toll), caspar (IMD) e PIAS (JAK-STAT) em vermelho.

1.5.1 Via Toll

A via Toll é uma via de sinalização evolutivamente conservada. É composta por uma proteína transmembrana Toll, um ligante extracelular semelhante à citocina spaetzle, as proteínas MyD88, tube e pelle, o fator de transcrição dorsal e o repressor cactus. A via é ativada por spaetzle após a clivagem proteolítica da mesma, induzida por uma cascata de cisteino-proteinases (Hoffmann e Reichhart, 2002). Após a ligação, o receptor Toll sofre uma mudança conformacional que culmina no recrutamento de MyD88, tube e pelle. A proteína pelle contém um domínio de serina-treonina quinase que promove a degradação proteolítica do repressor cactus, inibidor do fator de transcrição dorsal presente na via Toll (Christophides *et al.* 2004). Após a degradação do repressor da via, o fator de transcrição dorsal é translocado para o núcleo, promovendo a transcrição de genes efetores da imunidade e AMPs (Figura 1.8).

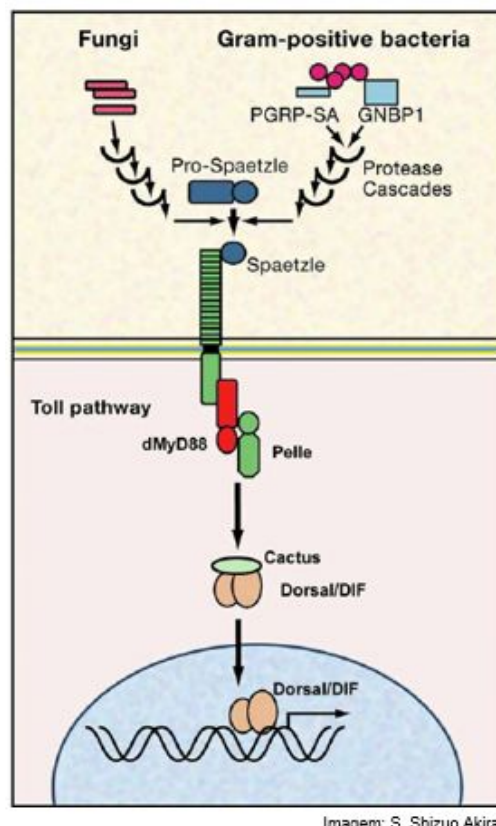


Imagem: S. Shirun Akira

Figura 1.8: Esquema da via Toll em *Drosophila*

1.5.2 Via IMD

A via IMD é composta por um receptor transmembrana que reconhece peptideoglicano de cadeia longa (PGRP-LC). Em seguida, PGRP-LC ativa a proteína IMD que contém um domínio death com grande similaridade com o mecanismo de sinalização TNF humano. A proteína IMD, por sua vez, leva a ativação de três proteínas: a proteína FADD e os complexos DmIKKb-DmIKKg (quinases), e o complexo dTAK1/ TAB/ IAP2 (Kleino *et al.* 2005).

Após a ativação, IMD interage com dFADD através de um domínio chamado Death e em seguida recruta o repressor Caspar e Dredd. A proteína Dredd se liga ao fator de transcrição relish, clivando-o, promovendo a liberação da porção ativadora transcricional N-terminal da porção inibidora da translocação C-terminal. Após a liberação, a porção N-terminal de Relish é translocada para o núcleo, onde promoverá a transcrição de diversos genes, como os AMPs especialmente ativos contra bactérias Gram-negativas (Hoffmann *et al.* 2003) (Figura 1.9).

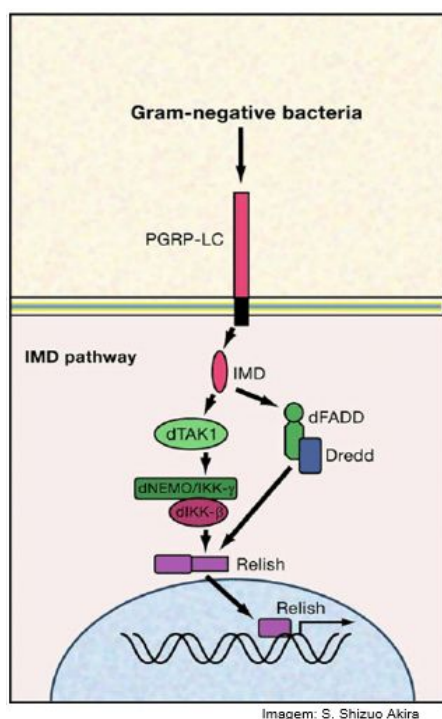


Figura 1.9: Esquema da via IMD em *Drosophila*

1.5.3 Via JAK-STAT

A ativação da via JAK-STAT ocorre através de citocinas da família Upd que se ligam ao receptor transmembrana Domeless (Dome) que está associado a uma JAK-cinase Hopscotch (Hop). Após a ligação ao receptor, a JAK kinase é ativada e promove a fosforilação do fator de transcrição STAT que, por sua vez, é translocado para o núcleo para realizar a transcrição de AMPs e genes efetores (Goto *et al.* 2010; Huang *et al.* 2013; Agaisse *et al.* 2003, Ekengren and Hultmark, 2001) (Figura 1.10 A).

A via é regulada em diferentes etapas por diferentes moléculas como PIAS, que se liga a STAT, levando à inativação ou degradação pela proteína SUMO E3 ligase. Já uma proteína tirosina fosfatase, PTP, regula negativamente a via pela desfosforilação de Hop e STAT, impedindo a translocação do fator de transcrição para o núcleo. Além dessas, existe SOCS que é um regulador expresso pela via responsável por um loop de inibição. SOCS se liga ao receptor Dome causando a inibição estérica do recrutamento de STAT (Muller *et al.* 2005; Chen *et al.* 2014) (Figura 1.10B).

Em *Drosophila*, a via JAK-STAT tem um importante papel em eventos como segmentação, proliferação e diferenciação de hemócitos, determinação de sexo e desenvolvimento de olhos, asas e pernas (Zeidler *et al.* 2000, Luo & Dearolf 2001). A via também pode ser acionada por lesões teciduais ou por desafio de bactérias e vírus (Jiang *et al.* 2009; Dostert C, *et al.* 2005).

Em mosquitos, a via também parece ser importante em respostas antivirais, como em *Ae. aegypti*, onde o inseto utiliza a via JAK-STAT para controlar a infecção pelo vírus da dengue (Souza-Neto *et al.* 2009). Quanto aos vetores de parasitas, em *An. aquasalis*, vetor da malária no Brasil, foi observado um aumento na expressão de STAT e PIAS após infecção com *P. vivax*, e o silenciamento de STAT desencadeou o aumento de oocistos no intestino médio de *A. aquasalis* (Bahia *et al.* 2011). Além disso, STAT parece participar da ativação transcricional de óxido nítrico sintase (NOS) em resposta

a infecção pelo parasita (Gupta *et al.* 2009), o que sugere o envolvimento efetivo da via JAK-STAT na resposta à infecção pelo *Plasmodium*.

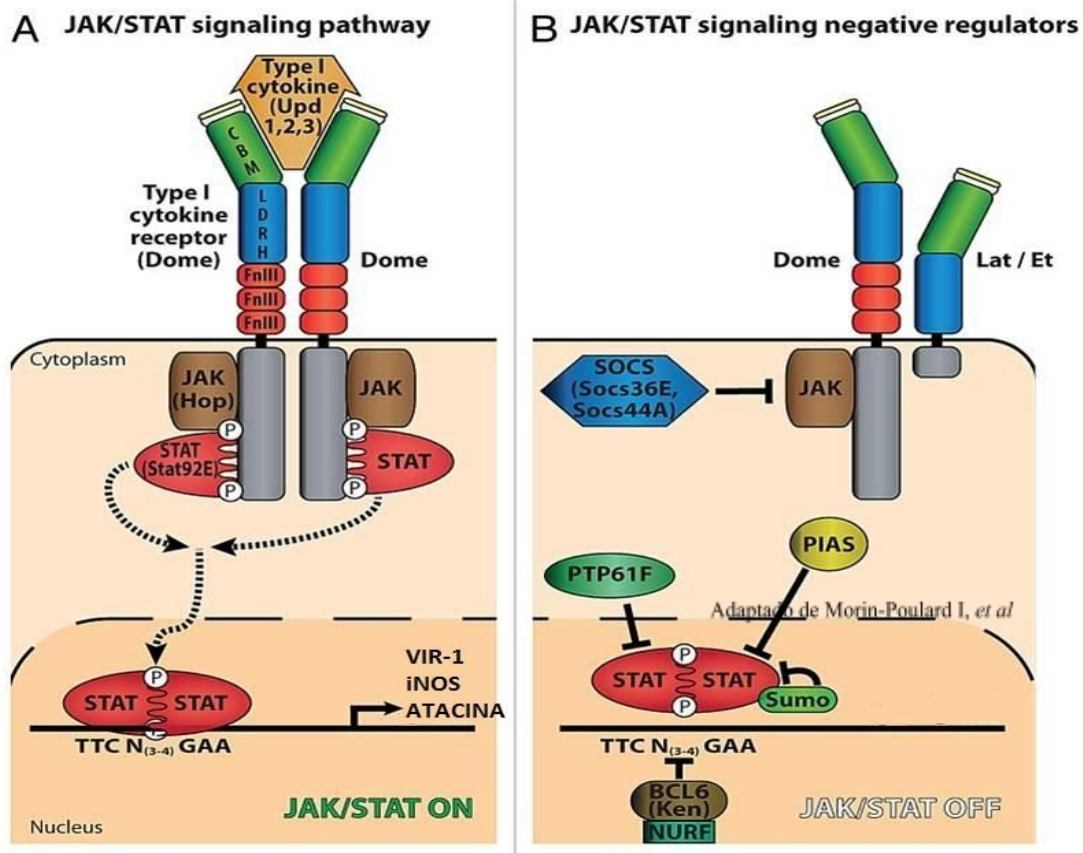


Figura 1.10: Esquema da via JAK-STAT em *Drosophila*. (A) Via ativada, com ilustração da fosforilação e translocação de STAT para o núcleo. (B) Via inativada, com ligação dos repressores PTP61F, PIAS e SOCS.

1.6 Imunidade de flebotomíneos

Apesar dos flebotomíneos terem capacidade vetorial para transmitir não apenas *Leishmania*, mas também vírus e bactérias, muitos aspectos da imunidade nestes vetores precisam ser desvendados. Nosso grupo vem trabalhando nesse tema há alguns anos e já identificamos vários genes ligados à imunidade e à via de RNAi em *L. longipalpis* (Pitaluga *et al.* 2008). Dentre estes estão os reguladores negativos cactus (via Toll), caspar (via Imd) e PIAS

(via JAK-STAT), além de peptídeos antimicrobianos, tais como atacina, cecropina e as defensinas 1, 2, 3 e 4 (Tinoco-Nunes 2015). As proteínas Tube e spaetzle também foram identificadas anteriormente em *L. longipalpis* (Dillon *et al.* 2006).

Em seguida, nosso grupo demonstrou pela primeira vez o papel das vias de imunidade no controle da infecção por *Leishmania* e bactérias em *L. Longipalpis* (Telleria *et al.*, 2012). Fêmeas alimentadas com as espécies bacterianas *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Ochrobactrum sp.*, *Pantoea agglomerans* e *Serratia marcescens* expressam diferencialmente o repressor da via IMD, caspar. A expressão de caspar aumentou significativamente nas primeiras 24 h após a alimentação com *E. coli* e *M. luteus*, enquanto em insetos alimentados com *Ochrobactrum sp.* ou *P. agglomerans* a expressão de caspar foi reduzida significativamente em 48h e 72h após a alimentação. Quanto a alimentação com *S. marcescens*, a expressão de caspar foi significativamente aumentada após 96h (Telleria *et al.*, 2012). No mesmo trabalho foi observada uma regulação positiva da expressão de caspar em fêmeas de *L. longipalpis* tratadas com diferentes antibióticos, indicando que a via IMD tem um papel nas respostas antibacterianas. Além disso, fêmeas de *L. longipalpis* silenciadas para caspar apresentaram uma redução significativa da prevalência de infecção por *L. i. chagasi* (Telleria *et al.* 2012), indicando que a via é capaz de controlar a infecção pelo parasita no inseto.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que as vias Toll e IMD são ativadas até mesmo em células embrionárias LL5 de *L. longipalpis*. Após desafiar células LL5 com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e com *Leishmania*, a expressão dos reguladores de ambas as vias foram regulados positivamente (Tinoco-Nunes *et al.* 2016).

As vias Toll e IMD são mais estudadas e seus principais componentes já foram caracterizados em *L. longipalpis*. No entanto, há poucos relatos sobre a atividade da via JAK-STAT neste vetor. Alguns resultados prévios sugerem que a presença do parasita é capaz de causar a repressão da via JAK-STAT no inseto, uma vez que a expressão de PIAS aumenta com a presença de *L. mexicana* (dados não publicados).

O estudo da biologia de flebotomíneos, em especial a compreensão dos aspectos da imunologia de *L. longipalpis* e da interação com o parasita *L. i. chagasi* é fundamental para o desenvolvimento de estratégias futuras para o controle da leishmaniose.

1.7 Microbiota de flebotomíneos

Além de combater infecções, o sistema imune inato do inseto também está envolvido no controle de populações de simbiontes microbianos (Welchman *et al.* 2009).

Flebotomíneos depositam seus ovos no solo e se alimentam de matéria orgânica. O alimento ingerido, juntamente com microrganismos presentes no ambiente, dão origem à microbiota intestinal do inseto. A microbiota tem papel fundamental na indução, maturação e função do sistema imune do hospedeiro, que pode modular a proteção do hospedeiro contra patógenos e doenças infecciosas (Telleria *et al.* 2018). A obtenção de informações básicas sobre como o vetor responde à presença de diferentes microrganismos e como estes interagem com outros patógenos, como a *Leishmania*, são de grande interesse atualmente.

As respostas imunológicas contra bactérias do intestino em mosquitos, por exemplo, têm um efeito protetor contra infecções por vírus e parasitas vetores de insetos. Estudos mostraram que o mosquito utiliza dos mesmos fatores imunológicos para combater bactérias e a infecção pelo parasita do *Plasmodium* (Beier *et al.* 1994; Dong *et al.* 2006). Por outro lado, as bactérias também podem inibir diretamente o desenvolvimento de patógenos, interrompendo as interações necessárias entre o patógeno e o epitélio vetor ou através da produção de moléculas antiparasitárias (Azambuja *et al.* 2005).

