

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

THAIS LEMOS DA SILVA

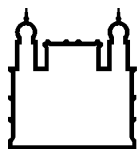
Estudo de genes de *Leishmania infantum chagasi* expressos durante a infecção em *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil

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

Orientadora: Dra. Yara Maria Traub Csekö

RIO DE JANEIRO

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

THAIS LEMOS DA SILVA

Estudo de genes de *Leishmania infantum chagasi* expressos durante a infecção em *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil

ORIENTADORA: Dra. Yara Maria Traub Csekö

Aprovada em: 14/09/2017

EXAMINADORES:

- Dr.** Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC/FIOCRUZ) - **Presidente**
- Dr.** José Roberto Meyer Fernandes (IBqM/UFRJ)
- Dra.** Ângela Hampshire de Carvalho Santos Lopes (IMPG/UFRJ)
- Dra.** Flávia Lima Ribeiro Gomes (IOC/FIOCRUZ)
- Dra.** Daniele Pereira de Castro (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 14 de setembro de 2017

Silva, Thais Lemos da.

Estudo de genes de *Leishmania infantum chagasi* expressos durante a infecção em *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil / Thais Lemos da Silva. - Rio de Janeiro, 2017.

71 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Yara Maria Traub Csekö.

Bibliografia: f. 64-71

1. *Leishmania infantum chagasi*. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Interação. I. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe
Eliseth, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois nEle que encontrei força e esperança de que tudo iria dar certo.

Aos meus familiares, que sempre me estimulam a continuar correndo atrás dos meus sonhos e são compreensivos quando estou mais ausente devido aos estudos.

Ao meu pai Aroldo, por ter depositado esperança em mim e estar me apoiando em tudo.

À minha mãe Eliseth, que tem sido a mulher mais forte do mundo. Sempre será o alicerce da minha vida. Agradeço todo cuidado e oração. Estou aqui motivada por toda garra que aprendi a ter com ela.

Aos meus irmãos Tiago, Matheus e Gabriel. Que apesar de eu ser muito exigente e brigona, serei eternamente grata por ter vocês na minha vida. Obrigada por tudo.

À minha orientadora Dra. Yara, que nem tenho palavras que descreveriam o tamanho da minha admiração e gratidão. Seu comprometimento e amor pela ciência me inspiram a cada dia a ser uma profissional melhor. Apoiou-me em tudo e sem ela nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Dr. Erich, que tenho imensa gratidão e carinho. Sempre muito atencioso e prestativo. Guardarei para sempre seus conselhos. Obrigada por toda ajuda e apoio.

Aos meus colaboradores Dr. Eduardo Caio e Dr. Valter.

A todos os professores e colegas da pós-graduação.

Às tias da limpeza dona Marisa e Sinara por todo carinho. Agradeço imensamente por cada palavra de incentivo e motivação.

À minha amiga Evelyn, que sempre me anima, mesmo quando estou cansada e triste. Obrigada por sempre estar presente quando eu mais preciso.

Às minhas amigas Fernanda, Karen e Luana que até mesmo a distância foi incapaz de nos separar. Sinto muita falta de estar com vocês diariamente, como na época da faculdade. Por whatsapp ou em raros encontros (temos que nos encontrar mais!) recebo todo apoio, carinho e me divirto muito com vocês. Apesar de tudo, nossa amizade se manteve inabalável.

À minha amiga Daisy, que além da sua amizade inestimável conseguiu me agraciar com honra de ser finalmente dinda. Agradeço imensamente por isso e estou muito ansiosa para conhecer meu afilhado ou afilhada, rs. Agradeço também por seu alfajor e brownie que já

salvou todos do laboratório na sobremesa do almoço e principalmente quando não tínhamos um lanche e estávamos trabalhando até mais tarde.

Ao “friend” Gabriel que me apoia em tudo. É o fantástico profissional da biologia molecular clássica e fotógrafo do laboratório.

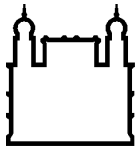
A todos os outros amigos da família LBMPV: Andrea, Bianca, Daiana, Daniel, David, Lívia, Lorena, Monique, Tatiana, Tempone e Violeta.

Aos membros da banca e à revisora por terem aceitado o convite.

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

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

(1 Coríntios 13:1-2)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

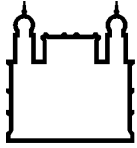
ESTUDO DE GENES DE *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI* EXPRESSOS DURANTE A INFECÇÃO EM *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*, PRINCIPAL VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thais Lemos da Silva

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos principalmente dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo. *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum chagasi* nas Américas. As Leishmanias são organismos digenéticos, com um ciclo de desenvolvimento em hospedeiros vertebrado e invertebrado. Apesar de alguns trabalhos descreverem moléculas de *Leishmania* que participam da interação com o inseto vetor, pouco se sabe sobre os genes do parasita expressos dentro do tubo digestivo do inseto. Nosso objetivo foi caracterizar genes expressos por *L. i. chagasi* durante a infecção em *L. longipalpis*. Neste sentido, investigamos genes do parasita que são potencialmente importantes para sobrevivência e estabelecimento da infecção no inseto. Para avaliar a expressão dos genes de interesse utilizamos amostras de insetos coletados em diversos horários subsequentes à infecção artificial e parasitas em fases de crescimento exponencial e estacionário do parasita crescido em meio de cultura. Através de PCR quantitativo obtivemos resultados de expressão de alguns genes envolvidos com: interação com o tubo digestivo do inseto como os genes codificantes para proteína flagelar FLAG1/SMP1 e quitinase; diferenciação e proliferação do parasita, como genes de transportadores de glicose (GTs), poliubiquitina, proteína pequena hidrofílica associada ao retículo endoplasmático (SHERP), proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (KMP-11), xantina fosforribosiltransferase (XPRT), aminoácido permease 3 (AAP3) e peroxirredoxina; e modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado, como os genes de caseína cinase 1 (CK1), fator de alongação 1-alfa (EF1-alfa) e glicoproteína 63 (GP63). Uma hora pós-infecção a *L. i. chagasi* expressa abundantemente FLAG1/SMP1, GTs, AAP3 e GP63; em 6h apenas EF1-alfa tem expressão aumentada; 72h pós-infecção, os genes GTs, SHERP, AAP3 e EF1-alfa são mais expressos; em 144h há aumento da expressão de poliubiquitina, SHERP, GP63 e do receptor de LDL (LDL-R); em 168h observamos o aumento da expressão de EF1-alfa e diminuição de XPRT. Além disso, investigamos o papel da microbiota do inseto na expressão dos genes do parasita. Com intuito de reduzir ou eliminar a microbiota, insetos foram infectados e tratados com antibiótico. Resultados preliminares mostram modulação principalmente de genes envolvidos com diferenciação, metabolismo de açúcar e aminoácidos. Avaliamos também o papel do LDL-R na infecção do inseto utilizando parasitas transfectadas que superexpressam o gene e observamos que não houve diferença. Nossos dados revelam interessantes aspectos da adaptação do parasita ao microambiente do intestino e preparação para infecção no hospedeiro vertebrado ainda dentro do inseto.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF GENES EXPRESSED BY *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI* DURING INFECTION IN *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*, THE MAIN VECTOR OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZIL

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION

Thais Lemos da Silva

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmission occurs through the bite of female sand flies, mainly from the genus *Phlebotomus* in the Old World, and *Lutzomyia* in the New World. *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum chagasi* in the Americas. *Leishmania* are digenetic organisms, with a life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. Although there is some information on *Leishmania* molecules that participate in the interaction with the insect vector, little is known about parasite genes expressed inside the insect gut. Our objective was to characterize genes expressed by *L. i. chagasi* during infection of *L. longipalpis*. In this sense, we investigated parasite genes that are potentially important for survival and establishment of insect infection. To evaluate the expression of the genes of interest, we used samples of insects collected at different times subsequent to artificial infection and culture medium grown parasites in exponential and stationary growth phases. Through quantitative PCR we obtained results on the expression of some genes involved with: interaction with the insect gut, as the genes coding for FLAG1 / SMP1 and chitinase; differentiation and proliferation of the parasite, as glucose transporter (GTs), polyubiquitin, small endoplasmic reticulum-associated hydrophilic protein (SHERP), kinetoplastídeo-11 membrane protein (KMP-11), xanthine phosphoribosyltransferase (XPRT), amino acid permease 3 (AAP3) and peroxiredoxin; and modulation of the vertebrate host immune response such as casein kinase 1 (CK1), elongation-1-alpha (EF1-alpha) and glycoprotein 63 (GP63). At 1h post-infection *L. i. chagasi* abundantly expresses FLAG1 / SMP1, GTs, AAP3 and GP63; In 6h only EF1-alpha has increased expression; 72h post-infection, the GTs, SHERP, AAP3 and EF1-a genes are more expressed; In 144h there is increased expression of polyubiquitin, SHERP, GP63 and the LDL receptor (LDL-R); In 168h we observed increased EF1-alpha and decreased XPRT expression. In addition, we investigated the role of the insect microbiota in the expression of parasite genes. In order to reduce or eliminate the microbiota, insects were infected and treated with antibiotics. Preliminary results indicate modulation mainly of genes involved with differentiation, sugar metabolism and amino acids. We also investigate the role of LDL-R in insect infection using mutant parasites that overexpress the gene and found no difference. Our data reveal interesting aspects of the adaptation of the parasite to the microenvironment of the vector intestine and preparation for infection in the vertebrate host still inside the insect.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RNA	Ácido ribonucleico
AAP3	Aminoácido permease 3
CK1	Caseína cinase 1
Ex.	Exemplo
EF1-alfa	Fator de alongação 1 alfa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GP63	Glicoproteína 63
°C	Graus celsius
h	Hora
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LPS	Lipopolissacarídeo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MP	Matriz peritrófica
LB	Meio luria-bertani
ml	Microlitro
mA	Miliampere (s)
ml	Mililitro
ng	Nanograma
nmoles	Nanomoles
Pag.	Página
pb	Pares de base
qPCR	PCR quantitativo
p/v	Peso/volume
%	Porcentagem
KMP-11	Proteína de membrana de kinetoplastídeos-11
FLAG1/SMP1	Proteína flagelar FLAG1/SMP1
SHERP	Proteína pequena hidrofílica associada ao retículo endoplasmático
CHIT	Quitinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
16S	RNA ribossomal 16S
RPM	Rotações por minuto
SHP-1	Tirosina fosfatase 1
GT1	Transportador de glicose 1

GT2	Transportador de glicose 2
GTC	Transportador de glicose 1, 2 e 3
UV	Ultravioleta
XPRT	Xantina fosforribosiltransferase

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
SUMÁRIO	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leishmanioses	14
1.2. Epidemiologia	15
1.3. Vetor	17
1.4. Parasita	18
1.5. Interação Parasita-Inseto	19
1.6. Interação Inseto-Microbiota-Parasita	24
1.7. Receptor de LDL	25
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Insetos e parasitas	27
3.2. Coleta de parasitas	27
3.3. Infecção dos insetos com <i>Leishmania</i>	27
3.4. Tratamento com antibióticos e infecção com <i>Leishmania</i>	28
3.5. Análise da eficácia do tratamento com antibiótico	29
3.6. Ensaio com parasitas transfectadas na ausência de pressão seletiva por antibiótico	29
3.7. Extração de RNA	29
3.8. Tratamento do RNA total extraído com DNase	30
3.9. Síntese de cDNA	30
3.10. Lista de iniciadores oligonucleotídicos	31
3.11. Análise da expressão por PCR quantitativo (qPCR)	32
3.12. Análise de agrupamentos de genes por perfil de expressão em insetos tratados com antibiótico	32
3.13. Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Infecção de <i>L. longipalpis</i> por <i>L. i. chagasi</i>	33
4.2. Genes envolvidos na interação com o tubo digestivo do inseto	34

4.2.1.	Quitinase	34
4.2.2.	FLAG/SMP1	35
4.3.	Genes envolvidos com a diferenciação e proliferação do parasita	36
4.3.1.	Transportador de glicose	36
4.3.2.	AAP3	38
4.3.3.	SHERP	39
4.3.4.	KMP-11	40
4.3.5.	XPRT	41
4.3.6.	Poliubiquitina	42
4.3.7.	Peroxirredoxina	43
4.4.	Genes envolvidos na modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado.....	44
4.4.1.	CK1.....	44
4.4.2.	EF1- α	45
4.4.3.	GP63	46
4.5.	Infecção com tratamento com antibiótico	47
4.5.1.	Tratamento com antibiótico	47
4.5.2.	Expressão de genes de <i>Leishmania</i> em insetos tratados com antibiótico	49
4.6.	<i>Leishmania</i> transfectada que superexpressa LDL-R	51
4.6.1.	Expressão de LDL-R durante a infecção no inseto	51
4.6.2.	Perfil de expressão de LDL-R em parasitas transfectadas	52
	Infecção de <i>L. longipalpis</i> com <i>Leishmania</i> transfectada que superexpressa o gene LDL-R	54
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÕES.....	63
7.	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses com ampla distribuição nas áreas tropicais e subtropicais do planeta causando sérios problemas de saúde pública. Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* que, de acordo com sua espécie e estado imunológico do hospedeiro, podem produzir três diferentes manifestações clínicas: cutânea, mucocutânea ou visceral (Ministério da Saúde 2014, PAHO 2014, WHO 2017).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais frequente da doença. É comumente caracterizada por lesões cutâneas de diversos aspectos, tamanhos variados, e atingindo principalmente as áreas do corpo que ficam expostas, tais como face, braços e pernas. Apresenta-se sob as formas localizada, disseminada, e difusa (Ministério da Saúde 2007, PAHO 2014, WHO 2017).

A leishmaniose mucocutânea (LM), apresenta lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, e mais raramente, em pacientes com imunossupressão severa, podem atingir a mucosa de órgãos genitais e ânus ou as conjuntivas oculares. Acredita-se que a forma mucocutânea seja a evolução clínica por disseminação hematogênica ou linfática da forma cutânea. Apresenta-se sob as formas tardias, de origem indeterminada, concomitante, contígua e primária (Ministério da Saúde 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave devido à possibilidade de levar à morte em 90% dos casos, se não tratada. Apresenta características clínicas, em estágios tardios da evolução da doença, como febre e hepatoesplenomegalia (Ministério da Saúde 2014, PAHO 2014, WHO 2017).

1.2. Epidemiologia

As leishmanioses são consideradas endêmicas nos cinco continentes. Atualmente podemos estimar um número de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos e 70.000 mortes anualmente, além de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção no mundo (Torres-Guerrero *et al.* 2017, WHO 2017).

A LC é a forma mais disseminada da doença estando presente em 18 países das Américas (PAHO 2014). Anualmente, são distribuídos de 700 mil a 1,2 milhões de casos de LC no mundo. O Brasil está entre os 10 países que representam cerca de 75% dos casos anuais de LC (Alvar *et al.* 2012).

A LM na América do Sul e em áreas endêmicas surge aproximadamente 5 anos após cura clínica de uma lesão causada por LC, em 1 a 10% dos pacientes. Dados mostram que 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Peru e Brasil (Torres-Guerrero *et al.* 2017, WHO 2017).

Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorram anualmente no mundo (Figura 1), sendo que mais de 90% dos novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (Alvar *et al.* 2012, WHO 2017).

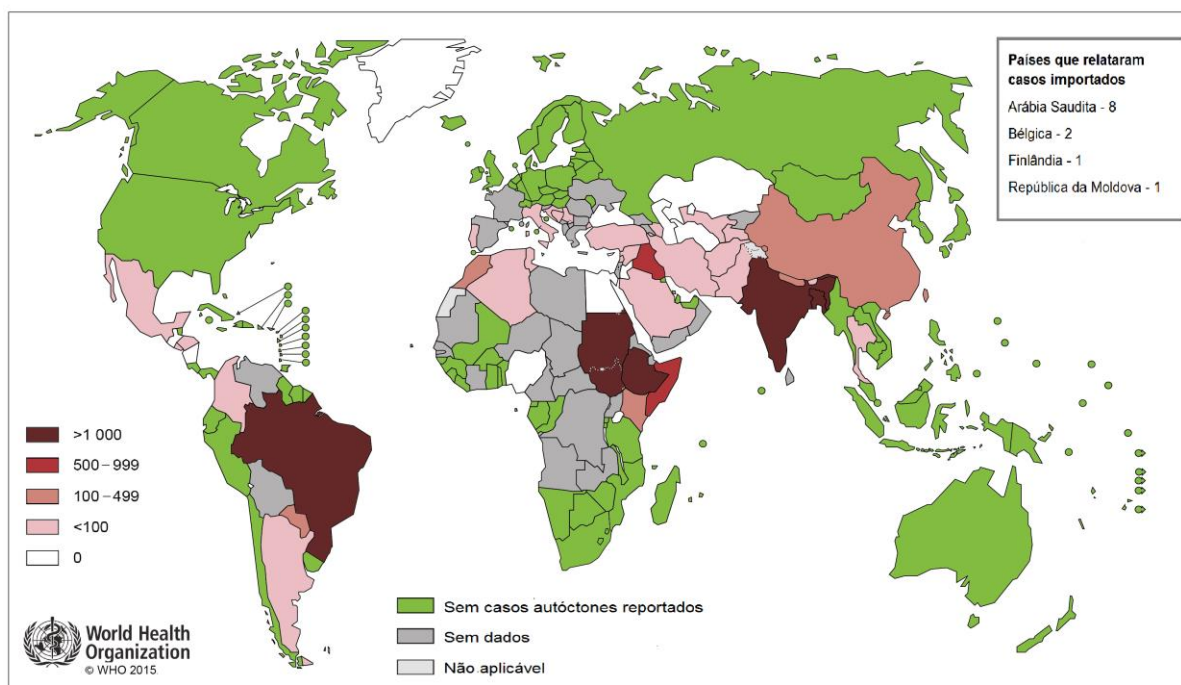


Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Visceral: Mapa Mundi representando os países em cores de acordo com o número de casos clínicos (Adaptado de WHO 2017)

Na América Latina a LV possui ampla distribuição de casos, se estendendo do sul do México ao norte da Argentina (Lainson e Rangel 2005). Em 2012 foram notificados 3.231 casos, sendo 96,5% (3.118 casos) concentrados no Brasil (Figura 2) (PAHO 2014).