Trabalhos mostram que existe uma interação entre *Leishmania* e os outros microorganismos presentes na microbiota do inseto durante o estabelecimento da infecção. Recentemente foi demonstrado que a infecção por *Leishmania* levou a uma perda crescente de diversidade bacteriana durante a infecção (Louradour *et al.* 2017), contudo, também foi visto que a depleção

de microbiotado intestino médio de *L. longipalpis* após tratamento com antibióticos prejudicou o desenvolvimento para formas metacíclicas de *L. infantum* (Kelly *et al.* 2017).

Os resultados publicados mostram que existe uma relação complexa entre flebotomíneo, *Leishmania* e microbiota. Uma maior compreensão dessa interação será de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle de flebotomíneos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar as respostas mediadas pela via JAK-STAT em células LL5 após o desafio por *L. i. chagasi* e em *L. longipalpis* durante o processo de infecção por *L. i. chagasi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de genes PTP, STAT, SOCS, atacina e VIR-1 por qPCR após o silenciamento do gene regulador PIAS da via JAK-STAT em células LL5;
- Avaliar a expressão de genes relacionados à via JAK-STAT por qPCR em células LL5 após o desafio por *L. i. chagasi* e em *L. longipalpis* durante o processo de infecção por *L. i. chagasi*;
- Verificar a interferência da microbiota do inseto na ativação da via JAK-STAT durante a infecção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação dos genes STAT em *L. longipalpis*.

O gene STAT foi identificado primeiramente através da obtenção das sequências do gene já descritos em outros organismos (*Drosophila*, *Anopheles*, *Aedes*) e disponibilizados no banco de dados do GenBank do NCBI. As sequências obtidas foram então alinhadas utilizando a ferramenta Blastx contra as sequências dos transcritos de *L. longipalpis* depositada no VectorBase (<https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis>). A escolha da melhor sequência foi realizada baseando-se no valor de similaridade e E-value. Em seguida, foi realizado um segundo alinhamento da sequência de proteína dos genes de interesse contra as sequências de outros organismos (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), para obter informações mais detalhadas das similaridades (Figura 3.11). Também foi realizado o estudo das regiões com domínios conservados, para confirmar que se tratava de um gene homólogo utilizando a ferramenta “conserved domains” do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (figura 3.11). A análise das Open reading frames (ORFs) foi realizada para a escolha da melhor região para desenho dos oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos foram desenhados e analisados utilizando os programas IDT, Primer Premier e AmplifX. Os oligonucleotídeos dos demais genes utilizados (Tabela 3.1) foram anteriormente desenhados.

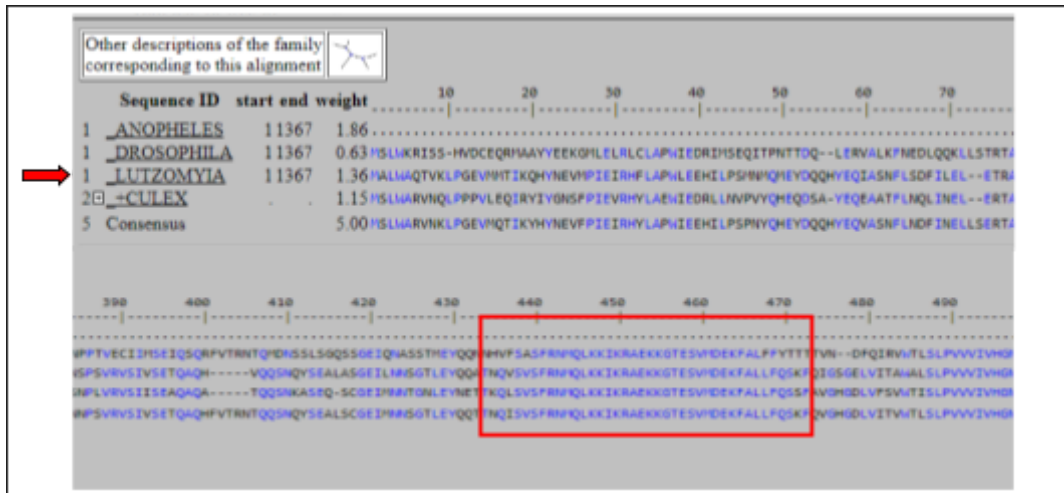


Figura 3.1: Alinhamento das seqüências de proteína de STAT das espécies *Anopheles*, *Drosophila*, *Lutzomyia* e *Culex*. Em azul estão destacados os aminoácidos similares e destacado em vermelho a seqüência correspondente ao domínio de ligação ao DNA de STAT.

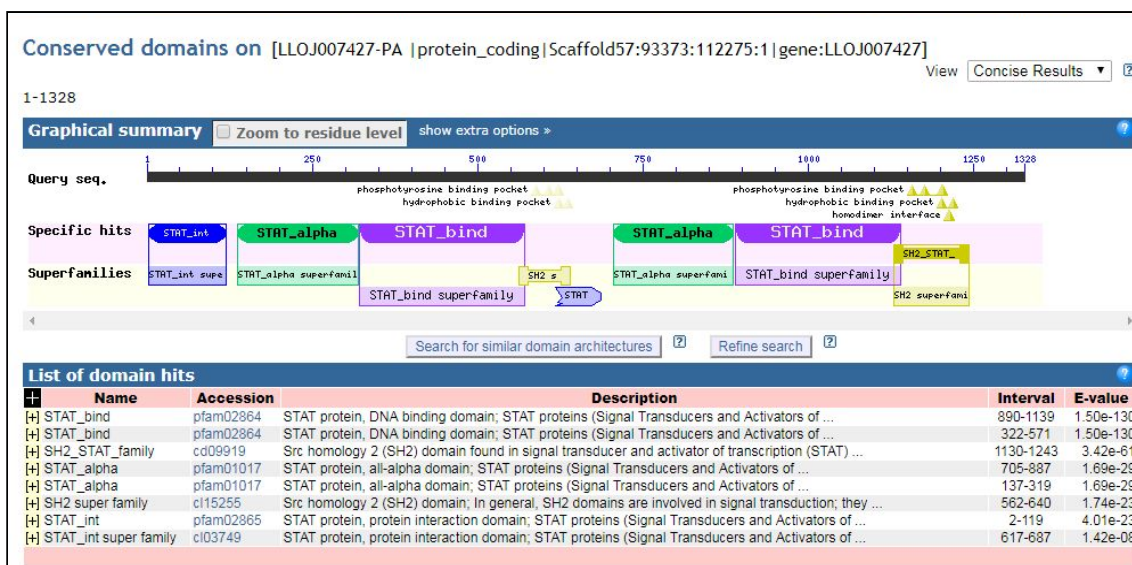


Figura 3.2: Análise dos domínios conservados na seqüência de STAT de *L. longipalpis* obtidas

3.1.1 Tabela de oligonucleotídeos iniciadores para PCR

Nome	gene	Sequências	ID das referências ou sequências	Utilização
16s Fwd	RNA ribossomal	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Dillon <i>et al.</i> 2008	qPCR
16s Rev	RNA ribossomal	GGAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Dillon <i>et al.</i> 2008	qPCR
AP1 Fwd	Proteína ativadora 1 (Activator protein 1)	AAAGTGTCCGAAACCGGAAGC		qPCR
AP1 Rev	Proteína ativadora 1 (Activator protein 1)	ATAGACAACCCCGTTAGTTCCG		qPCR
ATACINA Fwd	Atacina (peptídeo antimicrobiano)	AGGCTGATCCTCTGGGTCCTGT	Tinoco-Nunes <i>et al.</i> 2016	qPCR
ATACINA Rev	Atacina (peptídeo antimicrobiano)	ATGGGCATGGCAGCGTCTCT	Tinoco-Nunes <i>et al.</i> 2016	qPCR
dsPIAS Fwd	Proteína inibidora de STAT ativada	TGGCGCCCTAGATGAGGAGGATGCAGACTGCGATAT	Tinoco-Nunes (2015)	Silenciamento gênico
dsPIAS Rev	Proteína inibidora de STAT ativada	TGGCGCCCTAGATGAGGAGTGGGTTCCGTTCCATT	Tinoco-Nunes (2015)	Silenciamento gênico
ERK-2 Fwd	Cinase regulada por sinal extracelular 2	TGCTCACATTCACCCACAC		qPCR
ERK-2 Rev	Cinase regulada por sinal extracelular 2	GTTTCTTTCCGTAATCATCC		qPCR
ERK-7 Fwd	Cinase regulada por sinal extracelular 7	TGAAAGGGGAGCCAAAGAGT		qPCR
ERK-7 Rev	Cinase regulada por sinal extracelular 7	TGTGCTGTGAATCCAGTGAGTG		qPCR
LuloHISTONA Fwd	Histona de <i>L. longipalpis</i>	GAAAAGCAGGCAACACTCC	Pitaluga <i>et al.</i> 2009	PCR
LuloHISTONA Rev	Histona de <i>L. longipalpis</i>	GAAGGATGGTGGAAAGAG	Pitaluga <i>et al.</i> 2009	PCR
iNOS Fwd	Oxido nítrico sintase induzível	TGGCTGTGCAATTTGTGTG	Di Blasi (2016)	qPCR
iNOS Rev	Oxido nítrico sintase induzível	CCGCAATGTTCCACTCAACC	Di Blasi (2016)	qPCR
LEISH-ACTIN Fwd	Actina de Leishmania	GTCGTCGATAAAGCCGAAGTGGTT	Di Blasi <i>et al.</i> 2015	PCR e qPCR
LEISH-ACTIN Rev	Actina de Leishmania	TTGGGCCAGACTCGTCTACTCGCT	Di Blasi <i>et al.</i> 2015	PCR e qPCR
P38 Fwd	Proteína cinase ativada por mitógeno	GGAGAATGAGATGACGGGCTAC	Dillon <i>et al.</i> 2008	qPCR
P38 Rev	Proteína cinase ativada por mitógeno	CCAACAGACCAAATGTCCACC	Dillon <i>et al.</i> 2008	qPCR
PIAS Fwd	Proteína inibidora de STAT ativada	GCCACAAGGGTTGAGCACAT	Tinoco-Nunes (2015)	qPCR
PIAS Rev	Proteína inibidora de STAT ativada	GACACTGCTTCCCGTTGACTTT	Tinoco-Nunes (2015)	qPCR
PTP Fwd	Proteína tirosina fosfatase	AATCCCGGAAATCTTGCAAG	gene: LL0J008161 1-2226	qPCR
PTP Rev	Proteína tirosina fosfatase	TCCAACGTTGTCATCGAGTG	gene: LL0J008161 1-2226	qPCR
RP-49 Fwd	Proteína ribossomal 49	GACCGATATGCCAAGCTAAAGCA	Meireles (2008)	qPCR
RP-49 Rev	Proteína ribossomal 49	GGGGAGCATGTGGCGTGTCT	Meireles (2008)	qPCR
SHP-1 Fwd	Domínio Sro-homologo 2 contendo fosfatase 1	TCAGACACAGGAATGGGGAC	Tinoco-Nunes (2015)	qPCR
SHP-1 Rev	Domínio Sro-homologo 2 contendo fosfatase 1	TACGTCTCTCCTCCTTGCCA	Tinoco-Nunes (2015)	qPCR
SOCs Fwd	Supressor de sinal de citocina	CCGTGGATGATGGGCTTGT	gene: LL0J002175 1-4444	qPCR
SOCs Rev	Supressor de sinal de citocina	ATCCTTTCCGGCTGCTCG	gene: LL0J002175 1-4444	qPCR
STAT Fwd	Transdutor de sinal de ativação	GGCTCCAAGATCCGACAA	gene: LL0J007427 1-4392	qPCR
STAT Rev	Transdutor de sinal de ativação	AGGAAGAGAAAGAAGCGGGATGTCCG	gene: LL0J007427 1-4392	qPCR
T7	Região promotora T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Telleria <i>et al.</i> 2012	Silenciamento gênico
T7*adaptor	Região promotora T7 + sequencia adaptadora	CCGTAATACGACTCACTATAGGGTGGCGCCCTAGATG	Telleria <i>et al.</i> 2012 Telleria <i>et al.</i> 2012	Silenciamento gênico
VIR-1 Fwd	RNA induzido por vírus 1	TAGTCCCGATTGTGACTTGG		qPCR
VIR-1 Rev	RNA induzido por vírus 1	GTGTCAGGGGTTTCATTGCT		qPCR

3.2 Insetos

Foram utilizados insetos de colônia de *L. longipalpis* originalmente coletados em Jacobina (Bahia, Brasil). Todos os insetos são mantidos em colônia do insetário do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores (LBMPV/IOC Fiocruz). Os insetos são mantidos a 26°C, alimentados com solução de sacarose 70% e as fêmeas são alimentadas regularmente com sangue de hamster anestesiado para promover a oviposição (Modi, G 1997). Os hamsters foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/ Fiocruz) seguindo as normas de Princípios Éticos de

Experimentação Animal pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA/IOC) com número de protocolo 61/12-6.

3.3 Parasitas

As formas promastigotas de *L. i. chagasi* foram mantidas a 25°C em meio 199 (pH 7.0) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Laborclin), 10% de triptose e 1% de penicilina/streptomicina (100U/mL / 100mg/mL). Os parasitas são mantidos em sala de nível de biossegurança NB-2, no LABMPV. Em fase exponencial de crescimento os parasitas foram coletados para realização dos experimentos de incubação com células embrionárias LL5 e infecção em flebotomíneos.

3.4 Cultivo de células LL5

As células embrionárias LL5 de *L. longipalpis*, foram cultivadas em meio L-15 (SIGMA - Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Laborclin), 10% de triptose e 1% de penicilina/streptomicina (100U/mL / 100mg/mL), a uma temperatura de 30°C.

3.5 Produção de dsRNA

A síntese de RNA dupla-fita *in vitro* foi feita utilizando produtos de PCR realizados com primers específicos para o gene de interesse contendo adaptadores nas extremidades 5'. Em seguida, um segundo PCR foi realizado, na qual foi adicionado um promotor T7 (RNA polimerase de bacteriófago T7) que possui uma sequência adaptadora complementar a do primeiro PCR, sendo assim o produto do primeiro PCR serviu como molde para a geração de produtos que continham o promotor flanqueando o gene de interesse (Figura 3.13). O promotor é importante para a ligação do fator de transcrição e da RNA polimerase na transcrição. Para a realização da transcrição *in vitro* foi utilizado o kit MEGAScript T7 (Ambion).

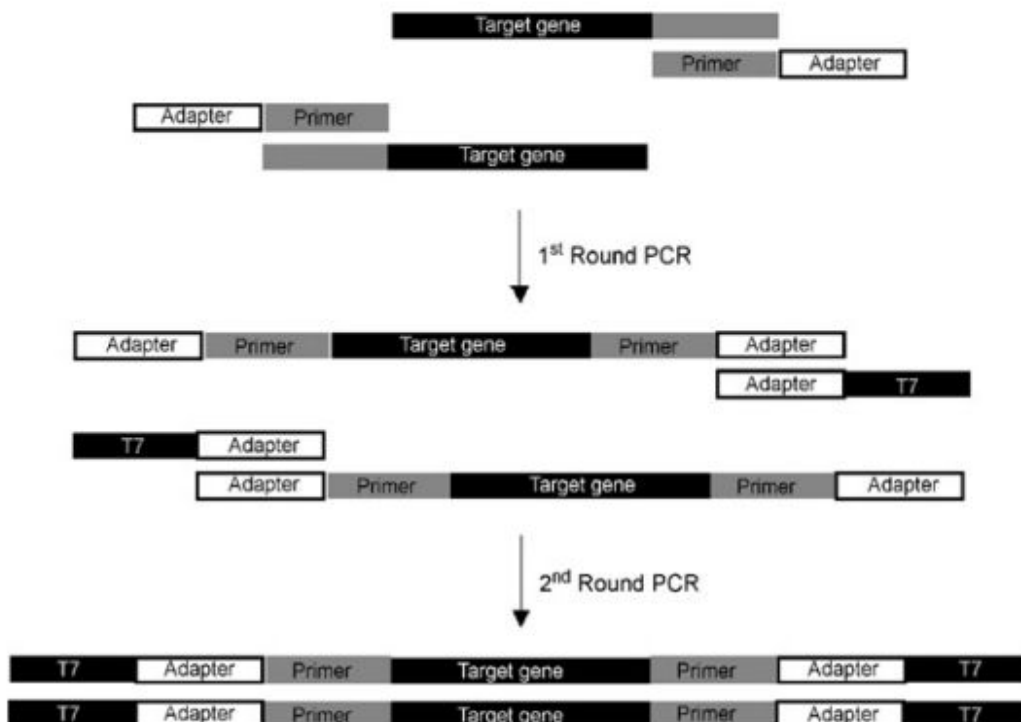


Figura 3.13: Esquema da estratégia utilizada para síntese *in vitro* de dsRNA

As condições utilizadas para realização da síntese de dsRNA foram: 95°C por 3 minutos (1 ciclo), 95°C por 30 segundos, 57° C por 45 segundos e 72° C por 45 segundos (35 ciclos) e 72° C por 7 minutos (1 ciclo). Após o primeiro PCR, 2 µg desta reação foram usados como molde para o segundo PCR usando oligonucleotídeos com a sequência T7 mais adaptador, nas mesmas condições. Para a geração de RNA dupla fita foram usados 4µL do produto do segundo PCR como molde para a transcrição *in vitro* (Figura 3.14).

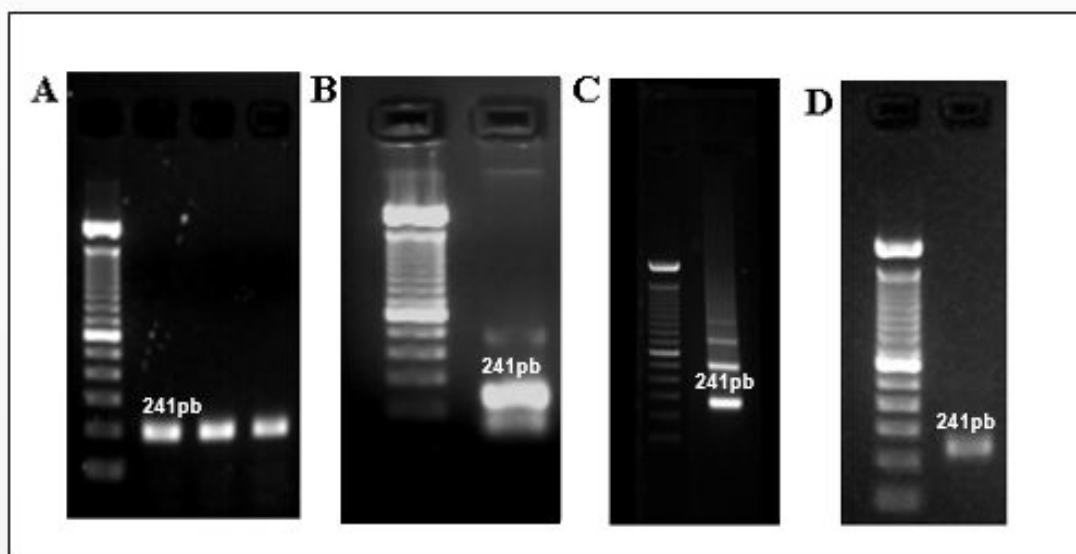


Figura 3.14: Eletroforese em gel de agarose 2% das PCRs realizadas para geração da dsRNA. (A) 1º PCR; (B) 2º PCR; (C) dsRNA para PIAS; (D) dsRNA para PIAS após purificação. Marcador de peso molecular: 100bp; oligonucleotídeo: dsPIAS.

3.6 Transfecção das células LL5

cDNA de células LL5 transfectadas com PIAS foi gerado anteriormente por Tinoco-Nunes (2016) usando o reagente lipídico DharmaFECT1 (Thermo Scientific), seguindo instruções do fabricante. Brevemente, numa placa de 24 poços, um mix contendo 0.25µL de DharmaFECT1 e 23.25 µL de DCCM (DHARMACON) e 1.5µL de dsRNA numa concentração final de 30 nM foi adicionado em cada poço. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, 75 µL de células em suspensão contendo 45×10^3 células LL5/mL (lavadas e trocadas para meio L-15 sem soro) foram adicionadas para cada

poço. A placa foi incubada a 30° C e as amostras foram coletadas em 12, 24 e 48 horas após, em seguida foram mantidas em 500mL de TRIzol (Invitrogen). As células foram transfectadas com RNA dupla fita para PIAS e luciferase, o gene de interesse e o controle, respectivamente.

3.7 Desafios das células LL5 por *L. i. chagasi*

As células LL5 mantidas em cultura ($1,12 \times 10^7$ células/ mL) foram distribuídas em garrafas de 25mL (2×10^7 células por garrafa) e crescidas *overnight*. No dia seguinte, o meio foi trocado e foram adicionados os parasitas numa relação de 10:1 parasitas: células LL5. Após duas horas de exposição aos parasitas, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) e as amostras foram coletadas nos horários de 12h, 24h e 48h após a lavagem (Figura 3.15).

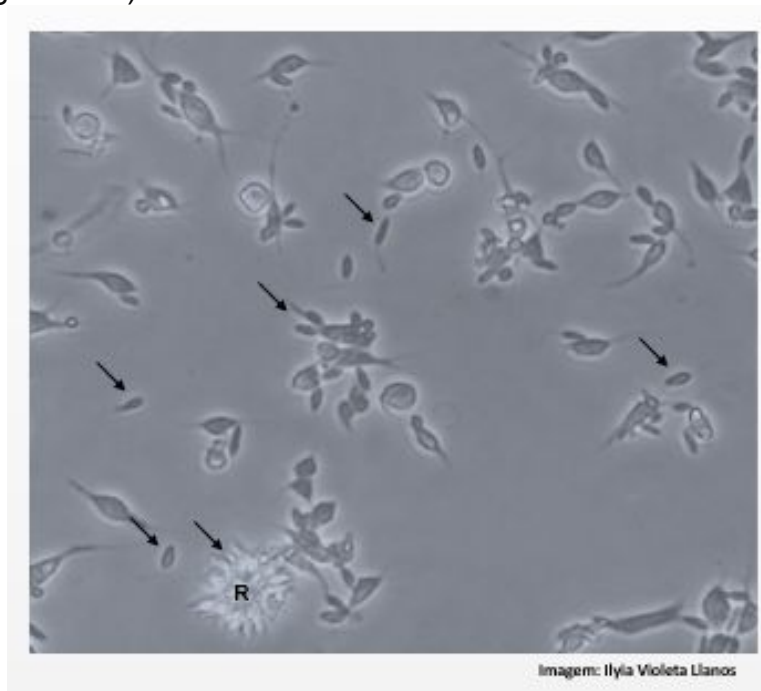


Figura 3.15: Microscopia ótica de campo claro de leishmanias aderidas às células embrionárias de LL5 de *L. longipalpis* após 2h de interação. As setas pretas indicam os parasitas e a formação de rosetas de parasitas (R) (aumento de 200 vezes).

3.8 Infecção com *Leishmania*

A infecção de fêmeas de *L. longipalpis* foi realizada artificialmente utilizando o aparelho de alimentação artificial Hemotek (www.hemotek.co.uk) (Figura 16.3). Dois grupos de insetos (infectado e controle) foram alimentados por aproximadamente 2h com 0,5mL de sangue de hamster heparinizado contendo 1×10^7 parasitas/mL. Grupos de 10 insetos em 3 replicatas biológicas independentes foram coletados nos horários de 24h, 48h, 72h e 144h após infecção e armazenados em Trizol (Invitrogen) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior quantificação por qPCR.

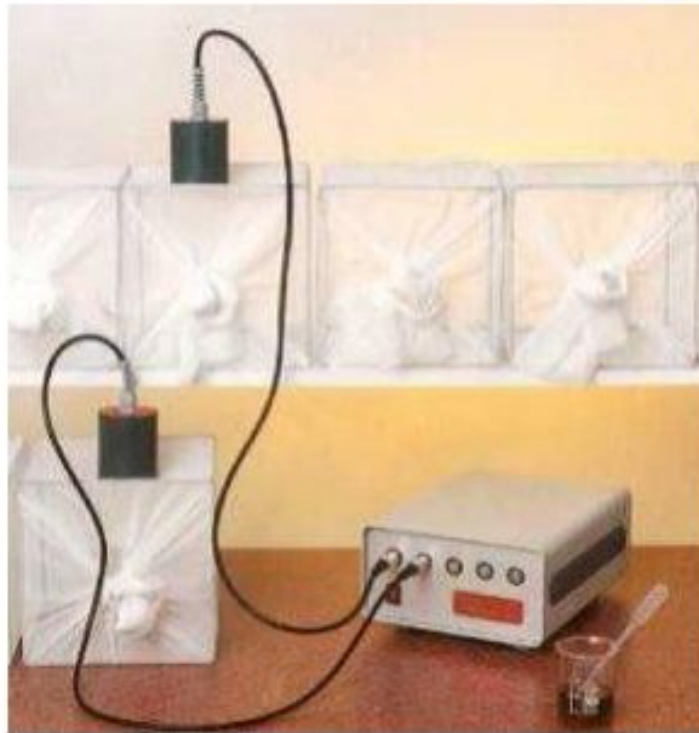


Figura 16.2: Aparelho Hemotek utilizado para realizar as alimentações artificiais dos flebotomíneos

3.9 Infecção com *Leishmania* e tratamento com antibióticos

Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com sangue contendo 1×10^7 parasitas/mL na presença ou não da solução de antibióticos (100 μ g/mL Penicilina-Estreptomicina e 10 μ g/mL Gentamicina). Nos horários pós-infecção de 24h, 48h, 72h e 144h grupos de 3 insetos foram coletados, armazenados e macerados em Trizol (Invitrogen) a -80°C .

3.10 Extração de RNA

Tanto as células em cultura quanto os insetos adultos foram armazenados em TRizol. As amostras com insetos foram centrifugadas a 12.000rpm por 10 min a 4°C , a fase líquida foi transferida para um novo tubo, desprezando o pellet com partes do inseto. As amostras (células e insetos) foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 μ L de clorofórmio às amostras e essas foram agitadas vigorosamente e incubadas por 3 min em temperatura ambiente. Após mais uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C , a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, de forma a evitar a contaminação pelo DNA genômico presente na interfase aquosa/orgânica. Foi adicionado 1 μ L de Glycoblu (Ambion) e isopropanol na proporção de 1:1, a amostra foi incubada por 3 min em temperatura ambiente seguida de mais uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C para que ocorresse a precipitação do RNA. O precipitado foi lavado com etanol 75% e a secagem realizada em temperatura ambiente por aproximadamente 25 min e foi ressuscitado em 10 μ L de água MilliQ. Todos os RNAs extraídos tiveram sua concentração determinada por espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop TM ND-2000) e armazenados a -80°C .

3.11 Tratamento por DNase do RNA extraído

Os RNAs extraídos foram tratados com Invitrogen™ TURBO DNA-free Kit (Ambion), afim de eliminar qualquer contaminante de DNA da extração. Em cada tubo de RNA extraído foi adicionado 3µL de 10x TURBO DNase buffer e homogeneizado cuidadosamente, seguida da adição de 1µL de DNase, homogeneização das amostras e incubação a 37°C por 30min. As amostras foram tratadas com 3µL de DNase Inactivation Reagent, incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugadas por 1 min. e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (11 µL de RNA).

Para verificar a eficácia do tratamento com DNase, uma PCR das amostras extraídas foi realizada (Figura 17).

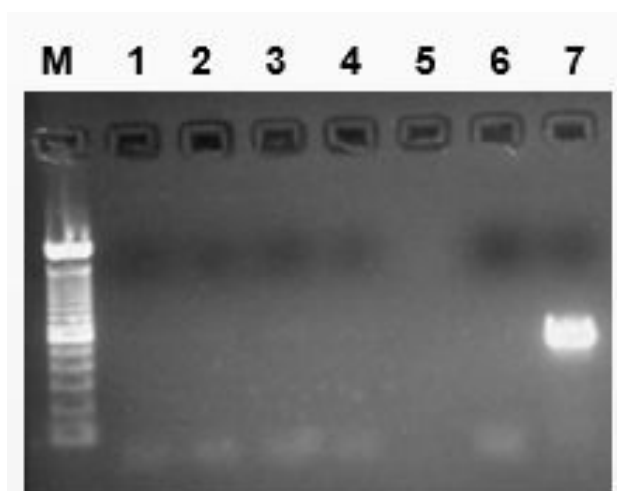


Figura 17.2: Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR para verificação da eficiência do tratamento por DNase. Oligonucleotídeo: Histona (~500bp). Marcador de peso molecular (M): 100bp; RNA de insetos infectados por *Leishmania* em 24h (1), 48h (2) 72h (3) e 144h (4); controle negativo (6); controle positivo (7).

3.12 Síntese de cDNA

O RNA livre de DNA genômico foi usado como molde para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando o kit SuperScript III FirstStrand Synthesis (Invitrogen). A primeira etapa para a síntese consistiu na preparação de um mix contendo 0,5 µL de oligo(dT)18 e 0,5µL de dNTP 10mM e 2µg de RNA por reação. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos no termociclador. Numa segunda etapa foram adicionados aos tubos 2µL de 5x FirstStrand Buffer, 0,5 µL de 0,1M DTT, e 0,5 µL de SuperScript III RT por tubo. A reação foi incubada a 50°C por 60 min. e 70°C por 15 minutos. A eficiência da síntese foi obtida através de PCR (figura 3.18).