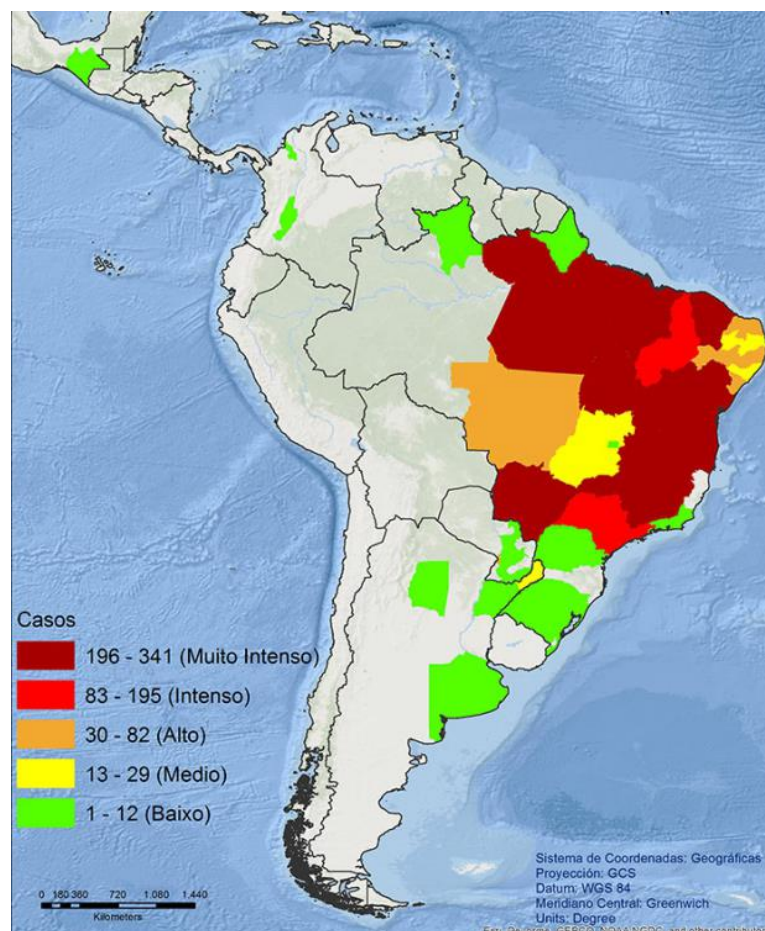


Figura 2. Distribuição de casos de Leishmaniose Visceral nas Américas em 2012: Mapa das Américas representando as regiões em cores de acordo com a intensidade de casos clínicos (PAHO 2014).

1.3. Vetor

A propagação da leishmaniose ocorre por disseminação vetorial através de fêmeas de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva 1912) é encontrado no continente americano e é o principal vetor da leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum chagasi* (Lainson e Rangel 2005, Alvar *et al.* 2012, Bates *et al.* 2015, WHO 2017).

Flebotomíneos são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa e seu desenvolvimento compreende os estágios: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas realizam postura em solos úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica em decomposição que servirá como fonte de alimento para as larvas após a eclosão dos ovos. Possuem quatro instares larvais, nomeados L1, L2, L3 e L4 (Brazil 2003). A forma L4 cessa sua alimentação e esvazia seu tubo digestivo onde entra na fase imóvel denominada pupa, que é seguida pela metamorfose que resulta no inseto adulto. A Figura 3 representa as formas de desenvolvimento de *L. longipalpis*.



Figura 3. Formas de desenvolvimento de *L. longipalpis*. 1: Ovo; 2-5: Larva (L1, L2, L3 e L4 respectivamente); 6: Pupa; 7: Adulto (fêmea). Foto de Gabriel Negreira.

Os flebotomíneos adultos se alimentam de fontes naturais de açúcar, como seivas vegetais e néctar, porém apenas as fêmeas são hematófagas, devido à necessidade de ingestão de sangue para ovogênese (Killick-Kendrick 1999). Ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, o inseto ingere as formas amastigotas de *Leishmania* (Kamhawi 2006).

1.4. Parasita

Leishmania pertence à ordem *Kinetoplastidae* (Honigberg 1963). Estes parasitas são organismos unicelulares e digenéticos, possuindo ciclo de vida na forma intracelular aflagelada (amastigota) em hospedeiros vertebrados, e extracelular flagelada (promastigota) nos hospedeiros invertebrados, Figura 4 (Lainson 2010).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas realizam repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingerem macrófagos parasitados. No tubo digestivo do vetor estes macrófagos se rompem e liberam os parasitas, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, passam por sucessivas divisões binárias e posteriormente outras formas intermediárias se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o inseto infectado transmite *Leishmania* para um novo hospedeiro (Sacks e Kamhawi 2001, Bates *et al.* 2015).

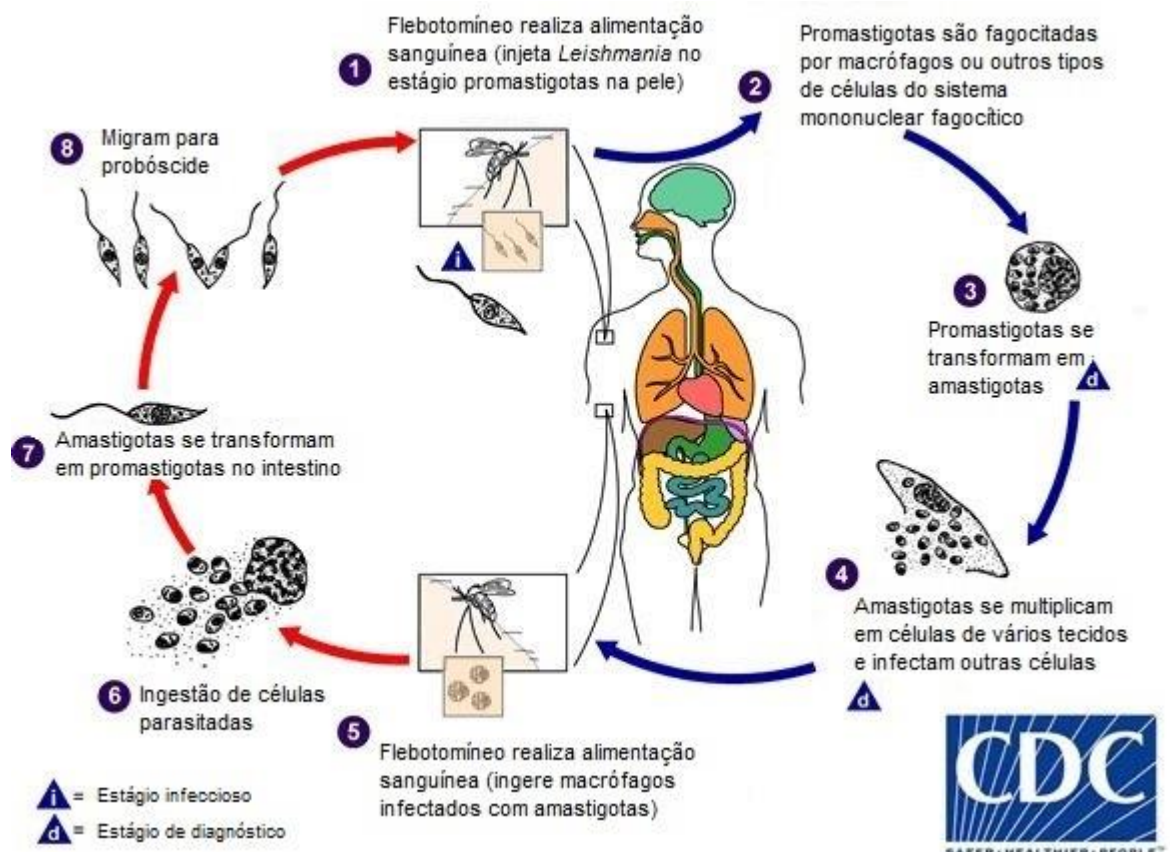


Figura 4. Ciclo da Leishmaniose:–Hospedeiro vertebrado: Os estágios 2, 3 e 4 representam o ciclo que ocorre no hospedeiro vertebrado com formas amastigotas de *Leishmania* internalizadas em células fagocíticas e ruptura de células infectadas. Hospedeiro invertebrado: Os estágios 5, 6, 7, 8 e 1 representam o ciclo que ocorre no hospedeiro invertebrado com formas amastigotas sendo liberadas e formas flageladas que se diferenciam e se multiplicam dentro do tubo digestivo do inseto (Adaptado de CDC 2013).

1.5. Interação Parasita-Inseto

A interação parasita-inseto inicia quando as fêmeas realizam repasto sanguíneo e ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. Na luz do tubo digestivo do vetor estes macrófagos se rompem e liberam os parasitas que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, que possuem movimentação lenta e flagelo curto. Essas formas passam por sucessivas divisões binárias no período de 24 a 48 horas. Durante 48 a 72 horas ocorre a transformação para formas mais alongadas e altamente móveis denominadas nectomonas. No momento que coincide com a degradação da matriz peritrófica, 72 horas, ocorre a migração dessas formas para parte anterior do intestino médio abdominal do inseto. A partir deste momento, a forma nectomona é capaz de ancorar seu flagelo nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio abdominal, como já observado em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Posteriormente, 4 a 7 dias, as nectomonas dão origem à forma leptomona que passa por uma segunda etapa de proliferação do parasita no tubo digestivo do inseto. Por fim, 5 a 7 dias, duas formas são encontradas colonizando a região da válvula do estomodeu: haptomonas e metacíclicas. Haptomonas possuem flagelo curto e imóvel e formam um plugue na válvula do estomodeu. As *Leishmanias* metacíclicas são formas livres infectantes, com flagelo longo e altamente ativo. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o inseto infectado transmite o parasita para um novo hospedeiro através da regurgitação das formas metacíclicas (Figura 5) (Kamhawi 2006).

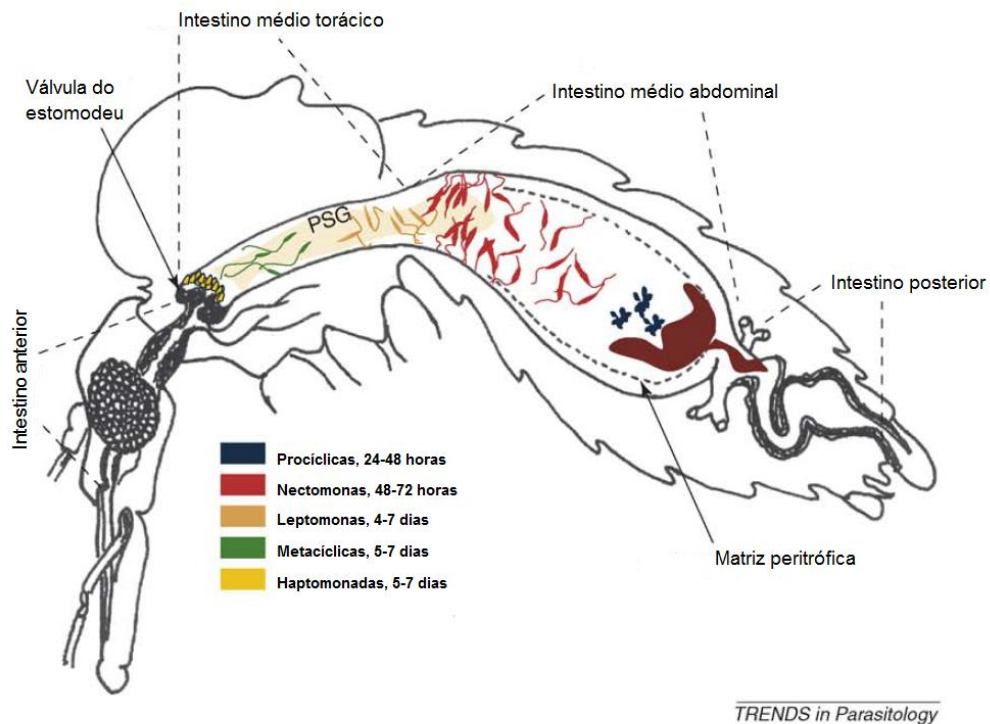


Figura 6. Desenvolvimento de *Leishmania* dentro do tubo digestivo de flebotomíneos: Desenho esquemático em corte longitudinal do inseto indicando estruturas do exoesqueleto e tubo digestivo. Dentro do tubo digestivo as formas de desenvolvimento de *Leishmania* estão representadas em cores de acordo com a morfologia e tempo de desenvolvimento no inseto. O período de cada fase está correlacionado com cores (Adaptado de Kamhawi 2006).

O sucesso na infecção no hospedeiro invertebrado se deve a diversos fatores. Dentre eles, a capacidade do parasita de sobreviver à atividade de enzimas digestivas e de interagir com a parede epitelial do intestino para não ser eliminado ao final da digestão (Pimenta *et al.* 1997, Schlein e Jacobson 1998, Ramalho-Ortigao *et al.* 2010). Neste sentido, sabe-se que no vetor estrito do Velho Mundo *Phlebotomus papatasi* o lipofosfoglicano (LPG) e a proteína flagelar FLAG1/SMP1 de *Leishmania* tem papel de adesão ao lúmen do tubo digestivo do inseto (Sacks e Kamhawi 2001, Di-Blasi *et al.* 2015).

O parasita expressa moléculas responsáveis pelo sucesso da infecção. Entre estas está uma quitinase, que é responsável por causar dano à válvula do estomodeu, facilitando assim a transmissão dos parasitas durante a alimentação sanguínea por regurgitação (Rogers *et al.* 2008).

Outra barreira limitante no processo de infecção do parasita é o estresse oxidativo gerado durante a digestão sanguínea (Graca-Souza *et al.* 2006) e a imunidade do inseto (Sacks e Kamhawi 2001, Telleria *et al.* 2012, Telleria *et al.* 2013).

Os insetos possuem três principais vias de resposta imune inata: Toll, IMD e Jak-STAT. (Lemaitre *et al.* 1997, Saraiva *et al.* 2016). A ativação dessas vias culmina na expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e outras moléculas efetoras contra o patógeno.

Pouco se sabe sobre a imunidade de flebotomíneos. Telleria *et al.* (2012) silenciaram por RNAi o gene caspar repressor da via imunológica IMD de *L. longipalpis*, infectaram o inseto com *Leishmania*, e observaram uma redução da carga parasitária ao longo da infecção. Interessantemente, também foi mostrado que a linhagem celular LL5 de *L. longipalpis* possui as vias imunes Toll e IMD ativas e responsivas a desafios por bactérias, fungos e *L. i. chagasi* (Tinoco-Nunes *et al.* 2016). Além disso, é sabido que a infecção por *Leishmania* no inseto é capaz de modular seu sistema imune, onde foi vista redução da expressão de uma AMP (defensina) pela infecção (Telleria *et al.* 2013). Sendo assim, apesar das inúmeras barreiras a *Leishmania* desenvolveu mecanismos para enfrentá-las.

A proteína GP63 é importante na proteção do parasita à resposta imune do hospedeiro vertebrado (Olivier *et al.* 2012). GP63 é uma metaloprotease que interage com proteínas tirosinas fosfatases, dentre elas a tirosina fosfatase 1 (SHP-1) do macrófago que age como repressor da via Toll e Jak/STAT, imunossuprimindo o hospedeiro (Blanchette *et al.* 1999). Nosso grupo identificou um homólogo de SHP-1 em *L. longipalpis* que aparentemente é modulada pela GP63 de *Leishmania* (Tinoco-Nunes 2014). Curiosamente, EF1- α , uma GTPase envolvida na regulação polipeptídica de alongamento durante a tradução, também está relacionado com a ligação e ativação de SHP-1 de macrófagos (Nandan *et al.* 2002, Nandan *et al.* 2003). Contra o estresse oxidativo o parasita possui diversas moléculas importantes atuando na desintoxicação, dentre elas a peroxirredoxina (Castro *et al.* 2002, da Fonseca Pires *et al.* 2014).

Além disso, em todos os momentos o parasita necessita suprir suas necessidades nutricionais a partir do ambiente utilizando, por exemplo, moléculas responsáveis pela captação de hexoses, como os transportadores de glicose GT1, GT2 e GT3, de purinas, tais como a xantina fosforribosiltransferase (XPRT) (Landfear 2011, Boitz e Ullman 2013) ou de aminoácidos como o AAP3 (Landfear 2011).

Leishmania codifica três transportadores de glicose, nomeados GT1, GT2 e GT3. Estes são essenciais para o metabolismo energético, e recentemente uma função sensorial foi

atribuída ao GT1 na detecção da disponibilidade de hexoses no ambiente (Rodríguez-Contreras *et al.* 2015).

A aminoácido permease 3 (AAP3) é um transportador de arginina, um aminoácido essencial para o parasita (Landfear 2011).

Além disso, *Leishmania* é incapaz de realizar síntese *de novo* de purinas e por esta razão necessita captar purinas do hospedeiro. Assim o parasita é capaz de adquirir e processar essas purinas através da via de salvação de purinas (Boitz e Ullman 2013). A xantina fosforribosiltransferase (XPRT) é essencial nesta via (Jardim *et al.* 1999, Boitz e Ullman 2006).

O protozoário possui moléculas que participam no seu processo de diferenciação e proliferação e algumas também estão associados à virulência do parasita, tais como a poliubiquitina, proteína pequena hidrofílica associada ao retículo endoplasmático (SHERP), proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (KMP-11), e a caseína cinase 1 (CK1) (Matos *et al.* 2010, Sadlova *et al.* 2010, Dan-Goor *et al.* 2013, Munoz *et al.* 2015).

O sistema ubiquitina-proteassoma é essencial em eucariotos para controle de qualidade de proteínas e também atua em outros diversos processos biológicos, como progressão do ciclo celular, transdução de sinal, resposta imunológica, entre outros. Em protozoários sua função não é totalmente esclarecida, mas sabe-se da sua importância na proliferação e diferenciação celular (Munoz *et al.* 2015).

SHERP tem expressão aumentada em formas metacíclicas de *Leishmania* (Sadlova *et al.* 2010). Recentemente teve seu papel funcional descrito, possuindo importância nos processos de diferenciação, transmissão e virulência do parasita no hospedeiro invertebrado (Doehl *et al.* 2017).

KMP-11 de *Leishmania* é encontrada em associação com as estruturas de membrana, tais como a superfície da célula, bolsa flagelar e vesículas intracelulares. Sabe-se que ao nível proteico esse gene é mais expresso em formas promastigotas metacíclicas e amastigotas. Além disso, essa proteína é também identificada como um fator de virulência, pois foi demonstrada sua capacidade de estimular o sistema imune do hospedeiro vertebrado (Matos *et al.* 2010, Lacerda *et al.* 2012).

CK1 em eucariotos possui importante papel em vias de sinalização, como na diferenciação e proliferação celular. Em *Leishmania* possui papel no crescimento e virulência do parasita (Dan-Goor *et al.* 2013).

Inbar *et al.* (2017) realizaram um transcriptoma de *P. duboscqi* infectado com *L. major*, par natural causador de LC no Velho Mundo. Analisaram diferentes tempos pós-

infecção, onde viram a dinâmica de expressão gênica de três estágios do parasita no inseto: procíclica, nectomona e metacíclica. Viram a modulação de genes envolvidos com regulação da expressão gênica, sinalização celular, metabolismo de aminoácidos e biossíntese de moléculas de superfície.

1.6. Interação Inseto-Microbiota-Parasita

A metaciclogênese é o evento de diferenciação durante o estabelecimento da infecção no inseto que culmina em formas metacíclicas, que são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado e prosseguir com o ciclo de vida do parasita. O desenvolvimento das formas metacíclicas ocorre no tubo digestivo do inseto, que contém também outros microrganismos, tais como bactérias.

Sant'Anna *et al.* (2014) viram que a presença de *Leishmania* bloqueia o efeito letal da bactéria *Serratia marcescens* em *L. longipalpis*. Além disso, Kelly *et al.* (2017) demonstraram que a diminuição da microbiota do inseto por tratamento com antibióticos bloqueia o crescimento e metaciclogênese dos parasitas.

Em outro trabalho recentemente publicado, Louradour *et al.* (2017) analisaram o papel da microbiota no processo de infecção no par *P. duboscqi* e *L. major* e também viram que a ausência de bactérias impede o desenvolvimento de formas metacíclicas do parasita. Além disso, este trabalho sugere que este efeito observado ocorre devido a exposição dos parasitas a alta concentração de açúcar na parte anterior do tubo digestivo. Isso devido a ausência da microbiota para consumi-la gerando um ambiente osmótico letal para os parasitas.

Esses dados em conjunto mostram que a microbiota pode ter um papel na infecção pela *Leishmania*.

1.7. Receptor de LDL

Leishmania não realiza síntese *de novo* de colesterol portanto o parasita obtém este lipídio do ambiente. A lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* /LDL) é a principal fonte de esteróis e fosfolipídios para o parasita, sendo captado do hospedeiro vertebrado via receptor de LDL (LDL-R) (Soares e de Souza 1991, Coppens e Courtoy 2000, Andrade-Neto *et al.* 2011, Uttaro 2014).

O LDL-R possui estrutura conservada entre os protozoários da ordem kinetoplastidae (Bastin *et al.* 1996). Tem importante papel na captação de esteróis que são necessários para crescimento e diferenciação do parasita (Dixon *et al.* 1971, Dixon *et al.* 1972, Roberts *et al.* 2003). Além disso, sabe-se que o parasita interage com microdomínios de colesterol da membrana plasmática do macrófago durante sua internalização (Pucadyil *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2016).

Não se sabe o papel do LDL-R no processo de infecção do hospedeiro invertebrado. Existem diferentes formas de analisar a importância de um gene de interesse no organismo de estudo. Dentre essas formas, destacam-se as manipulações genéticas de deleção, subexpressão ou superexpressão do gene alvo. Após isso, podem-se observar os efeitos fenotípicos gerados e inferir o papel funcional do gene (Cortazar e Walker 2004).

Ainda existem inúmeras lacunas sobre como a *Leishmania* reage aos diversos desafios durante processo de infecção do hospedeiro invertebrado. O presente trabalho visa agregar informações sobre genes expressos pela *Leishmania* ao longo do processo de infecção em *L. longipalpis*, contribuindo para melhor entendimento do complexo equilíbrio entre o parasita e seu vetor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a expressão de genes de *L. i. chagasi* durante o processo de infecção em *L. longipalpis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Eleger a partir da literatura genes candidatos ao estudo de expressão gênica envolvidos na interação com o tubo digestivo do inseto, diferenciação e proliferação do parasita, e na modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado;
- Estudar a expressão de genes de interesse de *L. i. chagasi* por qPCR (FLAG1/SMP1, quitinase, transportadores de glicose, poliubiquitina, SHERP, KMP-11, XPRT, AAP3, peroxirredoxina, CK1, EF1- α , GP63 e LDL-R) durante o processo de infecção em *L. longipalpis*;
- Estudar a expressão de genes de *L. i. chagasi* (FLAG1/SMP1, quitinase, transportadores de glicose, poliubiquitina, SHERP, KMP-11, XPRT, AAP3, peroxirredoxina, EF1- α , GP63 e LDL-R) em fases de desenvolvimento exponencial e estacionário do parasita crescido em meio de cultura;
- Verificar o papel da microbiota bacteriana do inseto na expressão gênica da *L. i. chagasi* no hospedeiro invertebrado;
- Utilizar *Leishmania* transfectada que superexpressa o gene LDL-R para investigar seu papel na infecção do hospedeiro invertebrado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos e parasitas

Foram utilizados insetos provenientes de nossa colônia de *L. longipalpis* originalmente coletados em Jacobina (Bahia, Brasil), e mantidos a 26°C com variação de 1°C e alimentação *ad libitum* com 70% de sacarose e com sangue diretamente de hamster anestesiado, quando necessário. *L. i. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) são mantidas rotineiramente em nosso laboratório em meio 199 (pH7.5) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), hepes (40mM/ml, pH 7,4), adenina (100 µM/ml), hemina (2,5µg/ml), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) transfectada com o vetor de expressão Psp72α/NEOα vazio ou contendo o gene LDL-R (LinJ.04.0170) foram mantidas em meio RPMI-1640 (pH 7.4) suplementado com 10% de SFB e sob pressão seletiva com 0.3 µg/ml de geneticina (G418).

3.2. Coleta de parasitas

Amostras de 10⁷ parasitas em cultura foram coletados em fases de crescimento exponencial de 3 dias de cultivo e estacionário com 7 dias de cultivo (Zakai *et al.* 1998) e armazenadas e em Trizol (Invitrogen) a -80 °C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

3.3. Infecção dos insetos com *Leishmania*

Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas artificialmente através de pele de pinto utilizando o aparelho hemotek a 37°C com sangue de coelho desfibrinado contendo 10⁷ parasitas/ml (Figura 3.1). O sangue de coelho, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), foi centrifugado a 3.000rpm por 8 minutos, as hemácias lavadas três vezes com PBS e o plasma inativado a 57°C por 1 hora. Após alimentação, que dura cerca de 2 horas, os insetos foram mantidos *ad libitum* com 70% de sacarose.

Nos horários pós-infecção de 1h, 6h, 24h, 72h, 96h, 144h e/ou 168h, grupos de 3-10 insetos inteiros de pelo menos 3 replicatas biológicas independentes foram coletados, adicionado o reagente Trizol (Invitrogen), macerados com pistilo e armazenados a -80 °C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

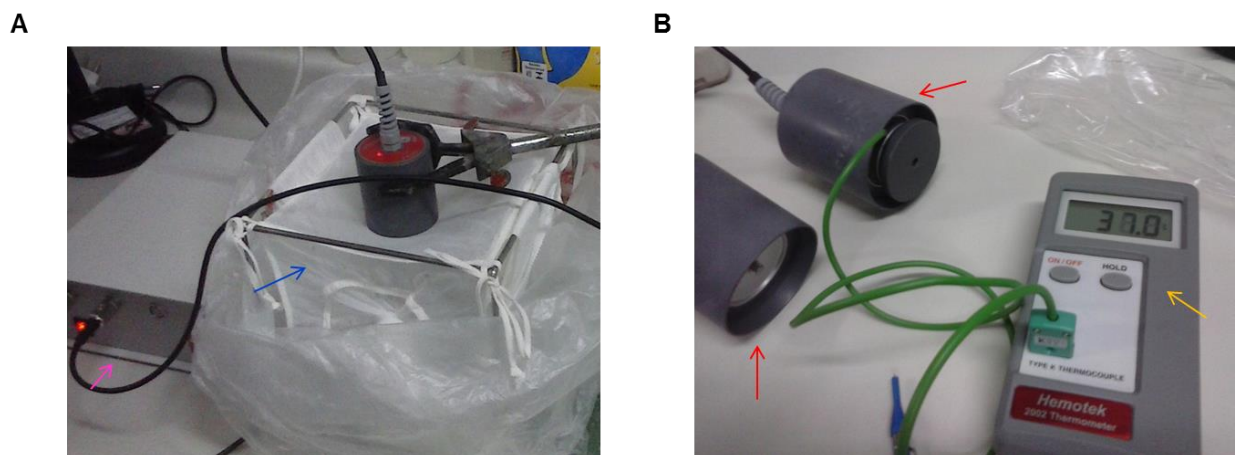


Figura 3.1. Esquema de alimentação artificial de flebotomíneo com hemotek: A, seta rosa aponta o aparelho Hemotek e seta azul a gaiola contendo os flebotomíneo. B, setas vermelhas apontam o terminal de resistência elétrica com controle de temperatura por termostato regulável e seta amarela o termômetro.

3.4. Tratamento com antibióticos e infecção com *Leishmania*

Fêmeas de *L. longipalpis* recém emergidas foram separadas em dois grupos onde o grupo controle foi mantido apenas com açúcar e o grupo experimental com açúcar contendo solução de antibióticos (100 µg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 µg/ml Gentamicina). Após 3 dias o grupo controle foi alimentado com sangue contendo 1×10^7 parasitas/ml e o grupo experimental com adição de solução de antibióticos (100 µg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 µg/ml Gentamicina) no sangue contendo os parasitas. Nos horários pós-infecção de 12h, 24h, 48h, 72h e 144h, de uma replicata biológica com grupos de 3 insetos inteiros foram coletados, adicionado o reagente Trizol (Invitrogen), macerados com pistilo e armazenados a -80 °C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

3.5. Análise da eficácia do tratamento com antibiótico

L. longipalpis recém emergidas foram mantidos com solução de açúcar com ou sem antibióticos (100 µg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 µg/ml Gentamicina) por 8 dias. Em diferentes dias, 3 insetos foram coletados e submetidos a dissecação do tubo digestivo. Os tubos digestivos foram individualmente masserados em 100 µl de meio LB e plaqueados em meio LB-ágar. As placas foram incubadas por 48h a 26°C ou 37°C e posteriormente fotografadas.

3.6. Ensaio com parasitas transfectadas na ausência de pressão seletiva por antibiótico

L. infantum transfectadas com plasmídeo vazio ou que superexpressam LDL-R foram mantidas sob pressão seletiva com 0.3 µg/ml de geneticina (G418). Amostras de 10⁶ parasitas/ml na fase exponencial de crescimento foram transferidos para novo meio de cultura sem o antibiótico. Nos 5 dias posteriores à retirada do antibiótico foram feitas contagens em câmara de Neubauer para produzir curva de crescimento. Além disso, nesses dias amostras de 10⁶ parasitas foram coletadas e armazenadas em Trizol (Invitrogen) a -80 °C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

3.7. Extração de RNA

As amostras destinadas à extração de RNA foram armazenadas em Trizol (Invitrogen) em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, e foram adicionados 100 µL de Trizol por amostras de 10⁷ leishmanias de cultura e a cada 3 amostras de insetos inteiros. No caso de amostras de insetos, estes foram centrifugados a 13000rpm durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Foram adicionados 20 µL de clorofórmio, e os tubos foram agitados vigorosamente durante 20 segundos, e em seguida incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugados a 13000rpm durante 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e foram adicionados 50 µL de água livre de ribonuclease, 0,5 µl o polímero glycoblue (Ambion) e 100 µL de isopropanol, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos,

promovendo a precipitação do RNA. Estas amostras foram centrifugadas a 13000rpm durante 15 minutos a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O pellet obtido foi lavado com etanol 75% previamente gelado a -20 °C. Após a secagem do material à temperatura ambiente, o mesmo foi ressuscitado em 10 µl de água MilliQ. Os RNAs extraídos foram quantificados mediante leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ ND-2000) e armazenados a -80°C.

3.8. Tratamento do RNA total extraído com DNase

Todos os RNAs extraídos foram submetidos ao tratamento com TURBO DNase (Ambion), enzima desoxirribonuclease que degrada moléculas contaminantes de DNA oriundas da extração de RNA. Utilizando 2 unidades de enzima por reação, foi realizada incubação a 37 °C por 30 minutos, seguido pela adição 1 µl de reagente de inativação de DNase. As reações foram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 13000rpm durante 1 minuto a 4 °C para sedimentar o reagente inativação. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml. A confirmação da degradação do DNA genômico pela DNase foi realizada através de PCR com o RNA total como molde.

3.9. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com aproximadamente 200ng-1µg do RNA total usando SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) e seguindo protocolo de acordo com as instruções do fabricante, utilizado o iniciador Oligo(dT)15.

3.10. Lista de iniciadores oligonucleotídicos

Os dados dos oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos

Nome	Gene	Sequência	Identificação do gene ou referência
AAP3-Leish-F	Aminoácido permease 3	5'GCCTACCACTGCCTGAACT	LinJ.31.0900; LinJ.31.0910
AAP3-Leish-R	Aminoácido permease 3	5'GATGCTCGGGATGAACAGA 3'	LinJ.31.0900; LinJ.31.0910
CHIT1-A-Leish-F	Quitinase	5'ACAAGCGTTCATAGAGGAGGT 3'	LinJ.16.0790
CHIT1-A-Leish-R	Quitinase	5'CAGCCACTCCGTCATTGTTT 3'	LinJ.16.0790
CK1-A-Leish-F	Caseína cinase 1	5'CGAGAACCCGATGATGATGTC 3'	LINJ_27_1680
CK1-A-Leish-R	Caseína cinase 1	5'CATCTGTGCCGTTACCTGATAG 3'	LINJ_27_1680
EF1alfa-Leish-F	Fator de elongação 1 alfa	5'CCCTCCCTCCACCCTTT 3'	LinJ.17.0110
EF1alfa-Leish-R	Fator de elongação 1 alfa	5'CGCGCACACGCATATATAGAA 3'	LinJ.17.0110
FLAG_Rtime-Fwd	Proteína flagelar FLAG1/SMP1	5'AGTGGGTAGCCTCCGTGGTGGTGA 3'	Di-Blasi et al. 2015
FLAG_Rtime-Rev	Proteína flagelar FLAG1/SMP1	5'CTCCGACAGCGGCAAGGCGTCCATC 3'	Di-Blasi et al. 2015
GP63-A-Leish-F	Glicoproteína 63	5'TCCTGGTCAAGCACCTCATC 3'	LinJ.10.0490; LinJ.10.0500; LinJ.10.0520; LinJ.10.0530
GP63-A-Leish-R	Glicoproteína 63	5'TGCCCGTCACCTTCCACT 3'	LinJ.10.0490; LinJ.10.0500; LinJ.10.0520; LinJ.10.0530
GT1-A-Leish-F	Transportador de glicose 1	5'AGGCTCCCTCATAATGTGCT 3'	LINJ_36_6560
GT1-A-Leish-R	Transportador de glicose 1	5'AATCTGGTGC GGTTGCTTTC 3'	LINJ_36_6560
GT2-Leish-F	Transportador de glicose 2	5'ACGCCAGGATGCAAAGAA 3'	LINJ_36_6550
GT2-Leish-R	Transportador de glicose 2	5'ATGGCTGCACCAACATAA 3'	LINJ_36_6550
GTC-Leish-F	Transportador de glicose 1,2 e 3	5'CAAGAAGACGGAGGTGAAGAA 3'	LINJ_36_6540; LINJ_36_6550; LINJ_36_6560
GTC-Leish-R	Transportador de glicose 1,2 e 3	5'CCTGCGTCAGAACGTAGTAG 3'	LINJ_36_6540; LINJ_36_6550; LINJ_36_6560
KMP11-Leish-F	Proteína de membrana de kinetoplastídeos-11	5'AAGCTGGACCCGCTGGAT 3'	LinJ.35.2260
KMP11-Leish-R	Proteína de membrana de kinetoplastídeos-11	5'CGTAGTGCTCCTTCATCTCG 3'	LinJ.35.2260
LeishActin-Fwd	Actina	5'GTCGTCGATAAAGCCGAAGGTGGTT 3'	Di-Blasi et al. 2015
LeishActin-Rev	Actina	5'TTGGCCAGACTCGTCGTACTCGCT 3'	Di-Blasi et al. 2015
Linf-LDLr-F	Receptor de lipoproteína de baixa densidade	5'GCTGTGCTCAGTAGGCTATTAC 3'	LinJ.04.0170
Linf-LDLr-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade	5'GGCATTGCATGTTTTCT 3'	LinJ.04.0170
LuloGAPDH-Fwd	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	5'TTCGAGAAGACAGTGATGG 3'	EU124605
LuloGAPDH-Rev	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	5'CCCTTCATCGTCTGGACTA 3'	EU124605
P1033R	RNA ribossomal 16S	5'TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA 3'	Yang et al. 2002
P891F	RNA ribossomal 16S	5'TGCGGGACTTAACCCAACA 3'	Yang et al. 2002
Peroxidoxin-Leish-F	Peroxirredoxina	5'ATCCGATGGACTTCACCTT 3'	LinJ.23.0050
Peroxidoxin-Leish-R	Peroxirredoxina	5'ACGACACCGCAACAACC 3'	LinJ.23.0050
Polyubiquitin-Leish-F	Polibiquitina	5'AACTGGGAGAAGAAGGTGTG 3'	LinJ.09.0950; LinJ.31.1930; LinJ.31.2070
Polyubiquitin-Leish-R	Polibiquitina	5'GCAGGTTGGAGCAGTGA 3'	LinJ.09.0950; LinJ.31.1930; LinJ.31.2070
SHERP-Leish-F	Proteína pequena hidrofílica associada ao retículo endoplasmático	5'CCAGGAGACAAAGGACCAGA 3'	LinJ.23.1210; LinJ.23.1230
SHERP-Leish-R	Proteína pequena hidrofílica associada ao retículo endoplasmático	5'AGCCTTATTGCTCACACCGTCTTC 3'	LinJ.23.1210; LinJ.23.1230
XPRT-A-Leish-F	Xantina fosforribosiltransferase	5'ATCTTCACATCCGACTTCATCC 3'	LinJ_21_0990
XPRT-A-Leish-R	Xantina fosforribosiltransferase	5'GCTCTTTGTACCCGAGTTGT 3'	LinJ_21_0990

3.11. Análise da expressão por PCR quantitativo (qPCR)

A análise da expressão dos genes foi realizado por qPCR a partir de amostras de cDNA oriundas de fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *Leishmania* coletadas em diferentes horários pós-infecção com ou sem tratamento com antibiótico. Também foram utilizadas amostras de *L. i. chagasi* crescidos em cultura correspondentes às fases de crescimento exponencial e estacionário. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método comparativo ΔC_t (Livak e Schmittgen 2001), normalizado pelo gene constitutivo de actina de *Leishmania* (Di-Blasi et al. 2015) ou GAPDH de *L. longipalpis* (GenBank: EU124605).