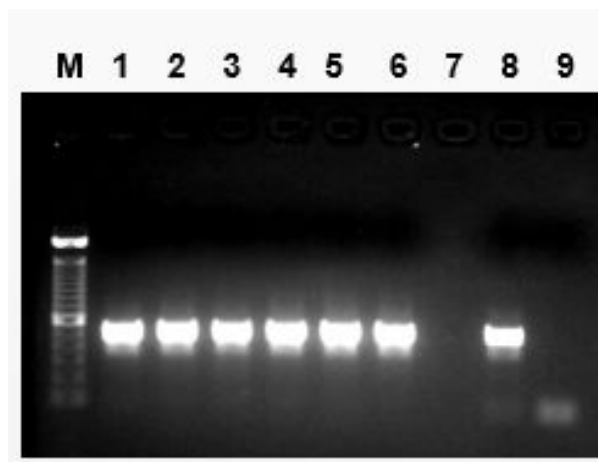


Figura 3.18: Eletroforese em gel de agarose 2% de PCR teste de eficiência da síntese de cDNA. Oligonucleotídeo: histona (~500pb). Marcador de peso molecular (M): 100bp; cDNA de insetos alimentados com sangue em 24h (1), 48h (2) 72h (3); cDNA de insetos infectados por *Leishmania* em 24h (4), 48h (5) 72h (6); controle positivo (8); controle negativo (9)

3.13 Análise da expressão por PCR quantitativo (qPCR)

A análise da expressão dos genes foi realizada por qPCR a partir de amostras de cDNAs sintetizados. A expressão relativa dos genes foi normalizada pelo gene constitutivo RP-49 de *L. longipalpis* utilizando o método $\Delta \Delta Ct$ para análise.

3.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a ferramenta “One-way Anova” aplicando o teste de múltiplas comparações no programa GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação das respostas mediadas pela Via JAK-STAT em células embrionárias LL5 de *L. longipalpis*.

4.1.1 Silenciamento do repressor PIAS por RNA de interferência em células LL5

Foi realizado anteriormente pelo nosso grupo o silenciamento por RNAi do repressor PIAS nas células LL5 de *L. longipalpis*. A eficiência do silenciamento das células LL5 transfectadas com a dupla fita sequência-específica para o repressor da via JAK-STAT foi avaliada por qPCR em 12h, 24h e 48h após a transfecção. O resultado mostrou que foi obtido silenciamento eficiente de PIAS e que este se manteve em até 48h após a transfecção (Tinoco-Nunes 2014) (Figura 4.1).

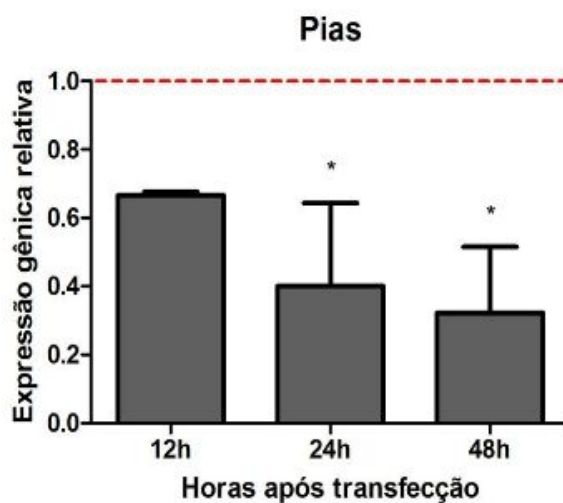


Figura 4.1: Resultados prévios da expressão relativa de PIAS em células LL5 transfectadas com RNA dupla-fita. O eixo y representa a expressão relativa do gene PIAS normalizado com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 transfectadas com a dupla-fita não relacionada. O valor "1" no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após a transfecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicatas biológicas e repetidas em triplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$) (Tinoco-Nunes 2014)

4.1.2 Expressão dos genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS

Uma vez que o principal repressor da via JAK-STAT foi silenciado, era de interesse saber o impacto do silenciamento sobre a atividade da via JAK-STAT. A análise da expressão de outros reguladores da via, como os reguladores negativos PTP e SOCS e o fator de transcrição STAT após o silenciamento de PIAS foi então realizada. Após silenciamento de PIAS a expressão de PTP nas células embrionárias diminuiu significativamente em 12h em comparação com células controle (não silenciadas), mas mostrou uma tendência ao aumento em 24h e 48h (Figura 4.2A). Enquanto a expressão do fator de transcrição, STAT, reduziu significativamente em 12h, retornou a expressão basal em 24h e depois diminuiu significativamente novamente em 48h em comparação com a expressão de células controle (Figura 4.2B). A expressão de SOCS apresentou uma ligeira diminuição em 12h e retornou à expressão basal em 24h após o silenciamento de PIAS nas células embrionárias (Figura 4.2C). Em conjunto, esses resultados obtidos sugerem

que a via JAK-STAT está sendo inativada em 12h após o silenciamento por algum mecanismo desconhecido e tem sua atividade reduzida em 48h, possivelmente pelo aumento da expressão de PTP.

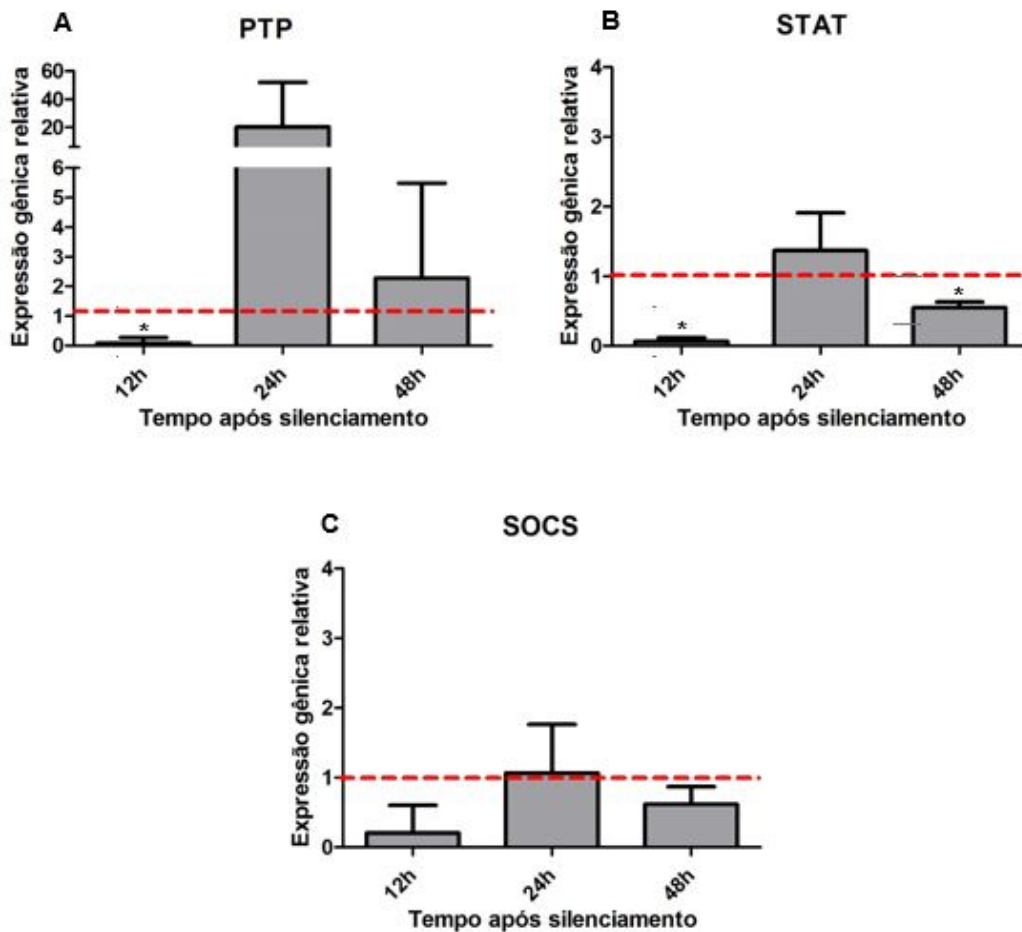


Figura 4.2: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS. (A) PTP; (B) STAT; (C) SOCS. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 transfectadas com a dupla-fita não relacionada. O valor "1" no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após a transfecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicatas biológicas e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.1.3 Expressão dos genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS

Após o silenciamento de PIAS, a expressão de genes efetores VIR-1 e o peptídeo antimicrobiano atacina em células embrionárias também foi avaliada. Atacina apresentou uma redução significativa da sua expressão em 12h e retornou ao seu nível de expressão basal em 24h e 48h (Figura 4.3A) em células embrionárias silenciadas para PIAS. Quanto à expressão de VIR-1, essa não mostrou alteração durante o silenciamento de PIAS, mas uma tendência à redução é observada nos horários iniciais (Figura 4.3B).

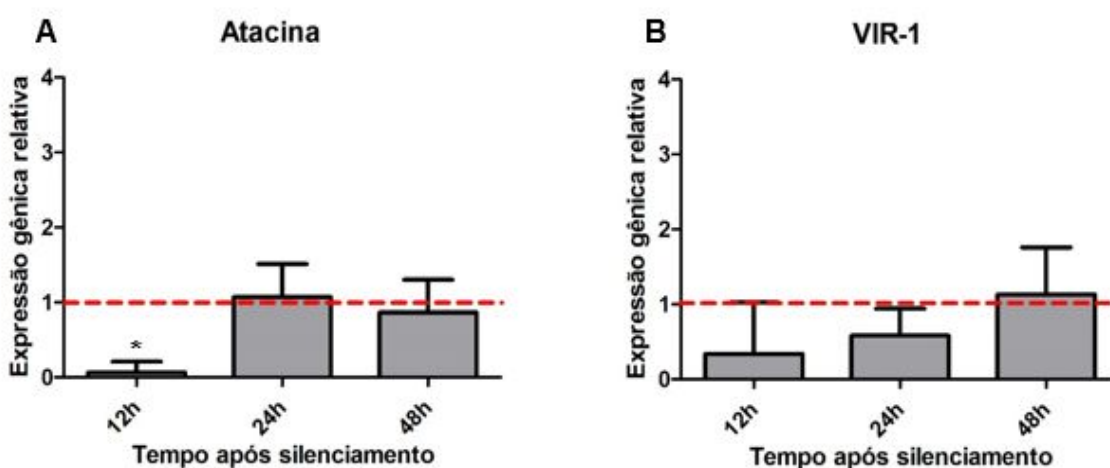


Figura 4.3: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 silenciadas para PIAS. (A) atacina; (B) VIR-1. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 transfectadas com a dupla-fita não relacionada. O valor "1" no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após a transfecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.1.4 Expressão de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por *Leishmania*

Através da análise do perfil de expressão de genes reguladores e efetores de células embrionárias desafiadas por *L. i. chagasi*, foi visto que após 24h, todos os genes se mantiveram num nível basal de expressão. Os resultados também mostram que houve o aumento significativo da expressão dos repressores PIAS e PTP em 48h que se mantém até 72h após o desafio das células LL5 (Figura 4.4A e B). O gene STAT teve sua expressão também aumentada em 48h, mas retorna à sua expressão basal em 72h (Figura 4.4C). O mesmo padrão dos repressores da via foi observado para SOCS, que apresentou um aumento de expressão em 24h e 48h após desafio com o parasita (Figura 4.4D). Os resultados sugerem que a via teve uma ativação em 48h, entretanto, foi prontamente inativada em 72h, horário em que se observa o aumento da expressão de todos os genes repressores.

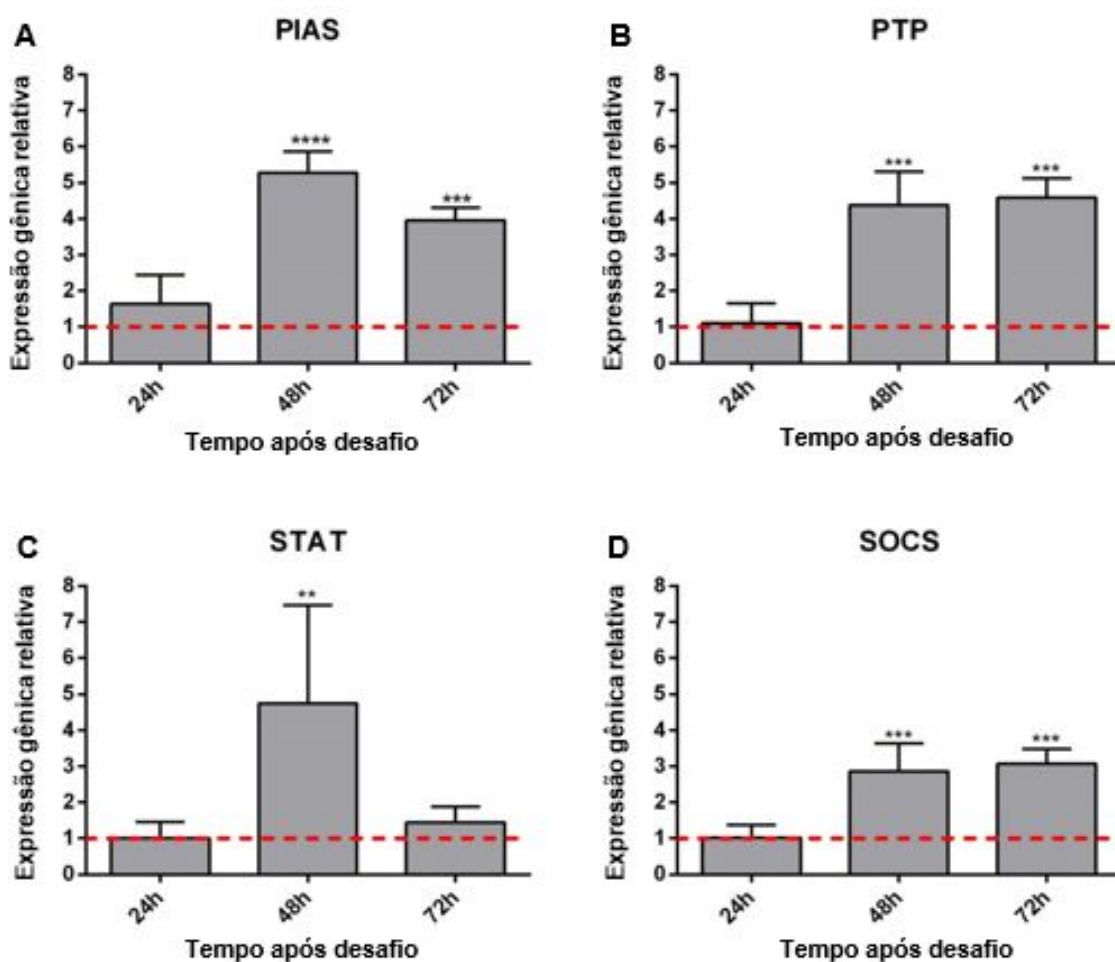


Figura 4.4: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por *L. i. chagasi*. (A) PIAS; (B) PTP; (C) STAT; (D) SOCS. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 não desafiadas. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após o desafio. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.1.5 Expressão de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por *Leishmania*

Os resultados da avaliação da expressão dos genes efetores mostraram que atacina se manteve basal em todos os horários, no entanto, há uma leve tendência à diminuição de expressão em 72h após o desafio com parasita em células embrionárias LL5 em comparação com controle não desafiadas (Figura 4.5A). Na expressão de VIR-1, uma redução significativa foi observada em todos os horários, inferindo uma inativação da via após o desafio quando comparadas às células não desafiadas (Figura 4.5B). Em conjunto, esses resultados indicam que a atividade da via JAK-STAT está sendo inibida pelo desafio por *Leishmania*.