3.12. Análise de agrupamentos de genes por perfil de expressão em insetos tratados com antibiótico

A análise de agrupamentos de genes por perfil de expressão gênica de *Leishmania* em insetos tratados com antibiótico foi realizado pelo método de Ward no programa R (Ward 1963, Murtagh e Legendre 2014).

3.13. Estatística

Todos os gráficos neste trabalho foram realizados no programa GraphPad Prism 6 versão 6.01 no formato de gráfico de linhas ou de colunas. As análises estatísticas foram realizadas pelo mesmo programa utilizando a avaliação por “One-way Anova” aplicando o teste de múltiplas comparações de Tukey.

4. RESULTADOS

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

Com o intuito de determinar a carga parasitária durante a infecção, avaliamos a expressão do gene constitutivo codificante para actina de *Leishmania* por qPCR (Figura 1A). Nos horários pós-infecção analisados vimos grande diferença entre as replicatas biológicas, principalmente nos horários de 24h e 48h pós-infecção. Contudo, 72h pós-infecção a carga parasitária era homogênea.

Além disso, também avaliamos a carga bacteriana durante a infecção do inseto através da análise do gene ribossomal 16S de bactéria. Vimos que ocorre um aumento das bactérias 24h e 144h pós-infecção.

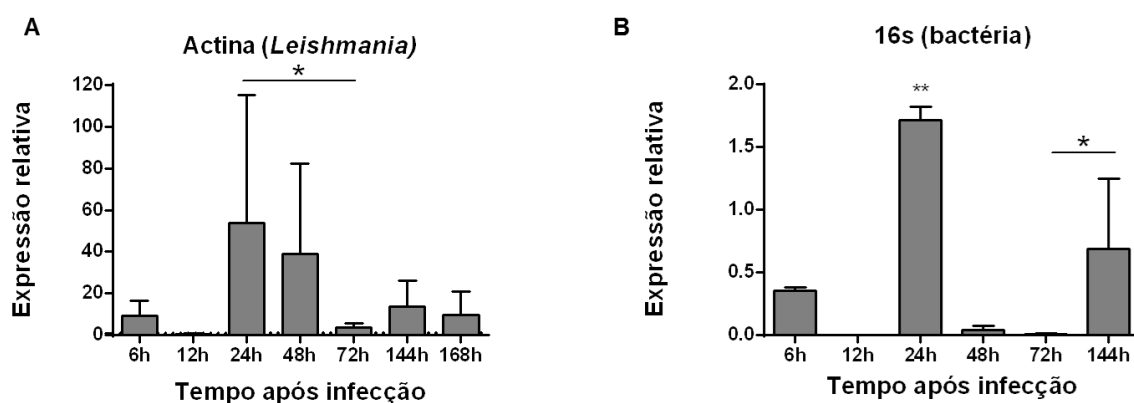


Figura 1. Expressão dos genes de Actina de *Leishmania* e 16S de bactéria: O eixo y representa a expressão relativa do gene actina, em A, ou 16S, em B, normalizado com o gene GAPDH de *L. longipalpis*. O eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Dados representativos de três replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.2. Genes envolvidos na interação com o tubo digestivo do inseto

4.2.1. Quitinase

A expressão do gene de quitinase durante a infecção no flebotomíneo foi analisada por qPCR em diferentes tempos pós-infecção. Observou-se que não houve uma expressão diferencial desse gene, apenas uma tendência ao aumento no horário tardio de 168h (Figura 2A). Além disso, foi verificada sua expressão em *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 2B), havendo uma tendência de maior expressão na fase estacionária.

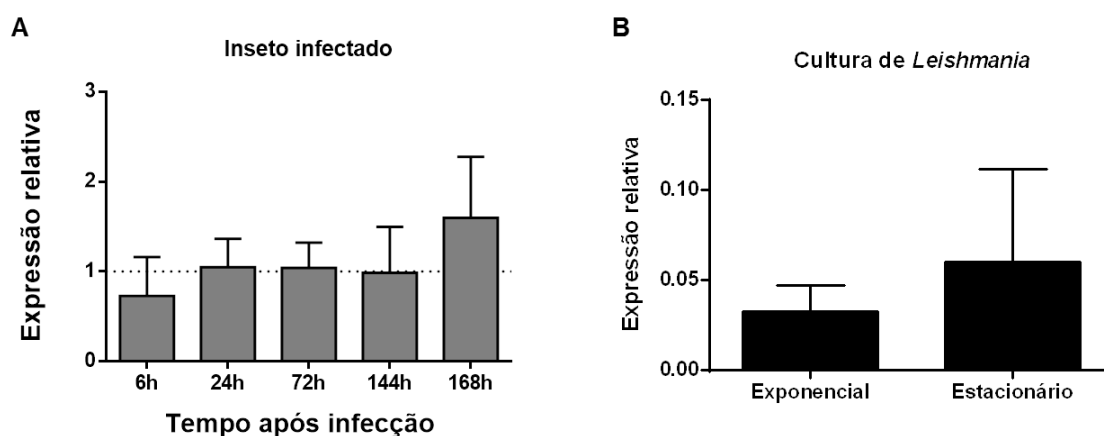


Figura 2. Expressão do gene de quitinase de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene quitinase normalizado com o gene de actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes.

4.2.2. FLAG/SMP1

No presente trabalho, a expressão do gene FLAG1/SMP1 de *L. i. chagasi* foi avaliada durante a infecção em *L. longipalpis* e em formas nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 3).

Observamos que houve uma diminuição da expressão de FLAG1/SMP1 que permaneceu constante nos horários de 6h, 24h, 72h e 144h pós-infecção comparado á 1h pós-infecção (Figura 3A).

Além disso, o gene FLAG1/SMP1 também foi analisado em fases de desenvolvimento exponencial e estacionário de parasitas crescidos em meio de cultura 199. Como vemos na Figura 3B o gene não apresenta expressão diferencial entre as fases de cultura.

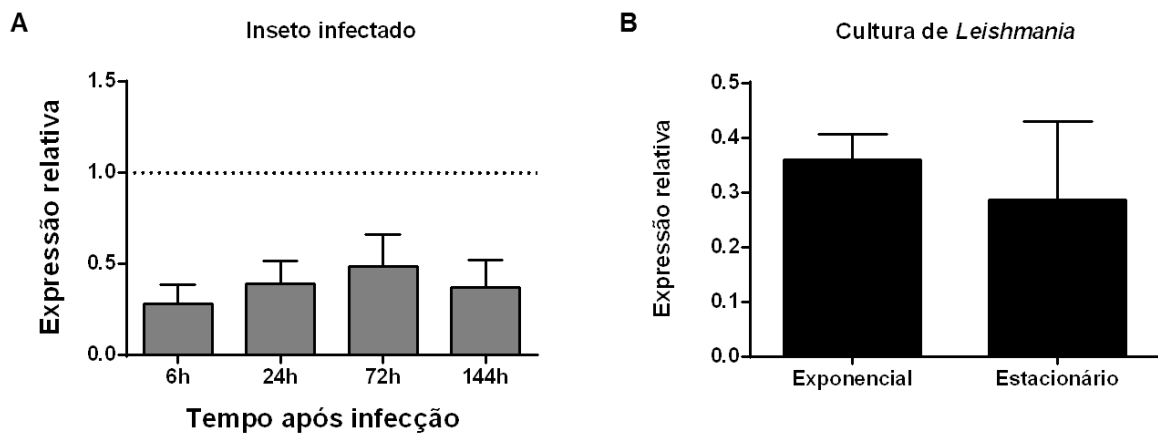


Figura 3. Expressão gênica de FLAG1/SMP1 de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene FLAG1/SMP1 normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes.

4.3. Genes envolvidos com a diferenciação e proliferação do parasita

4.3.1. Transportador de glicose

Nós verificamos a expressão de GT1, GT2 e a expressão global dos transportadores de glicose ao longo da infecção no inseto (Figura 4A, 4C e 4E) e também nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 4B, 4D e 4F).

A expressão de GT1 teve uma redução significativa comparado a 1h pós-infecção em 24h, 144h e 168h (Figura 4C). GT2 apresentou redução significativa comparado a 1h pós-infecção da expressão em 6h, 24h e 144h, e de maneira similar, a GT1 em 72h pós-infecção retorna a expressão basal (Figura 4E).

Como vemos na Figura 4C e 4E, o perfil de expressão dos diferentes transportadores de glicose é semelhante, o que foi confirmado através da investigação da expressão global na Figura 4A. Existe apenas maior expressão nos horários de 1h e 72h após a infecção, que é reduzida nos demais horários analisados de 6h, 24h, 144h e 168h.

Nos parasitas crescidos em meio de cultura houve uma tendência ao aumento da expressão nas fases de crescimento estacionário (Figura 4B, 4D e 4F).

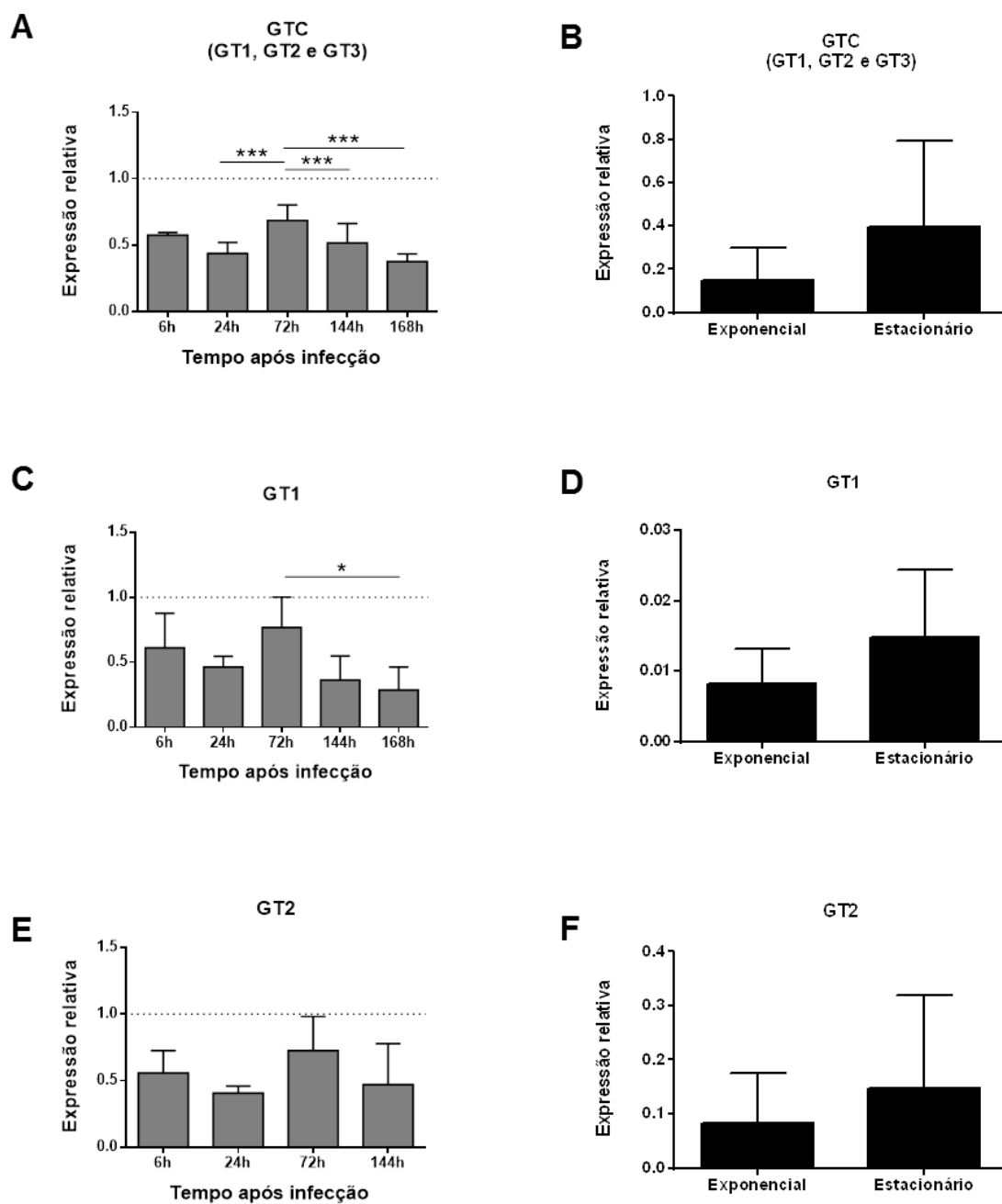


Figura 4. Expressão gênica dos transportadores de glicose de *L. i. chagasi*: A e B: expressão global dos transportadores de glicose 1, 2 e 3 (GTC). C e D: expressão do transportador de glicose 1 (GT1). E e F: expressão do transportador de glicose 2 (GT2). O eixo y representa a expressão relativa do gene do transportador de glicose normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A, C e E o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, C e E, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, D e F, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três (A, C e E) ou duas (B, D e F) replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.3.2. AAP3

Avaliamos a expressão de AAP3 ao longo da infecção em *L. longipalpis* (Figura 5A). Foi observada uma diminuição da expressão em 6h e 24h pós-infecção. O gene teve aumento de expressão no horário de 72h.

A expressão de AAP3 foi verificada em formas nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 5B) e observou-se que o gene possui uma tendência de maior expressão na fase estacionária.

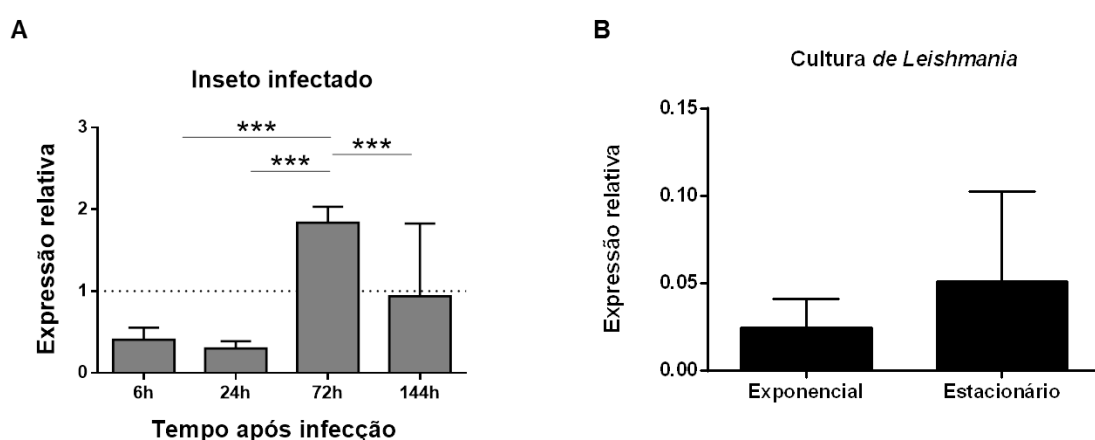


Figura 5. Expressão do gene AAP3 de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene AAP3 normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

4.3.3. SHERP

Avaliamos a expressão gênica de SHERP durante o desenvolvimento da infecção no inseto (Figura 6A). Houve aumento da expressão de SHERP nos horários de 72h e 144h pós-infecção.

A expressão de SHERP também foi verificada em formas nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura e observou-se que existe uma tendência de maior expressão do gene na fase estacionária (Figura 6B).

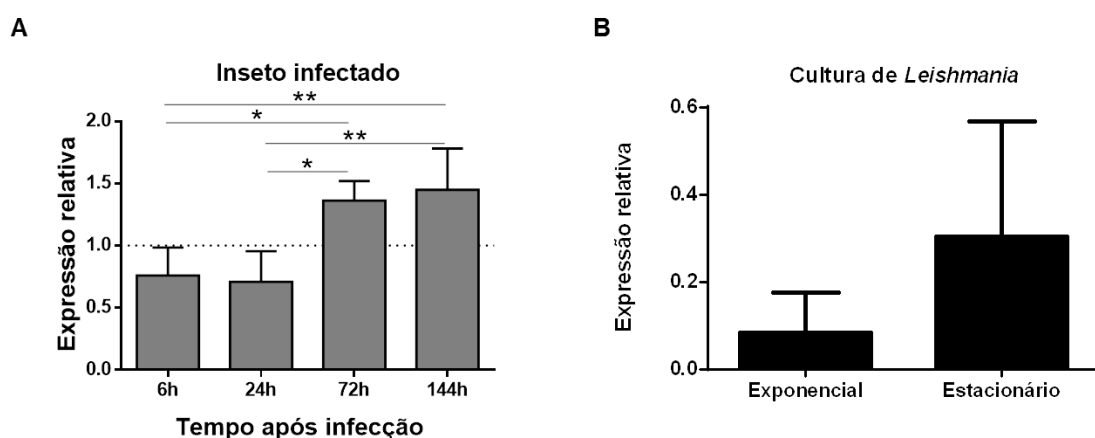


Figura 6. Expressão gênica de SHERP de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene SHERP normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

4.3.4. KMP-11

No presente trabalho, verificamos a expressão gênica de KMP-11 nos horários pós-infecção do inseto e nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 7). Em ambos os modelos analisados não houve expressão diferencial do gene.

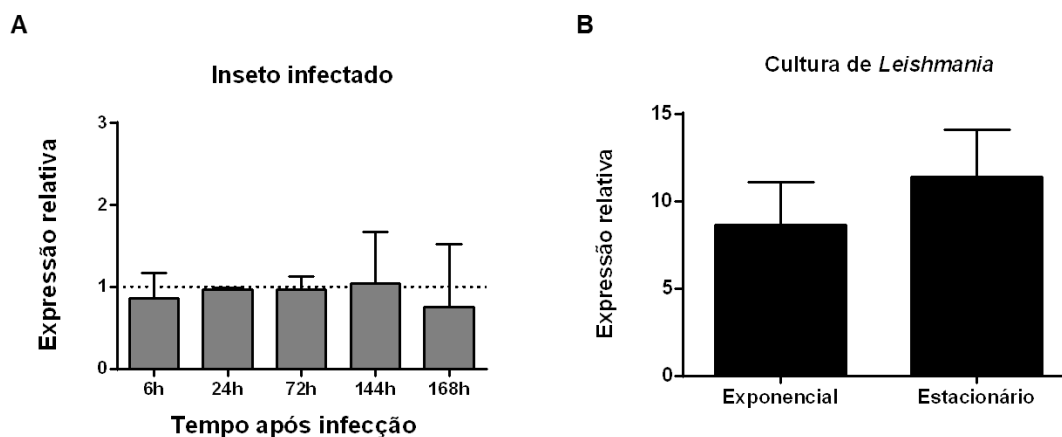


Figura 7. Expressão gênica de KMP-11 de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene KMP-11 normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

4.3.5. XPRT

Nós avaliamos a expressão de XPRT ao longo da infecção no inseto (Figura 8A). Observou-se uma redução da expressão 168h pós-infecção.

A expressão de XPRT também foi verificada em formas nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 8B) e foi vista uma tendência ao aumento na fase estacionária.

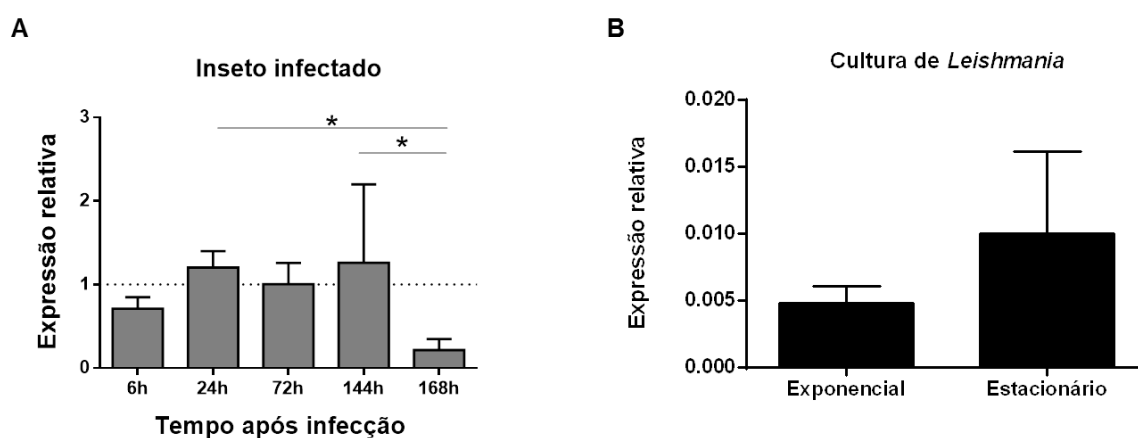


Figura 8. Expressão gênica de XPRT de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene XPRT normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (* $p < 0,05$).

4.3.6. Poliubiquitina

Nós avaliamos a expressão de poliubiquitina ao longo da infecção no inseto (Figura 9A). Observou-se grande variação 6h pós-infecção e um aumento do gene no horário de 144h pós-infecção.

A expressão de poliubiquitina foi verificada nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 9B) e observou-se que o gene é mais expresso na fase exponencial.

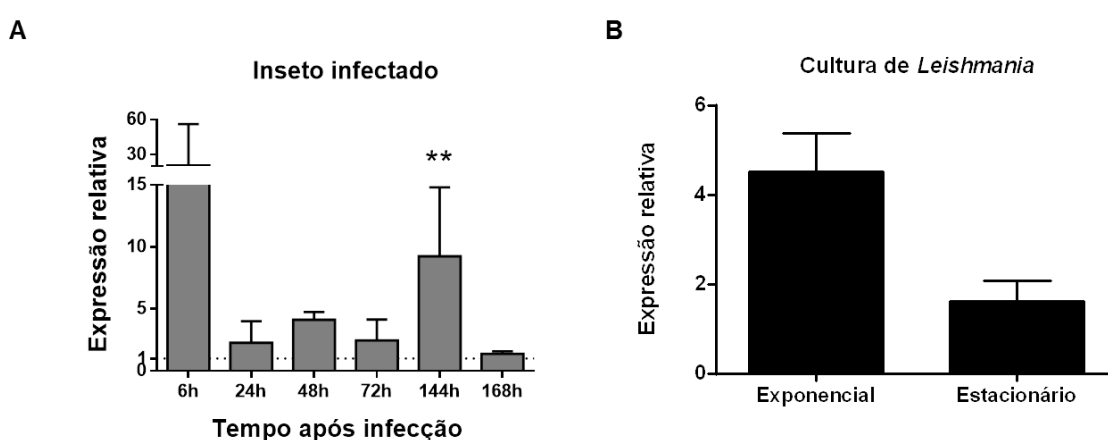


Figura 9. Expressão de poliubiquitina de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene poliubiquitina normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (** $p < 0,01$).

4.3.7. Peroxirredoxina

No presente trabalho, verificamos a expressão gênica de peroxirredoxina nos horários pós-infecção do inseto e nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 10). Em ambos modelos analisados não houve expressão diferencial do gene.

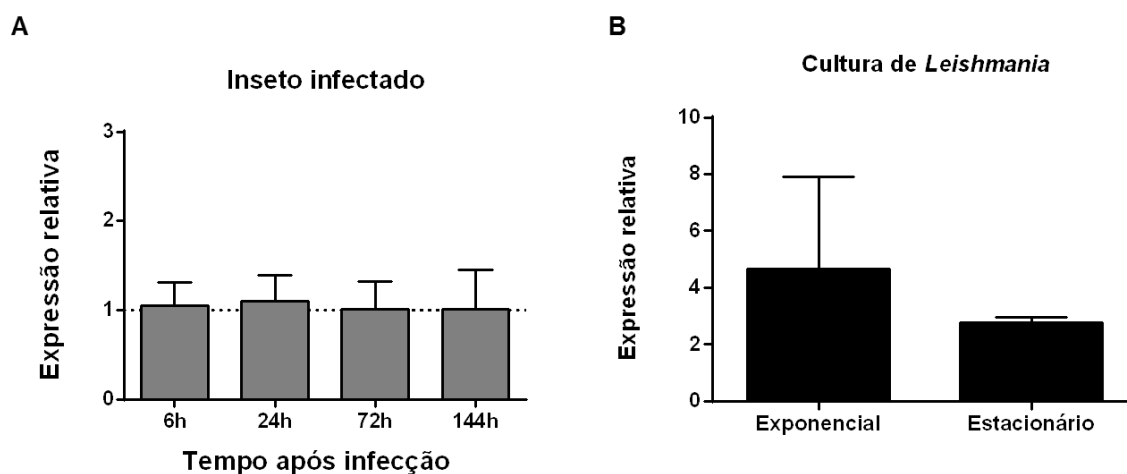


Figura 10. Expressão gênica de peroxirredoxina de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene peroxirredoxina normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

4.4. Genes envolvidos na modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado

4.4.1. CK1

Verificamos a expressão gênica da isoforma 4 de CK1 de *L. i. chagasi* (Figura 7).

CK1 foi analisado em diferentes horários pós-infecção em *L. longipalpis*. Não houve expressão diferencial ao longo da infecção no inseto (Figura 11).

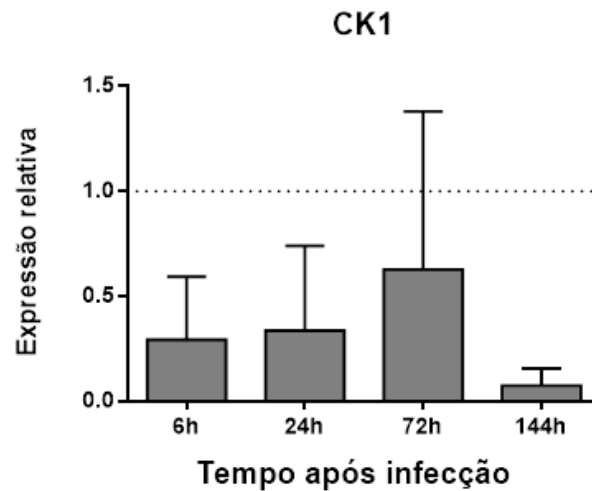


Figura 11. Expressão do gene Caseína cinase 1 (CK1) de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene CK1 normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. O eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Dados representativos de três replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

4.4.2. EF1- α

Observamos que no horário de 6h pós-infecção o gene EF1- α é mais expresso que 144h pós-infecção (Figura 12A).

Em nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura não se observou diferença na expressão do gene (Figura 12B).

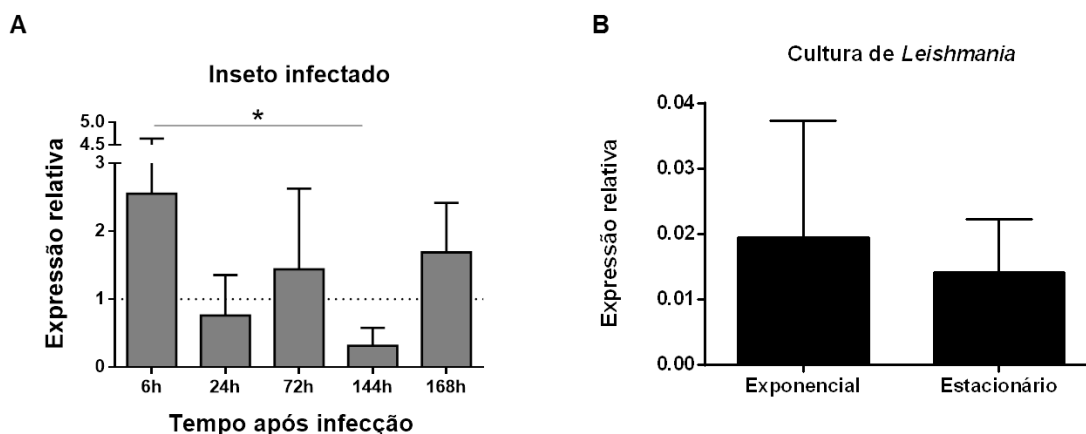


Figura 12. Expressão de EF1-alfa de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene EF1-alfa normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (* $p < 0,05$).

4.4.3. GP63

Analizamos a expressão gênica de GP63 de *L. i. chagasi* (Figura 13). Observamos uma aumento do gene no horário tardio de 144h pós-infecção. Em formas nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura (Figura 13B) observou-se que o gene possui uma tendência de maior expressão na fase estacionária.

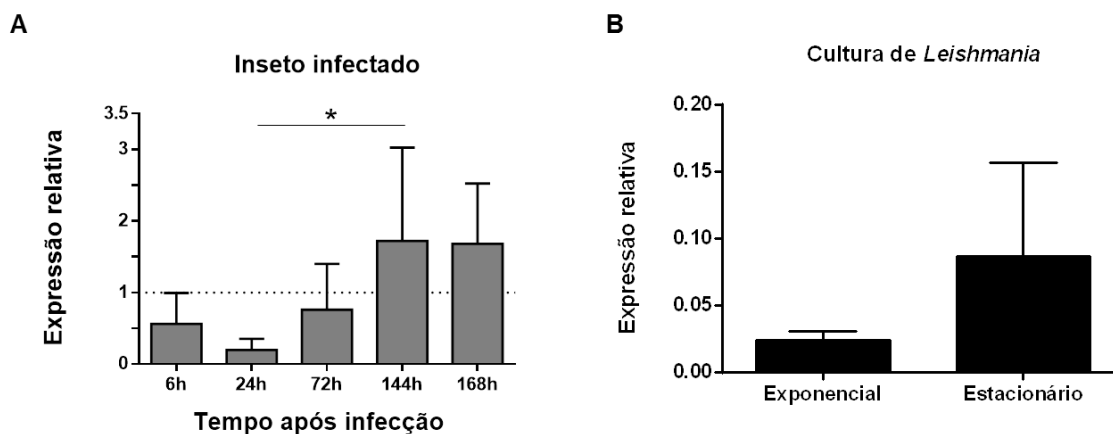


Figura 13. Expressão de GP63 de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene GP63 normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde em A o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. Em A, o eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Em B, o eixo x representa as amostras de *Leishmania* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura. Dados representativos de três (A) ou duas (B) replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (* $p < 0,05$).

4.5. Infecção com tratamento com antibiótico

4.5.1. Tratamento com antibiótico

A *Leishmania* fica exposta aos microorganismos presentes no tubo digestivo do inseto. Para verificar se existe alguma interferência das bactérias na expressão gênica ao longo do desenvolvimento do parasita tratamos os insetos com antibiótico (100 µg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 µg/ml Gentamicina).

Para avaliar se tratamento com antibiótico foi capaz de eliminar ou reduzir a carga bacteriana foi realizado o plaqueamento de macerado de tubo digestivo de insetos tratados ou não com antibiótico em meio LB-ágar por 48h a 26°C ou 37°C, (Figura 14).

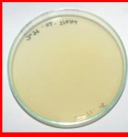

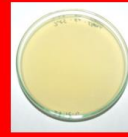
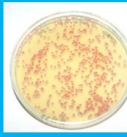

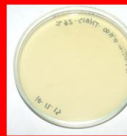
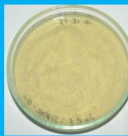
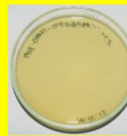

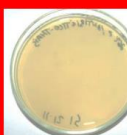
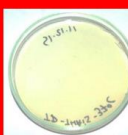
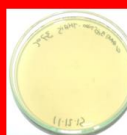













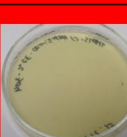
No grupo controle sem antibiótico incubado a 26°C houve o crescimento de colônias de bactérias ao longo dos 8 dias avaliados após a emergência dos insetos (Figura 14, 1ª coluna). No grupo controle incubado a 37°C houve crescimento de colônias apenas no 2º e 8º dia após a emergência dos insetos (Figura 14, 3ª coluna).

No grupo experimental, com antibiótico, incubado a 26°C houve o crescimento de colônias de bactérias apenas no 1º e 6º dia, e pouco crescimento no 7º e 8º dia avaliados após a emergência dos insetos e início do tratamento (Figura 14, 2ª coluna). No grupo experimental com antibiótico, incubado a 37°C, houve crescimento de colônias apenas no 1º dia e pouco crescimento no 2º dia após a emergência dos insetos e início do tratamento (Figura 14, 4ª coluna).

Realizamos de forma quantitativa a validação destes resultados avaliando por qPCR a expressão do gene da subunidade 16S da proteína ribossomal de bactéria em insetos infectados tratados ou não com antibióticos, nos horários de 12h, 48h, 24h, 72h e 144h pós-infecção (Figura 15B).

Vemos que apenas no grupo sem tratamento com antibiótico houve um aumento da expressão de 16S em 144h pós-infecção. Sendo assim, o antibiótico foi capaz de reduzir as bactérias do tubo digestivo do inseto. Comparando o grupo controle e o experimental, vemos considerável diminuição do número de bactérias (Figura 14 e 15B).

Além disso, também avaliamos a carga parasitária nos grupos de insetos infectados tratados ou não com antibióticos através da expressão do gene de actina de *Leishmania* por qPCR, Figura 15A, e vimos que não houve diferença entre os grupos.

	26°C		37°C	
	sem antibiótico	com antibiótico	sem antibiótico	com antibiótico
1º dia				
2º dia				
3º dia				
4º dia				
6º dia				
7º dia				
8º dia				

Não Cresceu	Cresceu Pouco	Cresceu

Figura 14 Bactérias do tubo digestivo de *L. longipalpis*. Análise da presença de bactérias em tubo digestivo de *L. longipalpis* plaqueados individualmente em meio LB-ágar incubadas por 48h a 26°C ou 37°C, tratados ou não com antibiótico (100 µg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 µg/ml Gentamicina). Em vermelho o não crescimento de colônias de bactérias. Em amarelo pouco crescimento, de até 40 colônias. Em azul, alto crescimento, formação de tapete. Imagem representativa de triplicata de tubos digestivos individuais de um experimento.

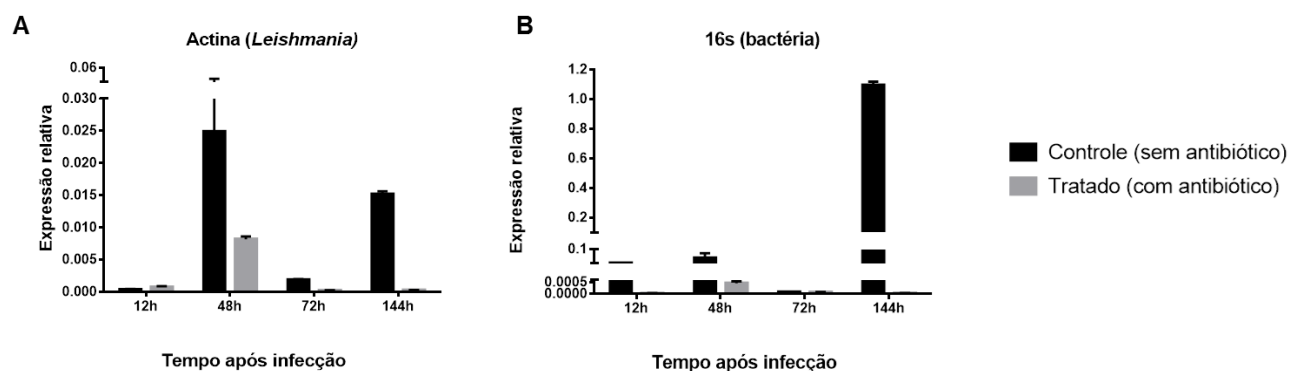


Figura 15 Expressão dos genes de actina de *Leishmania* e 16S de bactéria: A: expressão de actina de *Leishmania*. B: expressão de 16S de bactéria. O eixo y representa a expressão relativa do gene actina ou 16S normalizado com o gene GAPDH de *L. longipalpis*. As colunas em preto representam o grupo controle que não recebeu tratamento com antibiótico e em cinza o grupo que recebeu tratamento com antibiótico (100 mg/ml Penicilina-Estreptomicina e 10 mg/ml Gentamicina). Dados representativos de uma replicata biológica. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

4.5.2. Expressão de genes de *Leishmania* em insetos tratados com antibiótico

Com o intuito de verificar se a eliminação da microbiota do inseto com antibióticos interfere na expressão gênica da *Leishmania*, realizamos qPCR comparando a expressão relativa de diversos genes do parasita em insetos tratados ou não com antibióticos. Adicionalmente, separamos em grupos os genes com perfil de expressão similar utilizando o método de Ward (Figura 16).