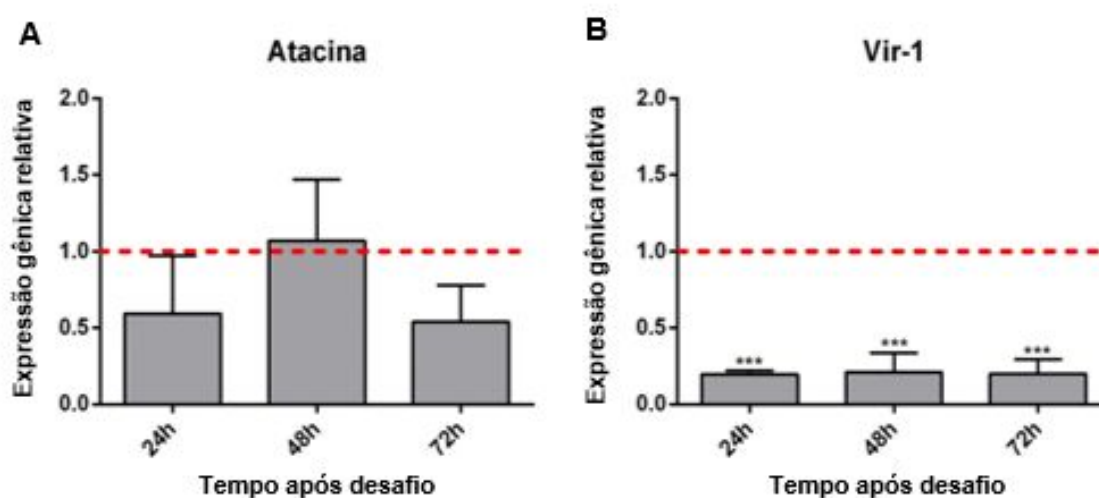


Figura 4.5: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em células LL5 desafiadas por *L. i. chagasi*. (A) atacina; (B) VIR-1. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 não desafiadas. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após o desafio. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.1.6 Expressão de SHP-1 em células LL5 desafiadas por *Leishmania*

Os resultados de inibição do gene efetor VIR-1 anteriores mostraram que a atividade da via JAK-STAT possivelmente está sendo inibida pela infecção com *Leishmania* (Oliver *et al* 2012). Para entender os mecanismos dessa inativação, foi realizada avaliação da expressão do gene SHP-1. Esta molécula é ativada durante a infecção de macrófagos por *Leishmania* e desempenha um papel importante tanto na sobrevivência do parasita *in vitro* quanto na progressão da doença *in vivo*, através da inativação das vias Toll e JAK-STAT.

Em células LL5, a expressão de SHP-1 após o desafio apresentou o mesmo perfil observado nos outros repressores da via (PIAS, PTP e SOCS; Figura 4.22 A, B e D), apresentando um aumento significativo em 48 e 72h após o desafio (Figura 4.6), reforçando a hipótese de uma possível inativação da via pelo parasita.

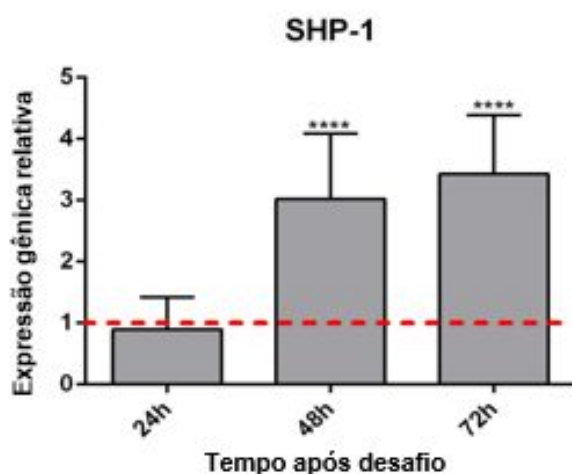


Figura 4.6: Expressão relativa de SHP-1 em células LL5 desafiadas por *L. i. chagasi*. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 não desafiadas. O valor "1" no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após o desafio. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.1.7 Expressão de genes da via de MAPK em células LL5 desafiadas por *Leishmania*

É sabido que SHP-1 é capaz de inibir não só a expressão de STAT, mas também de algumas MAPKs e estas, por sua vez, também possuem um papel indireto na ativação de JAK-STAT (Figura 4.7). Portanto analisamos a expressão dos genes P38, as ERKs 2 e 7, e AP1 da via MAPK. Os resultados mostraram que a expressão desses genes apesar de apresentar uma variação em todos os horários analisados não teve diferença significativa em relação ao controle.

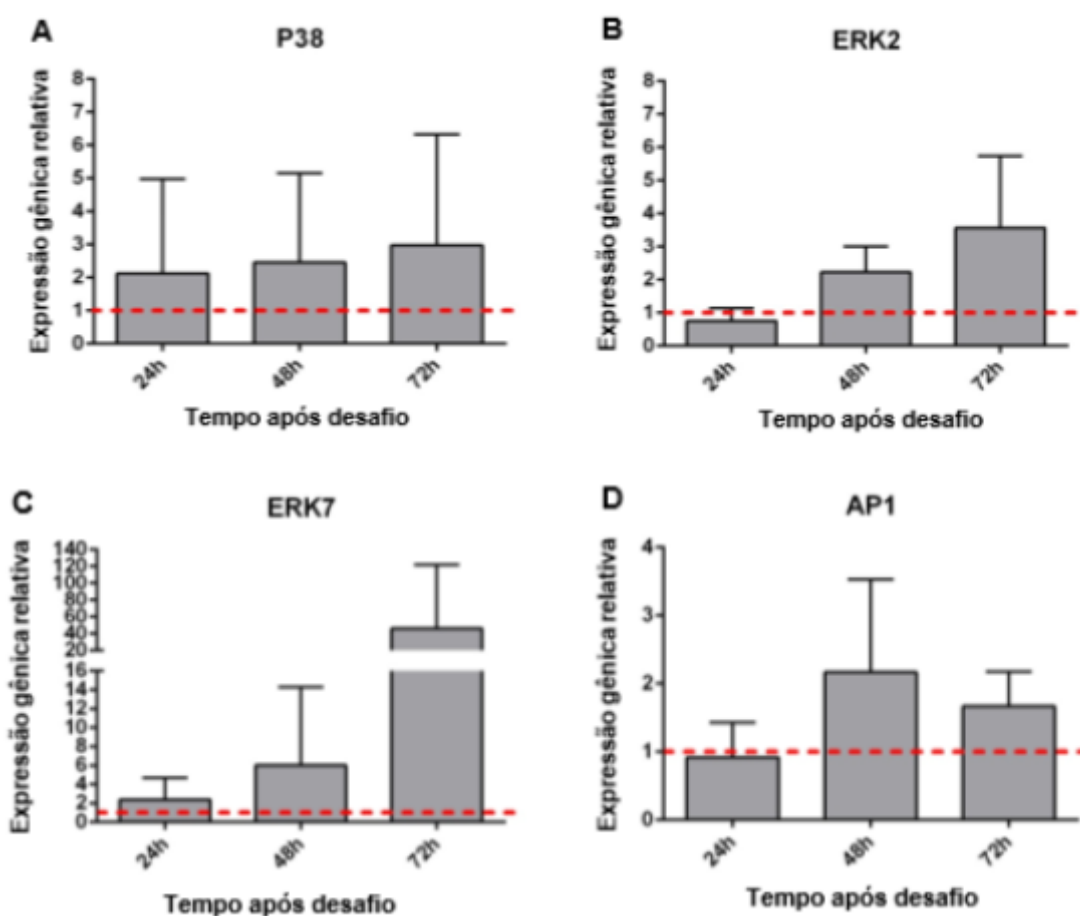


Figura 4.7: Expressão relativa de genes da via das MAPKs em células LL5 desafiadas por *L. i. chagasi*. (A) P38; (B) ERK2; (C) ERK7; (D) AP1. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de células LL5 não desafiadas. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras de células LL5 foram coletadas após o desafio. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.2 Avaliação das respostas mediadas pela via JAK-STAT em fêmeas de *L. longipalpis*.

As linhagens celulares de insetos são ferramentas mais simples no qual as variáveis são controladas, contudo, não representa fielmente o sistema fisiológico dos insetos, com atividade de enzimas digestivas, formação de matriz peritrófica ou a presença da microbiota, entre outros.

Portanto, investigamos o perfil de expressão dos genes relacionados à via JAK-STAT também em insetos adultos infectados por *L. i. chagasi*.

4.2.1 Expressão dos genes reguladores da via JAK-STAT em insetos adultos infectados por *Leishmania*

A expressão do regulador negativo PIAS não sofreu alteração nos horários iniciais até 72h após infecção do inseto, contudo, houve um aumento da expressão de PIAS em 144h (Figura 4.8A). A expressão de PTP não foi alterada significativamente durante a infecção dos insetos, entretanto mostrou uma tendência ao aumento em 144h, assim como observado na expressão gênica de PIAS (Figura 4.8B). A expressão do gene regulador positivo STAT

aumentou em 24h, diminuiu significativa em 72h e depois retornou à sua expressão basal em 144h após a infecção dos flebotomíneos por *Leishmania* (Figura 4.8C). O gene SOCS, outro regulador negativo da via, não apresentou alterações de expressão em nenhum dos horários analisados em insetos infectados em comparação com insetos controle (Figura 4.8D).

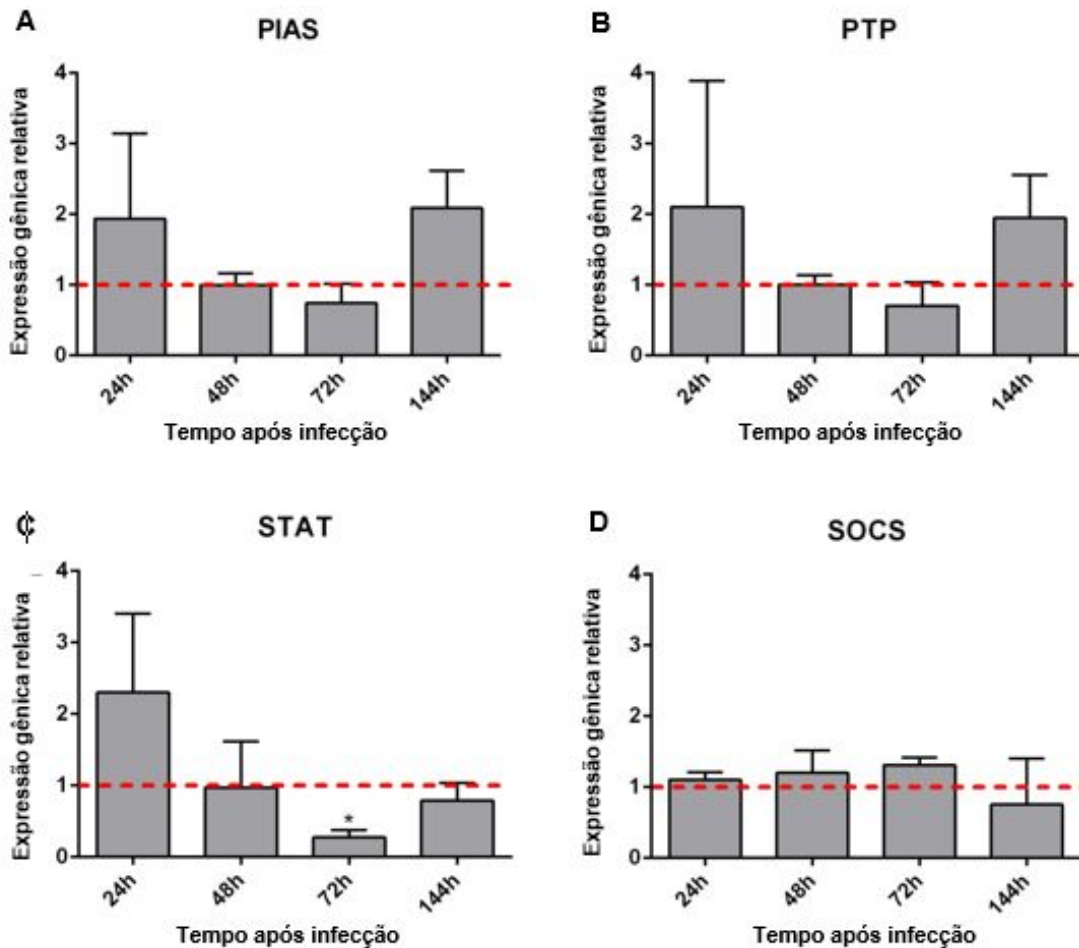


Figura 4.8: Expressão relativa de genes reguladores da via JAK-STAT em *L. longipalpis* infectadas por *L. i. chagasi*. (A) PIAS; (B) PTP; (C) STAT; (D) SOCS. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de insetos não infectados. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras foram coletadas após a infecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicatas biológicas realizadas em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$;

p<0.0001****).

Em conjunto, esses resultados indicam que a via está sendo inativada também no inseto em 72h após a infecção.

4.2.2 Expressão de genes efetores da via JAK-STAT em *L. Longipalpis* infectados por *L. i. chagasi*.

Após análise da expressão de genes reguladores negativos e positivos da via JAK-STAT, analisamos a expressão dos genes efetores atacina, VIR-1 e de iNOS.

Os resultados mostraram que nos insetos os genes variaram bastante durante a infecção por *L. i. chagasi* (Figura 4.9). O gene do peptídeo antimicrobiano, atacina foi o único que apresentou uma diminuição significativa da expressão em 72h (Figura 4.9A), enquanto a expressão de VIR-1 e iNOS não foram alteradas durante a infecção (Figura 4.9B e C), em comparação com insetos controle não desafiados.

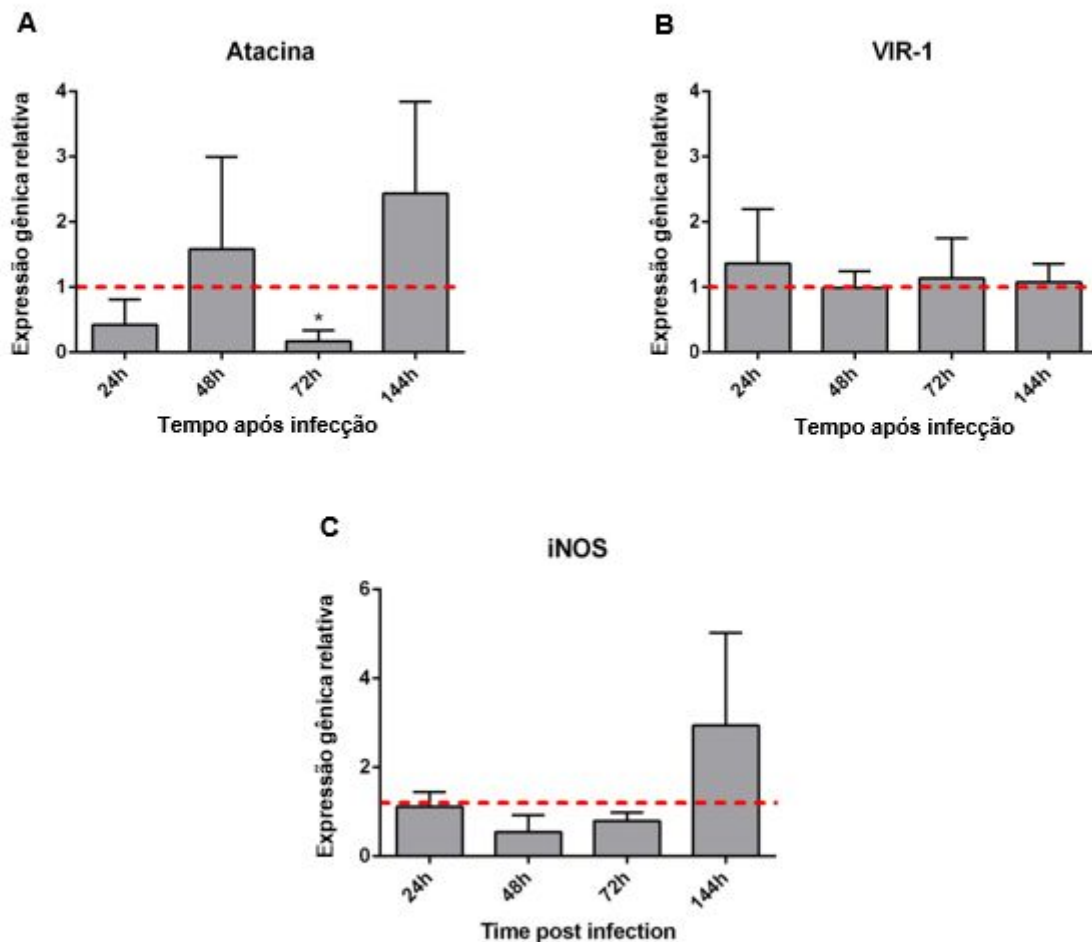


Figura 4.9: Expressão relativa de genes efetores da via JAK-STAT em *L. longipalpis* infectadas por *L. i. chagasi*. (A) atacina; (B) VIR-1; (C) iNOS. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de insetos não infectados. O valor “1” no eixo y do gráfico representa a expressão dos genes no grupo controle. O eixo x representa os horários em que as amostras foram coletadas após a infecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicatas biológicas realizadas em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.3 Análise da microbiota de *L. longipalpis* durante a infecção por *L. i. chagasi*.

Os resultados da expressão dos genes da via JAK-STAT nos insetos sugerem uma possível inativação da via, contudo, não sabemos se há alguma interferência da microbiota do inseto na expressão dos genes investigados. Também foi realizada a avaliação do papel das bactérias do flebotomíneo na infecção de *Leishmania* e nas respostas mediadas pela via JAK-STAT no inseto.

4.3.1 Expressão dos genes 16S de bactérias e actina de *L. i. chagasi* em insetos infectados

Com a finalidade de avaliar a correlação entre *L. i. chagasi* e as bactérias da microbiota de *L. longipalpis*, analisamos a expressão do gene 16S de bactéria nos insetos alimentados com sangue com e sem o parasita, além da expressão de actina para a quantificação de *Leishmania*. Os resultados obtidos mostraram que a expressão de 16S varia bastante entre as replicatas biológicas. Entretanto, pode-se observar em geral que em 24h o gene 16S é pouco expresso tanto nos grupos infectados como controle. A partir de 48h,

observamos a tendência de diminuição na expressão de 16S nos insetos infectados em relação ao grupo controle (Figura 4.10A). Essa expressão tende a variar ao longo das horas, sendo mais alta em em 72h e mais baixa em 144h em comparação ao grupo controle, porém não significativo (Figura 4.10A). A expressão de actina de *Leishmania* mostrou um pico significativo em 48h após infecção e reduz em 72h e 144h (Figura 4.10B).

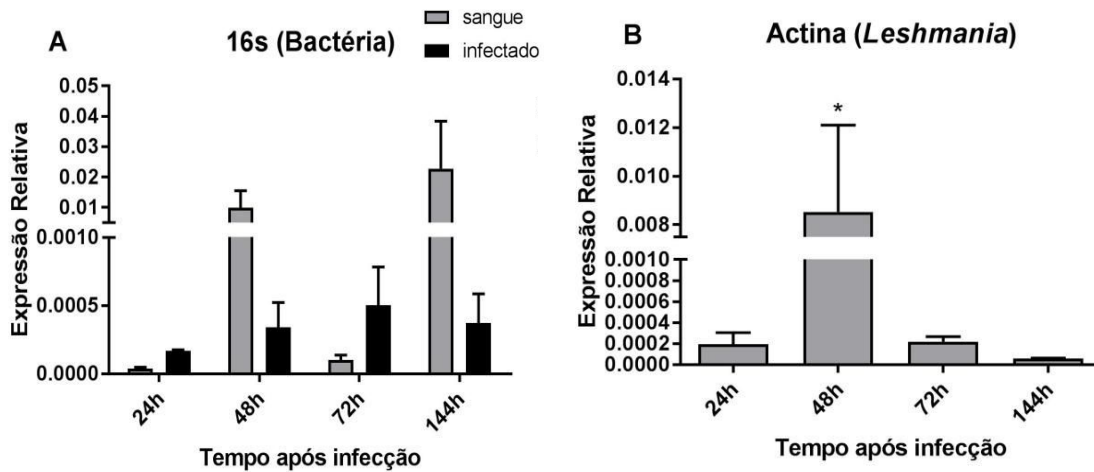


Figura 4.10: Expressão do gene 16S de bactéria e actina de *Leishmania* em *L. longipalpis* infectados por *L. i. chagasi*. (A) 16S de bactéria. As colunas em cinza representam o grupo controle (alimentado com sangue) e em preto o grupo infectado com o parasita. (B) actina de *Leishmania*. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49. O eixo x representa os horários em que as amostras de grupos de 10 insetos foram coletadas após infecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de triplicatas biológicas e repetidas em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

4.3.2 Expressão de genes da via JAK-STAT em insetos adultos infectados por *Leishmania* e tratados com antibióticos

Para verificar se as bactérias do flebotomíneo alteram a via JAK-STAT analisamos a expressão de alguns genes da via em insetos infectados e tratados com antibióticos. Resultados preliminares (n=2) mostraram que a expressão de PIAS, STAT e VIR-1 não apresentaram qualquer alteração durante toda a infecção, em insetos controle e tratados com antibióticos (Figura 4.11 A, B e D). A expressão gênica de atacina apresentou uma tendência de diminuição em 12h no grupo tratado com antibióticos comparados ao grupo controle (Figura 4.11C), o que pode indicar um papel do AMP nas respostas antibacterianas).

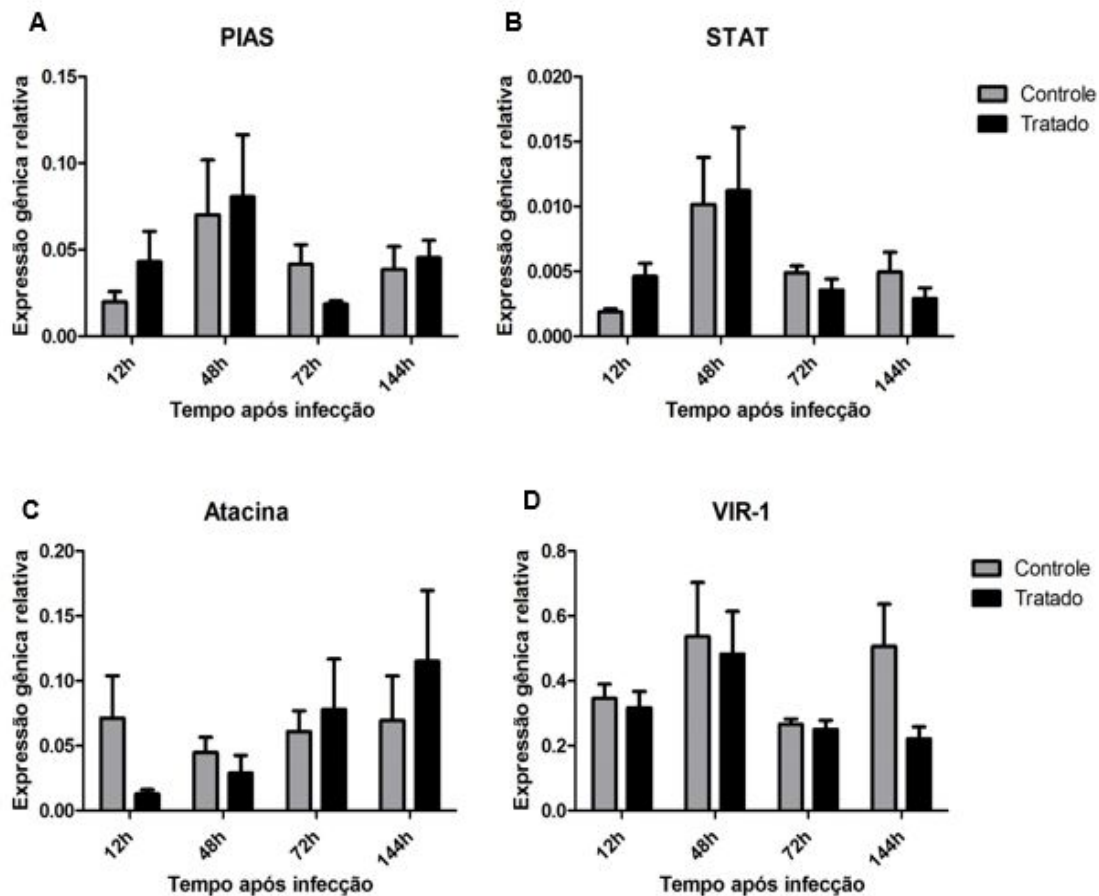


Figura 4.11: Expressão de genes da via JAK-STAT em *L. longipalpis* infectados por *L. i. chagasi* na presença de antibióticos. (A) PIAS; (B) STAT; (C) atacina; (D) VIR-1. O eixo y representa a expressão relativa dos genes normalizados com o gene constitutivo de *L. longipalpis* RP49, calculada em relação ao grupo controle de insetos sem antibióticos. As barras cinzas representam a expressão dos genes no grupo controle e as barras pretas representam a expressão dos genes no grupo tratado. O eixo x representa os horários em que as amostras de grupos de 3 insetos foram coletadas após infecção. O desvio padrão está representado por barras horizontais logo acima de cada coluna. Os dados apresentados são resultados de duplicata biológica e repetida em duplicata experimental. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA com múltiplas comparações ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

5 DISCUSSÃO

Ao longo do ciclo de vida, insetos são expostos a diversos microrganismos como bactérias, fungos, helmintos, vírus e parasitas. Para sobreviver a essas infecções, os insetos desenvolvem respostas imunes (Medzhitov e Janeway 2002). A imunidade inata é um dos principais mecanismos de defesa de insetos, e esta é formada por três vias principais: Toll, IMD e JAK-STAT. As duas primeiras são as mais estudadas e seus principais componentes já foram caracterizados em estudos anteriores em *Drosophila* e mosquitos (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Estas vias, quando ativadas, respondem à infecção através da expressão de peptídeos antimicrobianos e de genes efetores da imunidade (Michel *et al.* 2001, Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003).

Pouco se sabe sobre os aspectos da imunidade em flebotomíneos. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo foi realizada a identificação de diversos genes ligados à imunidade do inseto, dentre os quais estão reguladores negativos e fatores de transcrição das vias Toll e IMD (Pitaluga *et al.* 2008). Além disso, foi demonstrado pela primeira vez o papel das vias de imunidade no controle da infecção por *Leishmania* e bactérias em *L. longipalpis* (Telleria *et al.* 2012). Contudo, a atividade da via JAK-STAT ainda não havia sido explorada em flebotomíneos. Assim, no presente trabalho estudamos a via JAK-STAT usando como modelo células embrionárias de *L. longipalpis*, bem como o inseto adulto.

Em trabalho recentemente, foi demonstrado que as células embrionárias LL5 de *L. Longipalpis* podem ser um bom modelo para o estudo da imunidade em insetos. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem celular é capaz de responder ao desafio por bactérias, fungo e *Leishmania* através da ativação das vias Toll e IMD com expressão de genes reguladores e AMPs (Tinoco-Nunes *et al.* 2016). Com base nesses resultados, e por se tratar de um modelo mais simples e no qual as variáveis são mais facilmente controladas,

as células LL5 foram também adotadas como modelo para o estudo da via JAK-STAT em *L. longipalpis*.

A capacidade das células LL5 de *L. longipalpis* em responder ao tratamento com RNA dupla fita foi anteriormente avaliada, onde células LL5 foram transfectadas com dsRNAs de diferentes genes repressores das vias de imunidade. Os resultados sugeriram a existência de um mecanismo de RNAi funcional em células LL5, que resulta em silenciamento gênico através de dsRNA. Posteriormente, células LL5 transfectadas com dupla-fita para o gene PIAS mostraram uma redução significativa dos níveis de RNA mensageiro, mostrando que o silenciamento de PIAS foi eficiente até 48h pós-transfecção (Tinoco-Nunes 2014).