O grupo 1, Figura 16A, possui os genes AAP3, GTC, GT1 e GT2. Neste grupo estão genes que tiveram sua expressão reduzida 72h pós-infecção e aumentada 144h pós-infecção nos insetos tratados com antibiótico.

No grupo 2, Figura 16B, composto pelos genes CK1 e poliubiquitina, vemos comportamento inverso ao grupo 1, onde os genes tiveram sua expressão aumentada 72h pós-infecção e reduzida 144h pós-infecção.

O grupo 3, Figura 16C, é formado pelos genes que não tiveram expressão diferencial diante do tratamento com antibiótico, tais como GP63, EF1-alfa e KMP11.

No grupo 4, Figura 16D, estão os genes que tiveram expressão gênica reduzida nos horários de 72h e 144h pós-infecção nos insetos tratados com antibiótico. Este grupo é constituído pelos genes FLAG1/SMP1, XPRT, SHERP e quitinase.

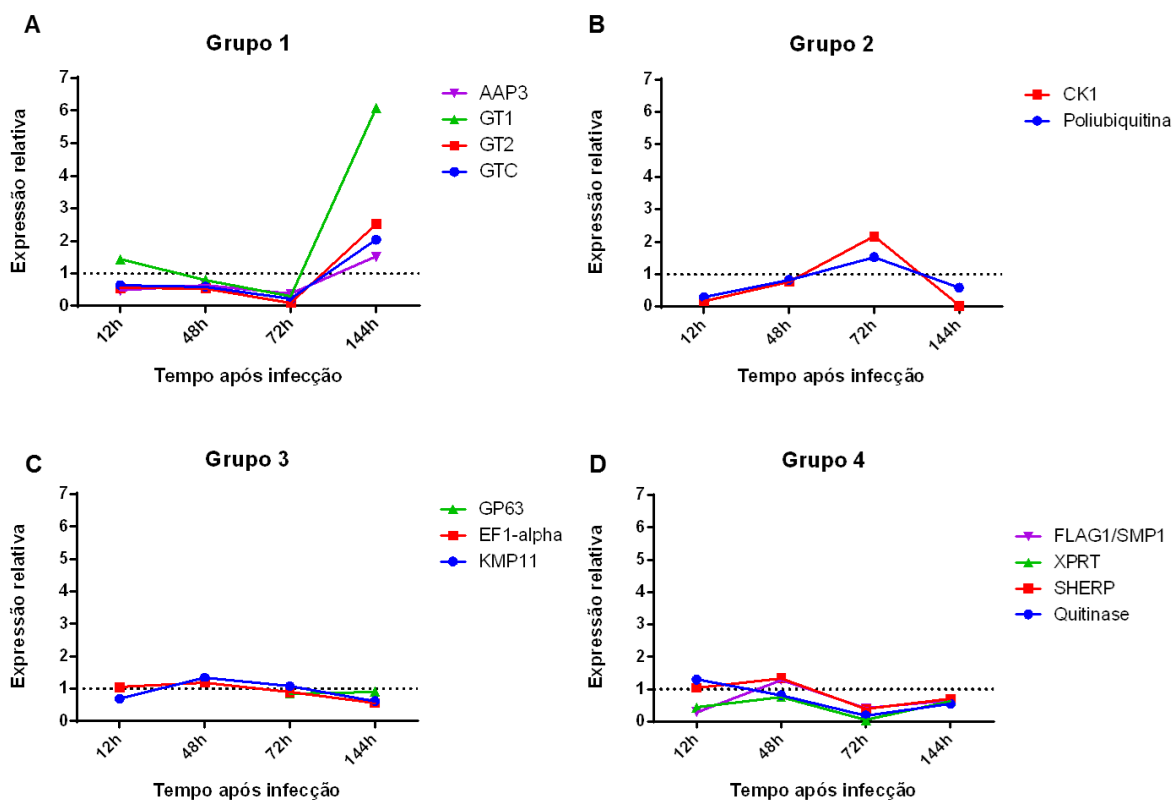


Figura 16. Agrupamentos de genes com perfil de expressão similar em insetos tratados com antibiótico: A: expressão dos genes AAP3, GT1, GT2 e GTC. B: expressão dos genes CK1 e Poliubiquitina. C: expressão dos genes GP63, EF1-alfa e KMP-11. D: expressão dos genes FLAG1/SMP1, XPRT, SHERP e Quitinase. O eixo y representa a expressão relativa do gene alvo normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde o valor 1 é a expressão gênica do grupo controle. O eixo x apresenta os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. Grupos formados pelo método de Ward. Dados representativos de uma replicata biológica.

4.6. *Leishmania* transfectada que superexpressa LDL-R

4.6.1. Expressão de LDL-R durante a infecção no inseto

Analisamos a expressão de LDL-R da *Leishmania* em diferentes tempos pós-infecção no inseto por qPCR (Figura 17). Vimos que este gene é mais expresso 144h pós-infecção. Além disso, comparado ao horário de 1h pós-infecção, o gene possui expressão reduzida nos horários de 6h e 24h pós-infecção (Figura 17).

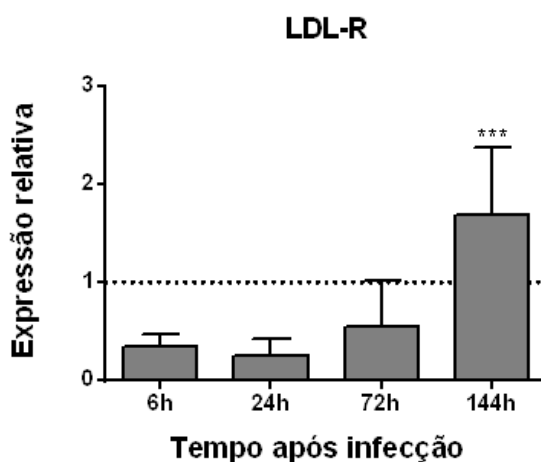


Figura 17. Expressão do gene LDL-R de *L. i. chagasi*: O eixo y representa a expressão relativa do gene LDL-R normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde o valor 1 é a expressão gênica em 1h pós-infecção. O eixo x representa os diferentes tempos pós-infecção. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Dados representativos de três replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. Diferenças significativas foram calculadas pelo método ANOVA (***) $p < 0,001$.

4.6.2. Perfil de expressão de LDL-R em parasitas transfectadas

Para analisar as *Leishmanias* transfectadas que superexpressam LDL-R, verificamos sua expressão relativa por qPCR. Comparado a *L. infantum* selvagem e a transfectada com plasmídeo vazio, vimos que as *Leishmanias* transfectadas superexpressam em média 13.000 vezes mais LDL-R (Figura 18).

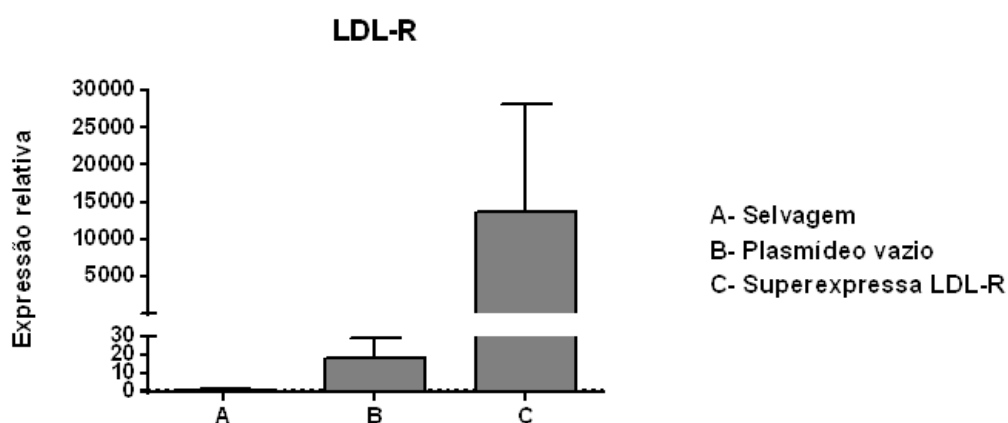


Figura 18. Expressão do gene LDL-R de *L. infantum*: O eixo y representa a expressão relativa do gene LDL-R normalizado com o gene actina de *Leishmania*, onde o valor 1 é a expressão gênica do grupo controle. O eixo x apresenta as amostras de *Leishmania* de cultura: A, selvagem; B, transfectada com o plasmídeo vazio; C, superexpressa o gene LDL-R. Dados representativos de duas replicatas biológicas. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

Para manter o vetor epissemal de superexpressão as *Leishmanias* transfectadas são mantidas com pressão seletiva de antibiótico (geneticina). Visando a utilização dessas transfectadas em infecções no inseto sem adição de antibiótico, fizemos um experimento *in vitro*, onde retiramos o antibiótico do meio de cultura e avaliamos a expressão do gene LDL-R nos dias subsequentes, por qPCR (Figura 19A). Vimos que nas transfectadas que superexpressam LDL-R houve variação nos níveis de expressão do gene ao longo dos dias após o desafio, contudo, a maior expressão foi mantida quando comparada à *Leishmania* selvagem e à transfectada com plasmídeo vazio. Além disso, também vimos que não houve interferência no crescimento das *Leishmanias* neste desafio (Figura 19B).

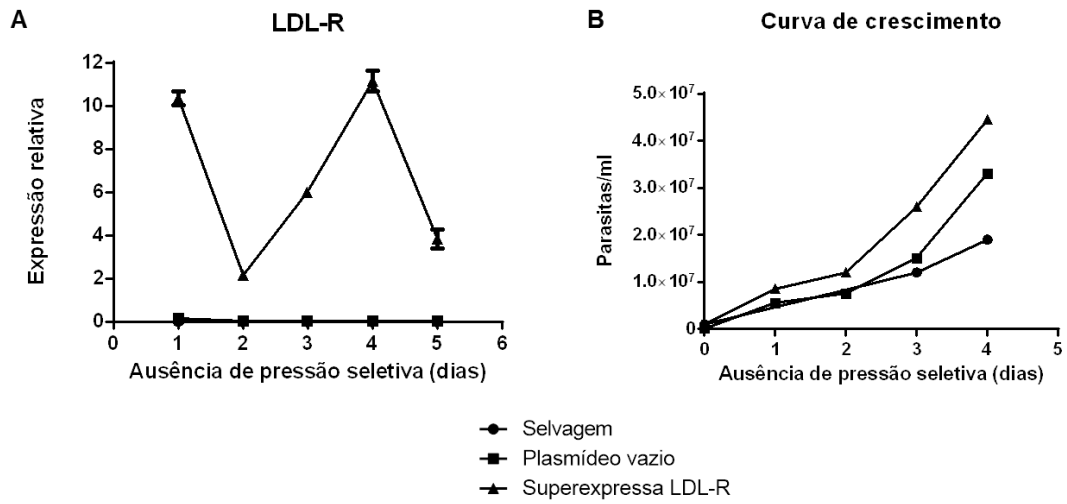


Figura 19. Expressão do gene LDL-R de *L. infantum* e curva de crescimento dos parasitas na ausência de pressão seletiva por antibiótico. Em A, o eixo y representa a expressão relativa do gene LDL-R normalizado com o gene actina de *Leishmania*. Em B, o eixo y representa o número de parasitas/ml. O eixo x representa os diferentes tempos após a retirada do antibiótico do meio de cultura. ●: *Leishmania* selvagem; ■: *Leishmania* transfectada com plasmídeo vazio; ▲: *Leishmania* que superexpressa o gene LDL-R. Dados representativos de uma replicata biológica.

Infecção de *L. longipalpis* com *Leishmania* transfectada que superexpressa o gene LDL-R

Para avaliar se o LDL-R teria algum papel durante a infecção no inseto, infectamos *L. longipalpis* com *L. infantum* que superexpressa LDL-R e comparamos aos grupos controle selvagem e transfectadas com plasmídeo vazio. Examinamos a carga parasitária ao longo da infecção através da análise da expressão do gene constitutivo actina de *Leishmania* por qPCR, Figura 20A, e vimos que não houve diferença na carga parasitária entre os grupos.

Averiguamos a expressão do gene LDL-R pelo parasita dentro no inseto e como esperado, a *Leishmania* transfectada que superexpressa LDL-R manteve sua maior expressão ao longo da infecção quando comparada aos grupos controle (Figura 20B).

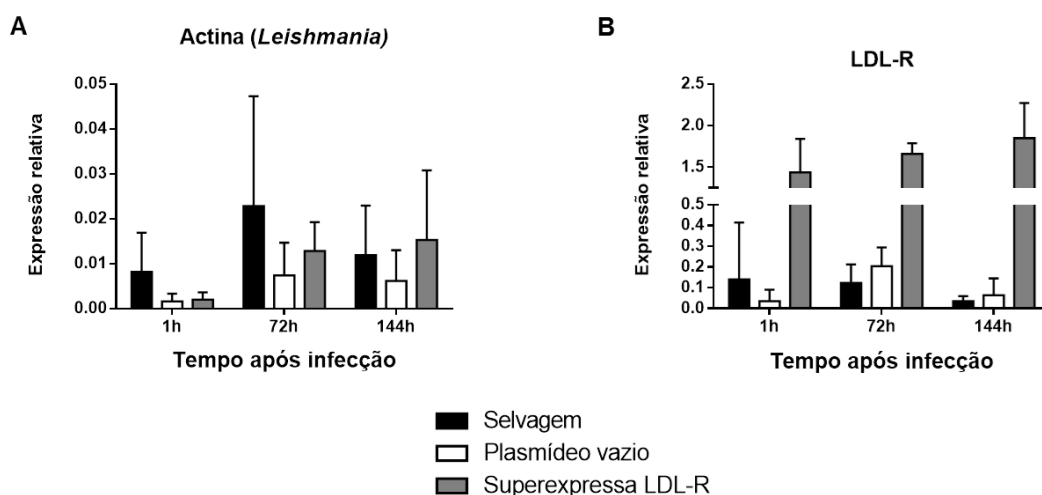


Figura 20. Expressão do gene de actina e LDL-R de *L. infantum*: Em A, o eixo y representa a expressão relativa do gene actina normalizado com o gene GAPDH de *L. longipalpis*. Em B, o eixo y representa a expressão relativa do gene LDL-R normalizado com o gene actina de *Leishmania*. O eixo x representa os diferentes tempos de coleta de amostra pós-infecção. As colunas em preto representam o grupo de insetos infectados com *Leishmania* selvagem; em branco, o grupo infectado com *Leishmania* transfectada com plasmídeo vazio; em cinza, o grupo infectado com *Leishmania* que superexpressa o gene LDL-R. Dados representativos de duas replicatas biológicas independentes. As barras acima de cada coluna indicam o desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

A interação da *Leishmania* com o intestino do flebotomíneo é fundamental para sucesso da infecção. O primeiro contato do parasita com o epitélio intestinal do inseto ocorre ao final da digestão sanguínea e degradação da matriz peritrófica do inseto, quando o parasita tem que migrar para a parte anterior do tubo digestivo e aderir ao epitélio intestinal para não ser eliminado juntamente com o sangue digerido. Processos adaptativos do parasita são responsáveis para garantir sua sobrevivência, tais como secreção de moléculas específicas que possibilitam esta interação inseto-parasita (Kamhawi 2006, Bates 2008).

Recentes trabalhos demonstraram a dinâmica de expressão dos genes de *Leishmania* no inseto e que há expressão diferencial. Foram comparados o transcriptoma de amostras coletadas 144h pós-infecção de *L. infantum* em *P. perniciosus* com formas de crescimento estacionário de cultura ou amastigotas (Alcolea *et al.* 2014, Alcolea *et al.* 2016). Além disso, o transcriptoma de três estágios de *L. major* em *P. duboscqi* foram analisados, as formas procíclicas, nectomonas e metacíclicas (Inbar *et al.* 2017). Interessantemente, a maioria dos genes diferencialmente expressos da *Leishmania* no inseto estão envolvidos com regulação da expressão gênica, sinalização celular, metabolismo de aminoácidos e biossíntese de moléculas de superfície.

No presente trabalho, avaliamos a carga parasitária ao longo da infecção através da análise de expressão do gene constitutivo codificante para actina de *Leishmania* por qPCR. Vimos variação da quantidade dos parasitas entre as replicatas biológicas, no entanto apenas no horário de 72h pós-infecção ocorre homogeneidade entre todas replicatas. Evento que é esperado devido ao fim da digestão onde parte das Leishmanias são excretadas com o sangue digerido (Kamhawi, S. 2006). Além disso, também avaliamos a carga bacteriana através da análise do gene 16S por qPCR. Observamos maior quantidade de bactérias 24h pós-infecção, sendo esta proliferação da microbiota devido à alimentação sanguínea do inseto (Demaio, J. *et al.* 1996; Gusmao, D. S. *et al.* 2010).

Sabe-se que proteofosfoglicanos do tipo filamentosos são secretados pelo protozoário, formando uma matriz gelatinosa onde são agregados parasitas que bloqueiam parte anterior do trato digestivo do inseto, que durante a alimentação do vetor levam à regurgitação do gel contendo numerosos parasitas. Além disso, este bloqueio também causa danos à válvula do estomodeu que dificulta a ingestão sanguínea, levando o inseto a realizar mais alimentações, aumentando a possibilidade de transmissão do parasita (Rogers *et al.* 2002, Bates e Rogers (2004), Rogers *et al.* 2004). A *Leishmania* expressa quitinase no tubo digestivo do inseto,

sendo esta enzima responsável pela degradação da quitina que reveste a válvula do estomodeu. Esta degradação interfere na função da válvula e facilita o refluxo dos parasitas (Volf *et al.* 2004, Rogers *et al.* 2008). Em *Leishmania mexicana* o gene de quitinase é constitutivamente expresso nas formas promastigotas e amastigotas do parasita (Joshi *et al.* 2005). Semelhantemente, no presente trabalho ao verificarmos a expressão de quitinase de *L. i. chagasi* vimos que o gene também não é modulado ao nível transcricional nos tempos analisados pós-infecção em *L. longipalpis* e isso também se repete nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura.

Outro gene envolvido com interação ao tubo digestivo é o que codifica uma proteína flagelar FLAG1/SMP1 de *Leishmania*. O flagelo do parasita tem o papel de adesão ao intestino, através da formação de hemidesmosomos com a cutícula ectodérmica do intestino e inserção do flagelo entre as microvilosidades do intestino médio (Killick-Kendrick *et al.* 1974, Killick-Kendrick *et al.* 1974, Molyneux 1977, Walters *et al.* 1989). Di-Blasi *et al.* (2015) demonstraram que o sucesso da infecção no par *L. longipalpis* e *L. i. chagasi* não depende da adesão do parasita ao epitélio intestinal do inseto por intermédio de FLAG1/SMP1, sugerindo portanto que deve haver outra molécula responsável por este feito. No entanto, no par *P. papatasi* e *L. major* a proteína FLAG1/SMP1 foi importante para ancoragem ao tubo digestivo. Além disso, a expressão de FLAG1/SMP1 havia sido avaliada apenas em formas de cultura de *L. i. chagasi*, *L. major* e *L. pifanoi* (Di-Blasi *et al.* 2015) e foi observado que não há diferença significativa de expressão deste gene entre as fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura de todas espécies analisadas de *Leishmania* (Di-Blasi *et al.* 2015). De forma semelhante, no presente trabalho não foi detectada expressão diferencial entre os parasitas crescidos em cultura de *L. i. chagasi*. Pela primeira vez a expressão gênica de FLAG1/SMP1 foi investigada durante a infecção no vetor e foi visto que o gene é mais expresso apenas 1h pós-infecção.

Outras moléculas como, por exemplo, o LPG de *Leishmania* também apresenta um papel na interação entre o epitélio intestinal do inseto e parasita, porém isto ocorre em pares inseto-parasita restritivos (ex. *L. major* e *P. papatasi*) e não nos permissivos (ex. *L. i. chagasi* e *L. longipalpis*) (Sacks *et al.* 1995, Volf e Myskova 2007, Svarovska *et al.* 2010). Mais estudos são necessários para entender as peculiaridades da interação inseto-parasita do Novo Mundo.

Além disso, o ciclo de vida da *Leishmania* no intestino do inseto inclui várias mudanças morfológicas. Algumas formas tem intensa proliferação (procíclicas, leptomonas e haptomonas), outras, no entanto, não se dividem (nectomonas e metacíclicas).

Ao longo do seu ciclo de vida heteroxênico as *Leishmanias* possuem fontes energéticas diferentes. Amastigotas são expostas a baixas concentrações de açúcares dentro do fagolisossomo do macrófago, sendo suas principais fontes nutricionais os ácidos graxos e aminoácidos. Promastigotas, no entanto, são expostas a altas concentrações de açúcares provenientes das alimentações sanguíneas e de seiva das plantas, de onde adquirem principalmente sacarose, fonte de glicose e frutose (Schlein 1986, Dillon e el-Kordy 1997).

Existem três transportadores de glicose (GTs) de *Leishmania*, nomeados GT1, GT2 e GT3. GT1 é expresso apenas na membrana do flagelo, enquanto o GT2 e GT3 são expressos apenas na membrana do corpo celular do parasita. GTs também possuem participação na captação de outros açúcares além da glicose, tais como frutose, manose e galactose (Rodriguez-Contreras *et al.* 2007, Rodriguez-Contreras *et al.* 2015).

Em *L. mexicana*, sabe-se que GT2 é 15 vezes mais expresso em promastigotas crescidos em cultura, comparado às amastigotas, e GT1 e GT3 não tem expressão diferencial entre estas formas (Burchmore e Landfear 1998). GT1 foi descrito também como sensor, respondendo aos níveis de glicose, atuando na adaptação do parasita a mudanças do ambiente (Rodriguez-Contreras *et al.* 2015).

Estudos de expressão gênica de *Leishmania* em cultura demonstraram que os GTs são mais expressos em *L. infantum* na forma promastigota estacionário comparado às formas promastigotas em crescimento exponencial e amastigotas (Alcolea *et al.* 2010). Estes autores demonstraram que a expressão dos GTs está diminuída frente a aumento de temperatura e acidificação do meio, o que esclarece o fato de serem menos expressas em amastigotas que vivem em ambiente com temperatura elevada do hospedeiro vertebrado (37°) e pH ácido (4.5-5.5). No entanto, nós avaliamos a expressão dos GTs em *L. i. chagasi* nas fases de crescimento exponencial e estacionário de cultura, e não houve expressão diferencial. Alcolea *et al.* (2016) compararam *L. infantum* presentes na porção anterior do tubo digestivo de *P. perniciosus*, coletados 144h pós-infecção, com o parasita na fase de crescimento estacionário de cultura. Foi visto que GTs eram mais expressos nas formas do parasitas crescidas em meio de cultura. Semelhantemente, em nossos resultados de *L. i. chagasi* 144h pós-infecção em *L. longipalpis* e na fase de crescimento estacionário de cultura apresentaram o mesmo resultado.

Em nossos resultados de expressão gênica dos GTs de *L. i. chagasi* ao longo da infecção em *L. longipalpis* existem dois picos na expressão, em 1h e 72h pós-infecção, seguido de uma queda progressiva da expressão. Isso pode estar relacionado com a necessidade energética do parasita, visto que próximo de ambos os momentos a *Leishmania* passa por uma fase de multiplicação (Schlein 1986, Gossage *et al.* 2003, Kamhawi 2006).

O gene de aminoácido permease 3 (AAP3) é responsável pela aquisição do aminoácido arginina. No hospedeiro vertebrado este transportador atua inclusive na homeostase dos níveis intracelulares de arginina evitando a ativação de vias imunes do hospedeiro (Goldman-Pinkovich *et al.* 2016).

Durante a infecção do inseto, AAP3 apresentou maior expressão em 1h, 72h e 144h pós-infecção. Semelhantemente ao visto no trabalho de Inbar *et al.* (2017) em que *L. major* expressa mais AAP3 em formas nectomonas e metacíclicas no *P. duboscqi*. Isso corrobora a ideia que nestes momentos o parasita aumenta seu aporte nutricional.

SHERP é expressa pelo parasita e está presente no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial externa. A expressão ao nível proteico de SHERP é aumentada em formas metacíclicas de *Leishmania*. Apesar disso, não se sabe ao certo qual a função deste gene. Estudos demonstram sua capacidade de interagir com lipídeos de membrana e bomba de prótons da membrana de compartimentos subcelulares, sugerindo que seu papel funcional poderia estar ligado a processos celulares relacionados com a organização e/ ou a acidificação da membrana (Sadlova *et al.* 2010, Moore *et al.* 2011).

No trabalho de Alcolea *et al.* (2016) foi realizada a validação da expressão de SHERP por duas técnicas distintas: microarranjo de DNA e por PCR quantitativo (qPCR). Na análise por microarranjo de DNA o gene foi mais expresso na fase estacionária de crescimento em meio de cultura comparado à amostra da pós-infecção no inseto. No entanto por qPCR não houve diferença significativa, semelhantemente aos nossos resultados com o par *L. i. chagasi-L. longipalpis*. Em *L. infantum* foi demonstrado que fase de crescimento estacionário de cultura possuem maior expressão de SHERP que na fase exponencial.

Avaliamos também a expressão gênica de SHERP de *L. i. chagasi* durante a infecção em *L. longipalpis* e vimos que o gene possui expressão diminuída nos horários de 6h e 24h pós-infecção comparado aos próximos horários analisados, 72h e 144h pós-infecção. Isso demonstra que SHERP também é modulado dentro do inseto e sua expressão é aumentada próximo ao momento de metaciclogênese.

A Proteína de Membrana dos Kinetoplastídeos-11(KMP-11) de *Leishmania* é também encontrada em associação com as estruturas de membrana, tais como a superfície da célula, bolsa flagelar e vesículas intracelulares. Ao nível proteico esse gene é mais expresso em formas infectivas, promastigotas metacíclicas e amastigotas, indicando sua importância para infecção do hospedeiro vertebrado (Matos *et al.* 2010). Além disso, essa proteína é também identificada como um fator de virulência, pois foi demonstrada sua capacidade de atuar no sistema imune do hospedeiro vertebrado por estimular a produção de interleucina 10 (IL-10).

IL-10 é a principal responsável por reduzir a produção de citocinas do tipo 1, tais como interleucina 2, interleucina 12, TNF- α e IFN- γ , sendo todas responsáveis por causar dano celular e morte de parasitas intracelulares. Deste modo, ao estimular IL-10, a proteína KMP-11 do parasita atua na imunossupressão do macrófago (Matos *et al.* 2010, Lacerda *et al.* 2012).

No entanto, não vimos modulação ao nível transcricional de KMP-11 por *L. i. chagasi* ao longo da infecção em *L. longipalpis*. Entre as formas do parasita crescidos em meio de cultura, fase exponencial e estacionário, também não houve expressão diferencial do gene.

Todos os gêneros de protozoários parasitas são auxotróficos para purinas e consequentemente, cada gênero possui seu mecanismo de resgate a partir do hospedeiro. Sendo assim, a aquisição de purinas do ambiente é uma tarefa crucial para a sobrevivência do parasita. A *Leishmania* possui uma xantina fosforribosiltransferase (XPRT) que é essencial nesta via de aquisição de purinas (Jardim *et al.* 1999, Boitz e Ullman 2006). XPRT é localizado no citosol e no glicossomo da *Leishmania*. Carter *et al.* (2010) mostraram que em ambientes carentes de purinas a expressão gênica de XPRT foi aumentada.

Neste trabalho nós verificamos a expressão gênica de XPRT de *L. i. chagasi* em *L. longipalpis*. Interessantemente o gene tem sua expressão reduzida apenas 168h pós-infecção. Como mencionado anteriormente, formas metacíclicas não se replicam (Gossage *et al.* 2003) e, portanto, não necessitam de nucleotídeos para proliferação.

O sistema ubiquitina-proteassoma existe universalmente nos eucariotas e é crucial em processos biológicos do parasita, tais como diferenciação celular e proliferação, passos essenciais na colonização do hospedeiro (Paugam *et al.* 2003, Munoz *et al.* 2015). O funcionamento clássico do sistema é composto de moléculas de ubiquitina que formam cadeias de poliubiquitina estabelecendo conjugados com as proteínas alvo, estes são geralmente reconhecidos e degradados pelo proteassoma (Weissman 2001).

Estudos realizados para validar a importância do sistema ubiquitina-proteassoma em *Leishmania* foram realizados utilizando inibidores específicos de proteassoma, como lactacistina ou sua forma ativa clasto-lactacistina β -lactona (Munoz *et al.* 2015). Os resultados dos experimentos demonstraram que desativando o proteassoma em ambas as formas do parasita, promastigota e amastigota, ele perdia a capacidade de crescimento e replicação (Robertson 1999, Silva-Jardim *et al.* 2004).

No presente estudo, nós verificamos que existe um pico da expressão do gene de poliubiquitina de *L. i. chagasi* em 144h pós-infecção. É relevante destacar que ao longo da infecção o parasita passa por diversas modificações morfológicas e especialmente na sua

forma metacíclicas isso é mais notável, visto que seu flagelo é mais longo e seu corpo celular é de tamanho reduzido (Kamhawi 2006). Visto isso, é possível que esse pico na expressão de poliubiquitina esteja relacionado a esta grande mudança morfológica do parasita. Interessantemente vemos que entre as fases de crescimento exponencial e estacionário dos parasitas crescidos em meio de cultura também existe uma diferença na expressão, sendo ela reduzida na fase estacionária.

A peroxirredoxina possui um papel importante contra o estresse oxidativo atuando na desintoxicação de peróxidos que são nocivos para o parasita. Promastigotas entram em contato com alta quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas durante a digestão sanguínea do inseto (Diaz-Albiter *et al.* 2012) e amastigotas também enfrentam estresse oxidativo dentro do macrófago. Além disso, a peroxirredoxina atua na sinalização específica em processos de proliferação e diferenciação do parasita (Castro *et al.* 2002, da Fonseca Pires *et al.* 2014). Avaliamos a expressão gênica de peroxirredoxina de *L. i. chagasi* em *L. longipalpis* e em parasitas crescidos em meio de cultura, e em ambas situações a expressão deste gene é constante.

A caseína cinase 1 (CK1) em eucariontes possui importante papel em vias de sinalização, como na diferenciação e proliferação celular. Em *L. major* a CK1 isoforma 2 é liberado por promastigotas via exossomos e é capaz de modular a resposta imune de macrófagos estimulando a degradação da cadeia IFNAR1, atenuando a sinalização IFN α / IFN β (Ivashkiv e Donlin 2014). A *Leishmania* possui 6 isoformas de CK1, sendo a isoforma 4 a única que possui peptídeo sinal e um recente trabalho demonstrou seu papel no crescimento e virulência do parasita (Dan-Goor *et al.* 2013). No entanto, em nossos resultados não houve expressão diferencial do gene de *L. i. chagasi* ao longo da infecção em *L. longipalpis*.

O fator de alongação1-alfa (EF1- α) é uma GTPase envolvida na regulação polipeptídica de alongamento durante a tradução. Além disso, está relacionado com a ligação e ativação de tirosina fosfatase 1 (SHP-1) do macrófago que age como repressor da via Toll e Jak/STAT, imunossuprimindo o hospedeiro (Nandan *et al.* 2002). No presente trabalho verificamos a expressão do gene de *L. i. chagasi* em *L. longipalpis*. Interessantemente o gene foi mais expresso 6h pós-infecção. Isso indica que o gene pode estar envolvido no processo inicial de estabelecimento da infecção no hospedeiro invertebrado.

A GP63 é uma molécula amplamente estudada e muito se sabe a respeito de sua importância para *Leishmania* durante a infecção do hospedeiro vertebrado (Olivier *et al.* 2012). Em um estudo de infecção de *L. major* nocaute para GP63 em *P. dubosqui* não foi detectada diferença na sobrevivência da *Leishmania* quando comparado às selvagens (Joshi *et*

al. 2002). Porém, quando foram realizadas infecções em *L. longipalpis* com *L. amazonensis* que subexpressam GP63, a sobrevivência dos parasitas foi afetada nos horários iniciais da infecção (Hajmova *et al.* 2004). Em estudos recentes do nosso grupo, foi demonstrado que GP63 pode participar da modulação da resposta imune do vetor (Tinoco-Nunes 2014). Este trabalho sugere que GP63 possa ativar uma molécula do inseto homóloga a SHP-1, que é um repressor da via Toll e Jak/STAT. Sendo assim, pode ocorrer uma imunossupressão do hospedeiro invertebrado causada pelos parasitas (Tinoco-Nunes 2014).

Deste modo, ainda não estão totalmente investigadas as possíveis funções de GP63 de *Leishmania* no inseto, e se estas funções seriam diferentes se comparadas entre vetores restritivos e permissivos. Inbar *et al.* (2017) observaram que *L. major* expressa mais GP63 nas formas metacíclicas dentro de *P. duboscqi*. Semelhantemente, no presente trabalho os resultados demonstram que a expressão gênica de GP63 é reduzida nos horários após a infecção e é mais expressa no horário inicial da metaciclogênese indicando que, além de uma possível função na modulação da imunidade do inseto, ainda dentro do inseto a *Leishmania* se prepara para o momento do contato com o hospedeiro vertebrado.

Leishmania fica exposta aos microorganismos presentes no tubo digestivo do inseto. Sabe-se que a presença de *Leishmania* bloqueia o efeito letal da bactéria *Serratia marcescens* em *L. longipalpis* (Sant'Anna *et al.* 2014). Além disso, Kelly *et al.* (2017) mostraram que a ausência de bactérias em *L. longipalpis* impede a metaciclogênese e crescimento de *L. infantum* em momentos mais tardios da infecção (9-12 dias pós-infecção).

Em outro trabalho recentemente publicado, Louradour *et al.* (2017) analisaram o papel da microbiota no processo de infecção no par *P. duboscqi* e *L. major* e também viram que a ausência de bactérias impede o desenvolvimento de formas metacíclicas do parasita. Além disso, este trabalho sugere que este efeito observado ocorre devido à exposição dos parasitas à alta concentração de açúcar na parte anterior do tubo digestivo, devido à ausência da microbiota para consumi-lo, gerando um ambiente osmótico letal para os parasitas. Sendo assim, a microbiota também pode influenciar no processo de infecção da *Leishmania*.

Vimos que, como observado em outros trabalhos, a quantidade de *Leishmania* não varia até 6 dias pós-infecção (Kelly *et al.* 2017, Louradour *et al.* 2017). Além disso, observamos que na redução de bactérias do tubo digestivo do inseto por tratamento com antibiótico ocorre o aumento da expressão dos transportadores de glicose. Isso indica que a *Leishmania* diante da exposição a altas concentrações de açúcar tenta equilibrar a osmolaridade importando mais hexoses. Ocorre também à diminuição da expressão de SHERP, em 72h e 144h, e é um gene que aumenta ao longo da metaciclogênese, isso indica

que houve perturbação no processo de diferenciação, como observado por Kelly *et al.* (2017) e Louradour *et al.* (2017).

Leishmania não realiza síntese *de novo* de colesterol, por isso a obtenção deste lipídeo pelo parasita ocorre por meio de sua obtenção do ambiente. LDL é a principal fonte de esteróis e fosfolipídios para o parasita, sendo captado do hospedeiro vertebrado via LDL-R (Soares e de Souza 1991, Coppens e Courtoy 2000, Andrade-Neto *et al.* 2011, Uttaro 2014). No entanto, os trabalhos até o momento publicados não relatam se esse gene também é importante no processo de infecção do hospedeiro invertebrado.

Vimos que LDL-R é mais expresso 144h pós-infecção. *In vitro* a *Leishmania* transfectada que superexpressa LDL-R no período de 5 dias em meio de cultura sem pressão seletiva por antibióticos não há perda da superexpressão do gene e o crescimento dos parasitas também não é afetado. Indicando ser possível utilizá-los em experimentos de infecção artificial de insetos.

Portanto, infectamos o inseto com estas *Leishmanias* transfectadas que superexpressam LDL-R e avaliamos a carga parasitária ao longo da infecção e vimos que não houve alteração comparado a infecção com *Leishmania* selvagem. Além disso, analisamos a expressão de LDL-R e vimos que também dentro do inseto não houve perda da superexpressão do gene pelo parasita. Tomados em conjunto, esses dados mostram que o LDL-R aparentemente não possui papel crucial no processo de infecção do inseto e é mais expresso nos horários finais da infecção, onde o parasita se prepara pra infecção do hospedeiro vertebrado.