Sabe-se que o regulador negativo PIAS inibe a ativação da via JAK-STAT pela ligação ao fator de transcrição STAT ativada, ou seja, dímeros de STAT tirosina-fosforilados. Dessa forma, PIAS bloqueia a ligação de STAT ao DNA e levam à inativação ou degradação do fator de transcrição pela proteína SUMO E3 ligase (Betz *et al.* 2001). Ao silenciar o principal repressor da via, PIAS, era esperado que ocorresse uma ativação ou que os outros repressores inibissem a atividade da via. A via JAK-STAT também é regulada por PTP, que inibe a via pela desfosforilação de Hopscotch, uma JAK-cinase que fosforila o receptor DOME, atuando como locais de ancoragem para STAT que é fosforilada e dimerizada. Dessa forma, PTP impede a fosforilação e dimerização de STAT (Chen *et al.* 2014). Em células embrionárias LL5, observamos que a expressão de PTP diminuiu significativamente em 12h, após o silenciamento de PIAS. Esse resultado sugere que o silenciamento do principal gene regulador da via, PIAS, causa uma diminuição de outro regulador PTP da via. A expressão do fator de transcrição STAT também apresentou uma diminuição significativa em 12h e 48h após o silenciamento de PIAS. Como o silenciamento de PIAS, só tem efeito significativo nas células embrionárias com 24h e 48h, podemos considerar que a via JAK-STAT pode estar sendo alterada principalmente pelo gene repressor PTP que reduz em 12h assim como STAT. Apesar de não ter diferença significativa a expressão de PTP aumenta 20x em relação ao controle 24h após o silenciamento e

diminuiu em 48h, e a expressão de STAT volta ao patamar da expressão de células controle em 24h e em 48h reduz novamente, indicando que PTP tem efeito sobre STAT complementando o silenciamento de PIAS.

O gene STAT quando fosforilado forma dímeros que são translocados para o núcleo, onde se ligará ao sítio específico do DNA para desencadear a transcrição de AMPs como atacina e diptericina, e genes efetores como a molécula VIR-1 (Goto *et al.* 2010; Huang *et al.* 2013; Agaisse *et al.* 2003, Ekengren and Hultmark, 2001). Além destas, STAT também é responsável pela expressão de SOCS que é um regulador expresso pela via e responsável pela retroinibição, impedindo o recrutamento de STAT (Muller *et al.* 2005; Chen *et al.* 2014). Após o silenciamento de PIAS, a expressão de SOCS nas células LL5 foi reduzida em 12h, apesar de não ter sido significativo, segue um perfil de expressão semelhante ao de STAT em 24h e 48h após o silenciamento. Dado que SOCS é responsável pelo mecanismo de alça regulatória, essa diminuição dá indícios de que a via não permanece ativada após o silenciamento muito possivelmente pelo aumento de PTP. A expressão de atacina mostrou-se reduzida em 12h e retorna à sua expressão basal nos horários posteriores, enquanto a expressão de VIR-1 não apresentou alteração da sua expressão, no entanto, mostra uma tendência a redução em 12h. Sendo assim, a hipótese de que a via JAK-STAT poderia ser ativada pelo silenciamento de PIAS não foi confirmada em células LL5 mantidas em cultura.

Podemos atribuir esse resultado a uma regulação negativa da via por algum mecanismo semelhante ao observado em células LL5 silenciadas para o repressor cactus, onde os peptídeos antimicrobianos atacina, cecropina e defensina 4 foram reguladas negativamente após o silenciamento num efeito de alça de regulação negativa da via Toll, de modo a preservar a microbiota na ausência de estímulo imune (Tinoco-Nunes *et al.* 2016).

Os resultados obtidos utilizando as células LL5 silenciadas ainda são iniciais, entretanto podemos propor uma segunda hipótese. A via JAK-STAT em células de cultura silenciadas não sofre ativação, porém poderia ser mais expressa frente a algum desafio, como por exemplo uma co-cultura de LL5 e *Leishmania*.

Ainda não existem relatos sobre o funcionamento da via JAK-STAT frente à infecção por *Leishmania*. Os resultados obtidos da interação das células LL5 com o parasita mostraram que a expressão de todos os genes analisados não é alterada em 24h. Visto que os parasitas se encontram ligadas às células em 12h e em processo de internalização a partir de 24h após o desafio em células Lulo (Bello *et al.* 2005), os resultados podem indicar que a internalização dos parasitas seja importante para a ativação de uma resposta imune. Após 48h e 72h do desafio, observamos que a expressão dos repressores PIAS e PTP aumentou significativamente. Até o momento, não há nenhuma informação sobre a dinâmica ou interação entre PIAS e PTP durante a repressão da via. Entretanto, podemos sugerir que a via sofre efeito do desafio por *L. i. chagasi* e os repressores estão sendo expressos para inibir sua ativação, o contrário do que foi observado com os genes relacionados às vias Toll e IMD, onde a exposição ao parasita promoveu a ativação de ambas as vias, com expressão de peptídeos antimicrobianos (Tinoco-Nunes *et al.* 2016).

A expressão de STAT apresentou um aumento em 48h, horário em que também foi observado aumento da expressão dos repressores. Esse sincronismo verificado pelo aumento simultâneo de expressão do fator de transcrição e repressores pode ser explicado pela ligação do repressor ao fator de transcrição como ocorre com PIAS, que interage fisicamente com os dímeros de STAT para impedir a sua translocação (Betz *et al.* 2001). Essa ligação também foi observada no repressor cactus ao fator de transcrição dorsal da via Toll em células de *Drosophila* (Drier *et al.* 1999).

Dos genes expressos pela via, SOCS parece estar contribuindo para a repressão da via nos horários tardios. Contudo, a expressão de atacina não variou e do efector VIR-1 reduziu significativamente, corroborando a suposição de que a via JAK-STAT está sendo reprimida frente ao desafio pelo parasita.

É sabido que *Leishmania* é capaz de expressar moléculas importantes para a sua sobrevivência e o estabelecimento da infecção, como a glicoproteína 63 (GP63) pertencente à família das metalopeptidases e expressa em abundância na superfície celular das formas promastigotas de *Leishmania* (Yao *et al.* 2003). GP63 modula a via JAK-STAT pela ativação de SHP1 em

macrófagos. A SHP-1 é ativada durante a infecção por *Leishmania* e desempenha um papel importante tanto na sobrevivência do parasita dentro de macrófagos quanto na progressão da doença *in vivo*, ou seja, GP63 ativa proteínas tirosina-fosfatases (SHP-1 e PTP), que por sua vez, inativa STAT imunossuprimindo o hospedeiro.

A inativação da via JAK-STAT também pode ocorrer de forma indireta, uma vez que SHP-1 também inibe MAPKs que, por sua vez, podem fosforilar STAT. A figura 5.30 resume todo o processo de modulação da via JAK-STAT em macrófagos (Olivier *et al* 2012). Nossos resultados de fato contribuem para essa hipótese, pois pudemos observar que SHP-1 nas células LL5 teve sua expressão aumentada 48h e 72h após o desafio. Contudo, a análise de algumas MAPKs tais como P38, ERK2, ERK7 e AP1 mostram que essas variam bastante entre as replicatas, indicando que essas podem não estar envolvidas nas respostas contra o desafio.

De forma geral, os resultados utilizando as células LL5 sugerem que o desafio por *L. i. chagasi* utiliza algum mecanismo de modulação da via JAK-STAT, reprimindo sua atividade para sobreviver às respostas imunológicas das células. Assim, abrimos um precedente para o estudo da via no organismo mais complexo, como fêmeas de *L. longipalpis*.

Recentemente nosso grupo observou que a expressão de SHP-1 em insetos adultos é aumentada 48h após infecção (Tinoco-Nunes 2015), indicando que a diminuição da expressão de STAT observada em 48h e 72h neste trabalho pode estar correlacionada com o aumento da expressão de SHP-1 que, por sua vez, é ativada por GP63.

Nos experimentos utilizando insetos adultos, a expressão de PIAS não é alterada em até 72h após infecção por *L. i. chagasi*, apresentando uma tendência de aumento apenas no horário tardio de 144h e o mesmo perfil de expressão é observado para o repressor PTP. Como já observado nos experimentos com células LL5, aparentemente PIAS e PTP inibem a ativação da via JAK-STAT através de comunicação cruzada entre os repressores, sugerindo uma regulação semelhante em insetos.

Quanto à STAT, foi observada uma diminuição da expressão em 72h, sendo este um horário de grande importância, quando ocorre o primeiro contato do parasita com o epitélio intestinal do inseto. Em *A. aquasalis*, AqSTAT apresenta um padrão de expressão similar à AqPIAS e a indução desses dois genes sugerem que a via JAK-STAT é ativada em resposta à infecção por *P. vivax* (Bahia *et al.* 2011). Diferentemente do observado em *A. aquasalis*, STAT e PIAS em *L. longipalpis* não apresentam uma expressão concomitante após infecção e os resultados sugerem que a atividade da via foi prontamente inibida pelo parasita.

Além de regular a expressão de peptídeos antimicrobianos e Vir-1, há relatos que a via JAK-STAT regula produção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por STAT em vertebrados (Kleinert *et al.* 1998). A enzima iNOS é responsável pela produção de óxido nítrico, espécie reativa de oxigênio importante na limitação da infecção por patógenos. Foi visto que em *A. aquasalis* a expressão de iNOS é aumentada em 36h em resposta a *P. vivax*, indicando que a via JAK-STAT pode regular a expressão de NOS em *Anopheles* (Luckhart *et al.* 1998).

Nos resultados desse trabalho, observamos que apenas atacina é regulada negativamente 72 h após infecção no flebotomíneo enquanto VIR-1 e iNOS não são alteradas, corroborando a hipótese de que a via está sendo inativada durante a infecção. A diminuição significativa da expressão de atacina ocorre também com STAT em 72h, indicando que atacina é regulada por STAT também em *L. longipalpis*, como descrito na literatura.

Sendo assim, os resultados indicam que a via JAK-STAT está sendo inativada após a infecção pelo parasita, dessa forma, podemos inferir a possível modulação negativa da via JAK-STAT por *L. i. chagasi* também no inseto. Como visto nos resultados obtidos nas células LL5, essa modulação da via pelo parasita pode estar relacionada à ativação de SHP-1, que em *L. longipalpis* mostrou sua expressão aumentada em 48h após a infecção (Dados não publicados).

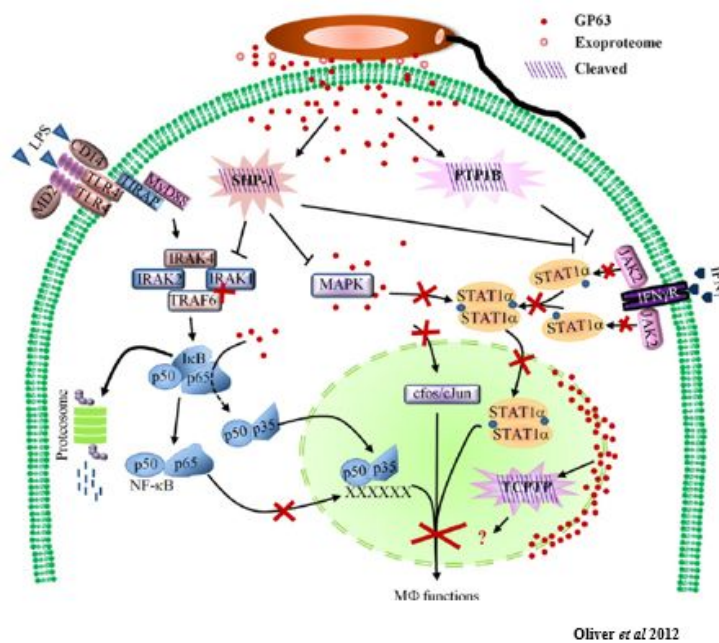


Figura 5.1: Modulação da via JAK-STAT pela *Leishmania* em macrófago. A proteína GP63 cliva e ativa as SHP-1, PTP1B e TCPTP levando à inativação de várias quinases. SHP-1 está envolvida na regulação negativa das vias de sinalização de IRAK-1, MAPK e JAK-STAT. A via JAK-STAT ainda pode ser inativada mediante a atividade de PTP1B ou indiretamente pelo bloqueio do sinal das MAPKs. As setas indicam ativação, as linhas anuladas indicam a regulação negativa e o “x” em vermelho indicam alteração de sinalização e inibição funcional.

Outros fatores também podem interferir no desenvolvimento de *Leishmania* são outros microorganismos presentes no tubo digestivo. Recentemente foi demonstrado que a infecção por *Leishmania* foi capaz de bloquear o efeito patogênico da bactéria *Serratia marcescens* em *L. longipalpis* (Sant'Anna et al. 2014), sugerindo uma interação mutuamente benéfica entre o inseto e *Leishmania*. Além disso, foi visto que espécies bacterianas que infectam flebotomíneos podem mudar dependendo das condições do microambiente, incluindo a alimentação com açúcar e sangue. Essas mudanças na microbiota natural podem interferir no desenvolvimento da *Leishmania* (Telleria et al. 2018).

Para investigar se bactérias têm efeito na via JAK-STAT e no desenvolvimento do parasita, avaliamos a expressão dos genes 16S de bactéria e actina de *L. i. chagasi* nos insetos infectados. A expressão de 16S em *L. longipalpis* mostrou uma tendência a menor quantidade de bactérias nos insetos infectados, exceto em 72h. Esses resultados são preliminares (n=2), entretanto, podem indicar que o parasita pode ser capaz de reprimir o crescimento de bactérias do inseto para o estabelecimento da infecção. Contudo, sabe-se que um conteúdo microbiano específico é vital para que os parasitas sobrevivam e realizem a metaciclogênese (Kelly *et al.* 2017) o que pode explicar a expressão ligeiramente aumentada (não significativa) de 16S nos insetos infectados em 72h, horário em que ocorre a digestão no tubo digestivo do inseto e do primeiro contato da *Leishmania* com o epitélio intestinal (Bates 2008, Kamhawi 2006). A expressão de actina de *Leishmania* mostrou o que perfil de expressão do gene segue o padrão de infecções realizadas em nosso grupo, observadas pelo aumento significativo em 48h e a diminuição em 72h indicando que a *L. i. chagasi* foi capaz de estabelecer a infecção nos insetos. Sabe-se que após a alimentação sanguínea as *Leshmanias* procíclicas se multiplicam intensamente nas primeiras 48 horas. Nesse período ocorre o processo digestivo e também a formação da matriz peritrófica, uma estrutura quitinosa ao redor do bolo alimentar (Lehane *et al* 2005). Em 72h a matriz peritrófica é degradada e o bolo fecal começa a ser excretado, juntamente com alguns parasitas. Ainda que em menor número, outra parte dos parasitas se ancora às microvilosidades do epitélio intestinal através do flagelo, mantendo assim o primeiro contato direto com o inseto vetor. Em seguida, eles se diferenciam nas formas metacíclicas, (Pimenta *et. al.* 1992). Essas se desprendem do epitélio, e migram para região anterior do intestino médio, dando continuidade ao ciclo (Bates, 2007).