6. CONCLUSÕES

- GTs e AAP3: são mais expressos em momentos que coincidem com maior proliferação do parasita (1h e 72h pós-infecção), indicando maior necessidade de aporte de nutrientes;
- SHERP, GP63 e LDL-R são importantes na metacicloênese no hospedeiro invertebrado ou invasão dos macrófagos no hospedeiro vertebrado possuem maior expressão em momentos tardios da infecção no inseto, sugerindo que o parasita expressa esses genes tornando-se mais apto a infectar o próximo hospedeiro;
- Ef1-alfa é mais expresso nos horários iniciais da infecção no inseto, indicando ser importante na imunomodulação do hospedeiro invertebrado;
- XPRT tem expressão reduzida em horário tardio da infecção, momento que o parasita não replica mais, indicando que o parasita pode suspender metabolismo de purinas neste estágio da infecção;
- Redução da microbiota bacteriana indica alteração na expressão de genes da *Leishmania*. A expressão de genes envolvidos com metabolismo de açúcares e aminoácidos (GTs e AAP3) foi aumentada em horários tardios da infecção. Alguns genes envolvidos com proliferação e diferenciação tiveram expressão aumentada em 72h pós-infecção. Alguns genes envolvidos na metacicloênese, transmissão ou processo de infecção do parasita no hospedeiro vertebrado tiveram sua expressão reduzida nos horários de 72h e 144h pós-infecção (SHERP, quitinase e LDL-R);
- *Leishmania* transfectada que superexpressa LDL-R parece não alterar a carga parasitária ao longo da infecção, indicando não ser importante no processo de infecção do inseto.

7. REFERÊNCIAS

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. Dominguez, V. Parro, M. Jimenez, R. Molina and V. Larraga (2016). "Influence of the Microenvironment in the Transcriptome of *Leishmania infantum* Promastigotes: Sand Fly versus Culture." PLoS Negl Trop Dis **10**(5): e0004693.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. J. Gomez, I. Moreno, M. Dominguez, V. Parro and V. Larraga (2010). "Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage." Int J Parasitol **40**(13): 1497-1516.

Alcolea, P. J., A. Alonso, M. J. Gomez, M. Postigo, R. Molina, M. Jimenez and V. Larraga (2014). "Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: from the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte." BMC Genomics **15**: 849.

Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer and W. H. O. L. C. Team (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.

Andrade-Neto, V. V., N. N. Cicco, E. F. Cunha-Junior, M. M. Canto-Cavalheiro, G. C. Atella and E. C. Torres-Santos (2011). "The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis." Acta Trop **119**(2-3): 194-198.

Bastin, P., A. Stephan, J. Raper, J. M. Saint-Remy, F. R. Opperdoes and P. J. Courtoy (1996). "An M(r) 145,000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 43-56.

Bates, P. A. (2008). "Leishmania sand fly interaction: progress and challenges." Curr Opin Microbiol **11**(4): 340-344.

Bates, P. A., J. Depaquit, E. A. Galati, S. Kamhawi, M. Maroli, M. A. McDowell, A. Picado, P. D. Ready, O. D. Salomon, J. J. Shaw, Y. M. Traub-Cseko and A. Warburg (2015). "Recent advances in phlebotomine sand fly research related to Leishmaniasis control." Parasit Vectors **8**(1): 712.

Bates, P. A. and M. E. Rogers (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*." Curr Mol Med **4**(6): 601-609.

Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K. A. Siminovitch and M. Olivier (1999). "Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." Eur J Immunol **29**(11): 3737-3744.

Boitz, J. M. and B. Ullman (2006). "A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of *Leishmania donovani*." J Biol Chem **281**(23): 16084-16089.

Boitz, J. M. and B. Ullman (2013). "Adenine and adenosine salvage in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **190**(2): 51-55.

Brazil, R. P. B., B.G. (2003). *Biologia de flebotomíneos neotropicais. Flebotomíneos do Brasil*. E. F. L. Rangel, R. Rio de Janeiro, Brasil, Editora Fiocruz: 257-270.

Burchmore, R. J. and S. M. Landfear (1998). "Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*." J Biol Chem **273**(44): 29118-29126.

Carter, N. S., P. A. Yates, S. K. Gessford, S. R. Galagan, S. M. Landfear and B. Ullman (2010). "Adaptive responses to purine starvation in *Leishmania donovani*." Mol Microbiol **78**(1): 92-107.

Castro, H., C. Sousa, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohe and A. M. Tomas (2002). "Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*." Free Radic Biol Med **33**(11): 1552-1562.

CDC, C. f. D. C. a. P. (2013, 01/2013). "Parasites - Leishmaniasis." Retrieved 05/05/2015, 2015, from <http://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>.

Coppens, I. and P. J. Courtoy (2000). "The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments." Annu Rev Microbiol **54**: 129-156.

Cortazar, T. M. and J. Walker (2004). "[Genetic manipulation and the study of the protozoan parasite *Leishmania*]." Biomedica **24**(4): 438-455.

da Fonseca Pires, S., L. C. Fialho, Jr., S. O. Silva, M. N. Melo, C. C. de Souza, W. L. Tafuri, O. Bruna Romero and H. M. de Andrade (2014). "Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach." J Proteome Res **13**(4): 1860-1872.

Dan-Goor, M., A. Nasereddin, H. Jaber and C. L. Jaffe (2013). "Identification of a secreted casein kinase 1 in *Leishmania donovani*: effect of protein over expression on parasite growth and virulence." PLoS One **8**(11): e79287.

Di-Blasi, T., A. R. Lobo, L. M. Nascimento, J. L. Cordova-Rojas, K. Pestana, M. Marin-Villa, A. J. Tempone, E. L. Telleria, M. Ramalho-Ortigao, D. McMahon-Pratt and Y. M. Traub-Cseko (2015). "The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for *Leishmania*-Sand Fly Interaction." Vector Borne Zoonotic Dis **15**(3): 202-209.

Diaz-Albiter, H., M. R. Sant'Anna, F. A. Genta and R. J. Dillon (2012). "Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the sand phlebotomine fly *Lutzomyia longipalpis*." J Biol Chem **287**(28): 23995-24003.

Dillon, R. J. and E. el-Kordy (1997). "Carbohydrate digestion in sandflies: alpha-glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **116**(1): 35-40.

Dixon, H., C. D. Ginger and J. Williamson (1971). "The lipid metabolism of blood and culture forms of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma rhodesiense*." Comp Biochem Physiol B **39**(2): 247-266.

Dixon, H., C. D. Ginger and J. Williamson (1972). "Trypanosome sterols and their metabolic origins." Comp Biochem Physiol B **41**(1): 1-18.

Doehl, J. S., J. Sadlova, H. Aslan, K. Pruzinova, S. Metangmo, J. Votypka, S. Kamhawi, P. Volf and D. F. Smith (2017). "Leishmania HASP and SHERP Genes Are Required for In Vivo Differentiation, Parasite Transmission and Virulence Attenuation in the Host." PLoS Pathog **13**(1): e1006130.

Goldman-Pinkovich, A., C. Balno, R. Strasser, M. Zeituni-Molad, K. Bendelak, D. Rentsch, M. Ephros, M. Wiese, A. Jardim, P. J. Myler and D. Zilberstein (2016). "An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in Leishmania during Macrophage Invasion." PLoS Pathog **12**(4): e1005494.

Gossage, S. M., M. E. Rogers and P. A. Bates (2003). "Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle." Int J Parasitol **33**(10): 1027-1034.

Graca-Souza, A. V., C. Maya-Monteiro, G. O. Paiva-Silva, G. R. Braz, M. C. Paes, M. H. Sorgine, M. F. Oliveira and P. L. Oliveira (2006). "Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods." Insect Biochem Mol Biol **36**(4): 322-335.

Hajmova, M., K. P. Chang, B. Kolli and P. Volf (2004). "Down-regulation of gp63 in Leishmania amazonensis reduces its early development in Lutzomyia longipalpis." Microbes Infect **6**(7): 646-649.

Honigberg, B. M. (1963). A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. Progress in Protozoology: proceedings of the first International Congress on protozoology held at Prague. A. Press.

Inbar, E., V. K. Hughitt, L. A. Dillon, K. Ghosh, N. M. El-Sayed and D. L. Sacks (2017). "The Transcriptome of Leishmania major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector." MBio **8**(2).

Ivashkiv, L. B. and L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." Nat Rev Immunol **14**(1): 36-49.

Jardim, A., S. E. Bergeson, S. Shih, N. Carter, R. W. Lucas, G. Merlin, P. J. Myler, K. Stuart and B. Ullman (1999). "Xanthine phosphoribosyltransferase from Leishmania donovani. Molecular cloning, biochemical characterization, and genetic analysis." J Biol Chem **274**(48): 34403-34410.

Joshi, M. B., M. E. Rogers, A. M. Shakarian, M. Yamage, S. A. Al-Harthi, P. A. Bates and D. M. Dwyer (2005). "Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of LmexCht1: the chitinase of the human pathogen, Leishmania mexicana." J Biol Chem **280**(5): 3847-3861.

Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks and W. R. McMaster (2002). "Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor." Mol Biochem Parasitol **120**(1): 33-40.

Kamhawi, S. (2006). "Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?" Trends Parasitol **22**(9): 439-445.

Kelly, P. H., S. M. Bahr, T. D. Serafim, N. J. Ajami, J. F. Petrosino, C. Meneses, J. R. Kirby, J. G. Valenzuela, S. Kamhawi and M. E. Wilson (2017). "The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*." MBio **8**(1).

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Killick-Kendrick, R., D. H. Molyneux and R. W. Ashford (1974). "Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly." Proc R Soc Lond B Biol Sci **187**(1089): 409-419.

Killick-Kendrick, R., D. H. Molyneux and R. W. Ashford (1974). "Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly." Trans R Soc Trop Med Hyg **68**(4): 269.

Kumar, G. A., M. Jafurulla and A. Chattopadhyay (2016). "The membrane as the gatekeeper of infection: Cholesterol in host-pathogen interaction." Chem Phys Lipids **199**: 179-185.

Lacerda, D. I., L. Cysne-Finkelstein, M. P. Nunes, P. M. De-Luca, S. Genestra Mda, L. L. Leon, M. Berredo-Pinho, L. Mendonca-Lima, D. C. Matos, M. A. Medeiros and S. C. Mendonca (2012). "Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(2): 238-245.

Lainson, R. (2010). "The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy." Revista Pan-Amazônica de Saúde **1**: 13-32.

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.

Landfear, S. M. (2011). "Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa." Eukaryot Cell **10**(4): 483-493.

Lemaitre, B., J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1997). "*Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14614-14619.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Louradour, I., C. C. Monteiro, E. Inbar, K. Ghosh, R. Merkhofer, P. Lawyer, A. Paun, M. Smelkinson, N. Secundino, M. Lewis, D. Erram, L. Zurek and D. Sacks (2017). "The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*." Cell Microbiol.

Lutz, A. and A. Neiva (1912). "Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil." Memórias Instituto Oswaldo Cruz **4**: 84-95.

Matos, D. C., L. A. Faccioli, L. Cysne-Finkelstein, P. M. Luca, S. Corte-Real, G. R. Armoa, E. M. Lemes, D. Decote-Ricardo and S. C. Mendonca (2010). "Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis." Mem Inst Oswaldo Cruz **105**(3): 341-347.

Ministério da Saúde, B. (2007). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília/DF, Brasil, 2ª edição atualizada – 3ª reimpressão – 2013.

Ministério da Saúde, B. (2014). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília/DF, Brasil, 1ª edição – 5ª reimpressão – 2014.

Molyneux, D. H. (1977). "Vector relationships in the Trypanosomatidae." Adv Parasitol **15**: 1-82.

Moore, B., A. J. Miles, C. Guerra-Giraldez, P. Simpson, M. Iwata, B. A. Wallace, S. J. Matthews, D. F. Smith and K. A. Brown (2011). "Structural basis of molecular recognition of the *Leishmania* small hydrophilic endoplasmic reticulum-associated protein (SHERP) at membrane surfaces." J Biol Chem **286**(11): 9246-9256.

Munoz, C., J. San Francisco, B. Gutierrez and J. Gonzalez (2015). "Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites." Biomed Res Int **2015**: 141526.

Murtagh, F. and P. Legendre (2014). "Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion?" J. Classif. **31**(3): 274-295.

Nandan, D., A. Cherkasov, R. Sabouti, T. Yi and N. E. Reiner (2003). "Molecular cloning, biochemical and structural analysis of elongation factor-1 alpha from *Leishmania donovani*: comparison with the mammalian homologue." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 646-652.

Nandan, D., T. Yi, M. Lopez, C. Lai and N. E. Reiner (2002). "Leishmania EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation." J Biol Chem **277**(51): 50190-50197.

Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect **14**(15): 1377-1389.

PAHO, P. A. H. O. (2014, 06/2014). "Leishmaniasis." Retrieved 05/2015, 2015, from <http://www.paho.org/Leishmaniasis>.

Paugam, A., A. L. Bulteau, J. Dupouy-Camet, C. Creuzet and B. Friguet (2003). "Characterization and role of protozoan parasite proteasomes." Trends Parasitol **19**(2): 55-59.

Pimenta, P. F., G. B. Modi, S. T. Pereira, M. Shahabuddin and D. L. Sacks (1997). "A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut." Parasitology **115** (Pt 4): 359-369.

Pucadyil, T. J., P. Tewary, R. Madhubala and A. Chattopadhyay (2004). "Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in Leishmaniasis." Mol Biochem Parasitol **133**(2): 145-152.

Ramalho-Ortigao, M., E. M. Saraiva and Y. M. Traub-Cseko (2010). "Sand fly-interactions: long relationships are not necessarily easy." Open Parasitol J **4**: 195-204.

Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance and L. J. Goad (2003). "Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 129-142.

Robertson, C. D. (1999). "The *Leishmania mexicana* proteasome." Mol Biochem Parasitol **103**(1): 49-60.

Rodriguez-Contreras, D., H. Aslan, X. Feng, K. Tran, P. A. Yates, S. Kamhawi and S. M. Landfear (2015). "Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania mexicana*: a potential glucose sensor." FASEB J **29**(1): 11-24.

Rodriguez-Contreras, D., X. Feng, K. M. Keeney, H. G. Bouwer and S. M. Landfear (2007). "Phenotypic characterization of a glucose transporter null mutant in *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **153**(1): 9-18.

Rodriguez, N. E., U. Gaur and M. E. Wilson (2006). "Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages." Cell Microbiol **8**(7): 1106-1120.

Rogers, M. E., M. L. Chance and P. A. Bates (2002). "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Parasitology **124**(Pt 5): 495-507.

Rogers, M. E., M. Hajmova, M. B. Joshi, J. Sadlova, D. M. Dwyer, P. Volf and P. A. Bates (2008). "*Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice." Cell Microbiol **10**(6): 1363-1372.

Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson and P. A. Bates (2004). "Transmission of cutaneous Leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG." Nature **430**(6998): 463-467.

Sacks, D. and S. Kamhawi (2001). "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis." Annu Rev Microbiol **55**: 453-483.

Sacks, D. L., P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider and S. J. Turco (1995). "Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J Exp Med **181**(2): 685-697.

Sadlova, J., H. P. Price, B. A. Smith, J. Votypka, P. Volf and D. F. Smith (2010). "The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*." Cell Microbiol **12**(12): 1765-1779.

Sant'Anna, M. R., H. Diaz-Albiter, K. Aguiar-Martins, W. S. Al Salem, R. R. Cavalcante, V. M. Dillon, P. A. Bates, F. A. Genta and R. J. Dillon (2014). "Colonisation resistance in the sand fly gut: Leishmania protects Lutzomyia longipalpis from bacterial infection." Parasit Vectors **7**: 329.

Saraiva, R. G., S. Kang, M. L. Simoes, Y. I. Anglero-Rodriguez and G. Dimopoulos (2016). "Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity." Dev Comp Immunol **64**: 53-64.

Schlein, Y. (1986). "Sandfly diet and Leishmania." Parasitol Today **2**(6): 175-177.

Schlein, Y. and R. L. Jacobson (1998). "Resistance of Phlebotomus papatasi to infection with Leishmania donovani is modulated by components of the infective bloodmeal." Parasitology **117** (Pt 5): 467-473.

Silva-Jardim, I., M. F. Horta and F. J. Ramalho-Pinto (2004). "The Leishmania chagasi proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages." Acta Trop **91**(2): 121-130.

Soares, M. J. and W. de Souza (1991). "Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by Trypanosoma cruzi." Parasitol Res **77**(6): 461-468.

Svarovska, A., T. H. Ant, V. Seblova, L. Jecna, S. M. Beverley and P. Volf (2010). "Leishmania major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors." PLoS Negl Trop Dis **4**(1): e580.

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.

Telleria, E. L., M. R. Sant'Anna, J. R. Ortigao-Farias, A. N. Pitaluga, V. M. Dillon, P. A. Bates, Y. M. Traub-Cseko and R. J. Dillon (2012). "Caspar-like gene depletion reduces Leishmania infection in sand fly host Lutzomyia longipalpis." J Biol Chem **287**(16): 12985-12993.

Tinoco-Nunes, B. (2014). CARACTERIZAÇÃO DE VIAS DE IMUNIDADE EM LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE). INSTITUTO OSWALDO CRUZ.

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.

Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas (2017). "Leishmaniasis: a review." F1000Res **6**: 750.

Uttaro, A. D. (2014). "Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **196**(1): 61-70.

Volf, P., M. Hajmova, J. Sadlova and J. Votypka (2004). "Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models." Int J Parasitol **34**(11): 1221-1227.

Volf, P. and J. Myskova (2007). "Sand flies and Leishmania: specific versus permissive vectors." Trends Parasitol **23**(3): 91-92.

Walters, L. L., G. B. Modi, G. L. Chaplin and R. B. Tesh (1989). "Ultrastructural development of Leishmania chagasi in its vector, Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)." Am J Trop Med Hyg **41**(3): 295-317.

Ward, J. H. (1963). "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function." Journal of the American Statistical Association **58**(301): 236-244.

Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 169-178.

WHO, W. H. O. (2017, 04/2017). "Leishmaniasis." Retrieved 04/2017, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Yang, S., S. Lin, G. D. Kelen, T. C. Quinn, J. D. Dick, C. A. Gaydos and R. E. Rothman (2002). "Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens." J Clin Microbiol **40**(9): 3449-3454.

Zakai, H. A., M. L. Chance and P. A. Bates (1998). "In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana." Parasitology **116** (Pt 4): 305-309.