Os resultados obtidos anteriormente abriram um precedente para investigar se haveria alguma interferência das bactérias do tubo digestivo nas respostas mediadas pela via JAK-STAT. Os resultados ainda preliminares mostraram que, através da avaliação da expressão dos genes de interesse em insetos tratados com antibióticos, foram vistas diferenças na expressão dos

genes nos insetos alimentados com antibióticos, mostrando que a via parece não ter a sua atividade influenciada pela microbiota do inseto durante a infecção. Entretanto, a expressão gênica de atacina nos insetos tratados com antibióticos foi ligeiramente menor do que no grupo controle, indicando um provável papel de atacina no controle da infecção bacteriana em *L. longipalpis*, que pode estar sendo controlada também pela atividade de outras vias de imunidade como Toll e IMD (Hoffmann *et al.* 2003).

Essa é a primeira vez que as respostas mediadas pela via JAK-STAT foram investigadas em *L. longipalpis*. Mais estudos de caracterização com identificação de outros componentes talvez sejam necessários para investigar mais a fundo o envolvimento da via durante o processo. Contudo, os resultados obtidos até o momento indicam que a via JAK-STAT pode ter um papel importante e específico para o estabelecimento da infecção por *L. i. chagasi* e a atividade da via parece ser reprimida pelo parasita tanto em células LL5 quanto em fêmeas de *L. longipalpis*.

6 CONCLUSÕES

Células LL5 de *Lutzomyia longipalpis*

- A via JAK-STAT tem sua atividade reprimida em células LL5 após o silenciamento de PIAS, provavelmente pela ação do repressor PTP;
- A via JAK-STAT é reprimida pela infecção por *L. i. chagasi*, com a redução da expressão do genes efetor VIR-1;
- O desafio por *L. i. chagasi* induz a expressão da SHP-1 nas células embrionárias;

Fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

- A via JAK-STAT é inativada durante a infecção por *L. i. chagasi*, sugerindo uma possível modulação da via pelo parasita;
- A quantidade de bactérias têm uma tendência de ser maior nos insetos infectados por *L. i. chagasi* 72h após infecção importante para o estabelecimento da infecção;
- As bactérias de fêmeas de *L. longipalpis* parece não interferir nas respostas mediadas pela via JAK-STAT.

7 Referências Bibliográficas

1. Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B, Perrimon N. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 2003;5:441–450.
2. Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay and D. Sereno (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." *PLoS Negl Trop Dis* 10(3): e0004349.
3. Aleman-Muench, G. R. and G. Soldevila (2012). "When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity." *Immunol Cell Biol* 90(2): 137-148.
4. Alkan, C.; Zapata, S.; Bichaud, L.; Moureau, G.; Lemey, P.; Firth, A.E.; Gritsun, T.S.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X.; Depaquit, J.; et al. Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. *J. Virol.* 2015, 89, 11773–11785.
5. Azambuja, P, Garcia, ES and Ratcliffe, NA (2005) Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology*
6. Bahia, A. C., Kubota, M. S., Tempone, A. J., Araujo, H. R., Guedes, B. A., Orfano, A. S., Tadei, W. P., Rios-Velasquez, C. M., Han, Y. S., Secundino, N. F., Barillas-Mury, C., Pimenta, P. F. & Traub-Cseko, Y. M. 2011. The JAK-STAT pathway controls *plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection. *Plos Negl Trop Dis*, 5, E1317.
7. Barletta AB, Silva MC, Sorgine MH. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasit Vectors*. 2012 Jul 24;5:148. doi: 10.1186/1756-3305-5-148.
8. Bates, P. A. (2008). "*Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges." *Curr Opin Microbiol* 11(4): 340-344.
9. Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-106.

10. Beier , MS , Pumpuni , CB , Beier , JC e Davis , JR (1994) Efeitos do ácido para-aminobenzóico, insulina e gentamicina no desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em mosquitos anofelíneos (Diptera: Culicidae) . *Journal of Medical Entomology* **31** , 561 - 565 .
11. Bello, F. J., A. J. Mejia, P. Corena Mdel, M. Ayala, L. Sarmiento, C. Zuniga and M. T. Palau (2005). "Experimental infection of *Leishmania* (L.) chagasi in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(6): 519-525.
12. Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3737-44.
13. Boutros, M., Agaisse, H. and Perrimon, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2002;3, 711-722.
14. Brazil, R.P.; Brazil, B.G.. *Biologia de Flebotómíneos Neotropicais*. In: Rangel, EF; Lainson, R. *Flebotómíneos do Brasil*. 1ª Ed. FIOCRUZ, 2003, p.257-270.
15. Caceres, A. G. Distribucion geografica de *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector de la batonellosis humana en el Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 35, n. 6, p. 485-490, 1993.
16. CDC, 2007 em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>
17. Chen, Q., Giedt, M., Tang, L. & Harrison, D. A. 2014. Tools and methods for studying the *drosophila* jak/stat pathway. *Methods*, 68, 160-72.
18. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 2004 Apr;198:127-48.
19. Cortes, L. M., R. M. Silva, B. A. Pereira, C. Guerra, A. C. Zapata, F. J. Bello, L. C. Finkelstein, M. F. Madeira, R. P. Brazil, S. Corte-Real and C. R. Alves (2011). "Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis*

- (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction." *Parasit Vectors* 4: 216.
20. Deane LM, Deane MP. Isolation of *Leishmania* e in the viscera and the skin of a fox in the kala-azar endemic zone in Sobral, Ceara. *Hospital (Rio J)*. 1954 Apr;45(4):419-21.
21. Deane LM, Deane MP. Natural infection of *Phlebotomus longipalpis* by *Leptomonas*, probably *Leishmania donovani*, in a focus of kala-azar in Ceara. *Hospital (Rio J)*. 1954 Jun;45(6):697-702.
22. Deane LM, Deane MP. Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em uma zona endêmica do Estado do Ceará. I. distribuição, predominância e variação estacional. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, n. 15, v. 1, p. 83-95, abr. 1955.
23. Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail MA, Rogers ME, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Lehane MJ, Bates PA. Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics*. 2006 Dec;88(6):831-40.
24. Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, Kafatos FC: Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:8814-8819.
25. Dong, Y, Aguilar, R, Xi, Z, Warr, E, Mongin, E and Dimopoulos, G (2006) *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *Plos Pathogens* 2, e52.
26. dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998 Jul;12(3):315-7.
27. Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*. 2005 Sep;6(9):946-53.

28. Drier EA, Huang LH, Steward R. Nuclear import of the *Drosophila* Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes & development*. 1999; v.13, n. 5, p. 556-568.
29. Dziarski R, Gupta D: The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol* 2006, 7:232.
30. Goto, A., Yano, T., Terashima, J., Iwashita, S., Oshima, Y. & Kurata, S. 2010. Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial listericin by peptidoglycan recognition protein LE and the JAK-STAT pathway. *J Biol Chem*, 285, 15731-8.
31. Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SM: Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol* 2008, v. 37, n. 5, p. 597–601.
32. Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol*. 1996 Feb;8(1):8-13.
33. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):121-6.
34. Hoffmann, JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):33-8.
35. Huang, Z., Kingsolver, M. B., Avadhanula, V. & Hardy, R. W. 2013. An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. *J Virol*, 87, 4272-80.
36. Hultmark 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol*. 2003 Feb;15(1):12-9.
37. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):439-45. Epub 2006 Jul 14.
38. Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, Kirby JR, Valenzuela JG, Kamhawi S, Wilson ME. 2017. *MBio*. 8. 1. 1121-16
39. Kleino A, Valanne S, Ulvila J, Kallio J, Myllymaki H, Enwald H, Stoven S, Poidevin M, Ueda R, Hultmark D, Lemaitre B, Ramet M. Inhibitor of

- apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *EMBO J.* 2005 Oct 5;24(19):3423-34.
40. Kounatidis, I. & Ligoxygakis, P. 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol*, 2, 120075.
41. Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987 Jul-Sep;82(3):421-4.
42. Lainson, R. and E. F. Rangel (2005). "Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(8): 811-827.
43. Lehane Mj. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.* 1997; V. 42, P. 525-5250.
44. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:697-743.
45. Louradour, I, Monteiro, CC, Inbar, E, Ghosh, K, Merkhofer, R, Lawyer, P, Paun, A, Smelkinson, M, Secundino, N, Lewis, M, Erram, D, Zurek, Land Sacks, D (2017) The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cell Microbiology* **19**, e12755, doi: 10.1111/cmi.12755.
46. Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., and Rosenberg. 1998. *R.Proc. Natl. Acad. Sci.* The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. 95, 5700–5705
47. Luo H, Dearolf CR. The JAK/STAT pathway and *Drosophila* development. *Bioessays* 2001;23:1138–1147.
48. Lutz, A. & Neiva, A. – Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. O. Cruz*, 4:84-95, 1912.
49. Maco V, Maguina C, Tirado A, Maco V, Vidal JE. Carrion's disease (Bartonellosis bacilliformis) confirmed by histopathology in the High Forest of Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004 May-Jun;46(3):171-4.

50. Medzhitov e Janeway, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
51. Michel T, Reichhart J-M, Hoffmann JA, Royet J: *Drosophila* Toll is activated by Gram positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2001, 414:756-759.
52. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose. Biblioteca Virtual em Saúde, setembro/2007. Disponível em:
<<http://bvsms.saude.gov.br/html/pt/dicas/126leishmaniose.html>>
53. Moon AE, Walker AJ, Goodbourn S: Regulation of transcription of the *Aedes albopictus* cecropin A1 gene: A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011, v. 41, p. 628-636.
54. Nappi AJ, Vass E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res*. 1993 Jun;6(3):117-26.
55. Neves, D. P., A. L. Melo, P. M. Linardi and R. W. A. Vitor (2007). *Parasitologia Humana*, Biblioteca Biomédica.
56. Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stagespecific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 1992 Jun 26;256(5065):1812-5.
57. Pimenta PFP, Secundino NFC, Nieves Blanco E. Interação da *Leishmania* - Hospedeiro Invertebrado. In: Elizabeth F. Rangel, Ralph Lainson. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. 01 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, v. , p. 275-289.
58. Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AMR, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko YM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania* infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics*. 2009 Sep;282(3):307-17. Epub 2009 Jun 30.
59. Pitaluga AN, Mason PW, Traub-Cseko YM. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(3):191-7.

60. Poinar GO, Ferro C, Morales A and Tesh RB. 1993. *Anandarema phlebotophaga* n. gen; n.sp. (Allantonematoda: Tylenchida), a new nematode parasite of phlebotomine sand flies (Psychodidae: Diptera) with notes on experimental infections of these insects with parasitic rhabditoids. *Fundam Appl Nematol* 16: 11-16.
61. Ramalho-Ortigao M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, Valenzuela JG. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania* major-infected sandflies. *BMC Genomics*. 2007 Aug 30;8(1):300 (B)
62. Ramalho-Ortigao, J. M., E. Saraiva and Y. M. Traub-Cseko (2010). "Sand Fly-*Leishmania* Interactions: Long Relationships are Not Necessarily Easy." *The Open Parasitology Journal* 4: 195 - 204.
63. Rey GJ, Ferro C, Bello FJ. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania* chagasi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; v. 95, p. 103-110.
64. Sacks, D. & Kamhawi, S. 2001. Molecular Aspects Of Parasite-Vector And Vector-Host Interactions In Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55, 453-83.
65. Sant'anna, M. R., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W. S., Cavalcante, R. R., Dillon, V. M., Bates, P. A., Genta, F. A. & Dillon, R. J. 2014. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit Vectors*, 7, 329.
66. Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9944-8.
67. Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci*. 1991 Aug 22;245(1313):121-6.

68. Schlein Y, Jacobson RL. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*. 1998 Nov;117 (Pt 5):467-73.
69. Secundino NF, Araújo MS, Oliveira GH, Massara CL, Carvalho OS, Lanfredi RM and Pimenta PF. 2002. Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. *J Invertebr Pathol* 80: 35-40.
70. Sharma, U. and S. Singh (2008). "Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control." *J Vector Borne Dis* 45(4): 255-272.
71. Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(1):69-72.
72. Shaw JJ. A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth choloepus hoffmanni, in panama. *Nature*. 1964 Jan 25;201:417-8.
73. Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Sep;75(3):301-30.
74. Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):23-8
75. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17841-6.
76. Tanji T, Hu X, Weber AN, Ip YT. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*. 2007;v. 27, n. 12, p. 4578-4588.
77. Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigao-Farias JR, de Araujo AP, Ramalho-Ortigao JM, Traub-Cseko YM. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2007 Oct;66(2):53-63.

78. Telleria EL, Sant'anna MR, Ortigão-Farias JR, Pitaluga AN, Dillon VM, Bates PA, Traub-Csekö YM, Dillon RJ. Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in the sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem. 2012 Feb 28.
79. Telleria, E. L., A. P. de Araujo, N. F. Secundino, C. M. d'Avila-Levy and Y. M. Traub-Cseko (2010). "Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*." PLoS One 5(5): e10697.
80. Telleria, E. L., M. R. Sant'Anna, M. O. Alkurbi, A. N. Pitaluga, R. J. Dillon and Y. M. Traub-Cseko (2013). "Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*." Parasit Vectors 6: 12.
81. Tesh RB, Modi GB (1983). Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses. J Med Entomol 20:199-202.
82. Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O. The coagulation of insect hemolymph. Cell Mol Life Sci. 2002 Feb;59(2):363-72.
83. TINOCO-NUNES, B. Caracterização de vias de imunidade em *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Rio de Janeiro, Brasil, p.103. 20014. (Dissertação (Mestrado))
84. Tinoco-Nunes, B., E. L. Telleria, M. da Silva-Neves, C. Marques, D. A. Azevedo-Brito, A. N. Pitaluga and Y. M. Traub-Cseko (2016). "The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*." Parasit Vectors 9: 222.
85. Warburg A. 1991. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. J Invertebr Pathol 58: 189-202
86. Welchman, DP, Aksoy, S, Jiggins, F and Lemaitre, B (2009) Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. *Cell Host & Microbe* 6, 107–114

87. WHO (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO: 211.
88. Young DG e Duncan MA. Guide to identification and geographic distribution of lutzomyia sandflies in mexico, the west indies central and south america (diptera, psychodidae). Memoirs of the american entomological institute, 54: 1-881, 1994.
89. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. Oncogene 2000;19:2598–2606.