

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

**Introdução de *Wolbachia* em linhagens celulares de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e sua interação com *Leishmania infantum***

por

**Daniela da Silva Gonçalves**

**Belo Horizonte**

**2018**

**TESE DCS-IRR D.S.GONÇALVES 2018**

**DANIELA DA SILVA GONÇALVES**

**Introdução de *Wolbachia* em linhagens celulares de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e sua interação com *Leishmania infantum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Luciano Andrade Moreira  
Coorientação: Maurício Roberto Viana Sant'Anna (UFMG)

**Belo Horizonte  
2018**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

G635i  
2018 Gonçalves, Daniela da Silva.

Introdução de Wolbachia em linhagens celulares de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e sua interação com *Leishmania infantum* / Daniela da Silva Gonçalves. – Belo Horizonte, 2018.

XIV, 114 f.: il.; 210 x 297mm

Bibliografia: f. 85-95

Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciência da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular – Transmissão de patógenos.

1. Wolbachia 2. *Lutzomyia longipalpis* 3. *Leishmania infantum* I. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação) . III. Sant' Anna, Maurício Roberto Viana (Coorientação)

ODD – 22. ed. – 616.918

“Whatever you can do, or dream you can do, begin it.  
Boldness has genius, power and magic in it.  
Begin it now.”

(J.W. von Goethe)



Dedico este trabalho à minha mãe (in memoriam), pai, irmã,  
meus familiares e à todas as amizades pelo incentivo,  
apoio, ajuda, paciência e momentos de alegria.

Muito obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Sempre agradeço à minha mãe que, mesmo não estando mais ao meu lado, sempre me apoiou, me incentivou a estudar e me ensinou que conhecimento é algo que ninguém tira. Certamente ela estaria feliz e orgulhosa por mais essa vitória.

À minha irmã, ao meu pai e à Graça que, apesar da distância durante grande parte do meu doutorado, sempre estiveram presentes e torcendo por mim com muito amor, carinho, por acreditar no meu potencial e apoio em momentos importantes da minha vida. Amo vocês!

Ao Luciano, meu querido orientador, pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão, orientação, disposição para ajudar, pelo suporte durante o tempo em que fiquei do outro lado do mundo para realizar este projeto e a todos os ensinamentos e conselhos que vão muito além deste trabalho. Agradeço de coração por tudo.

To David and all the members of the Hack Family, for the support and aid in really happy and hard moments I had in Australia, and, more than that, for the welcome, love and affection you gave. I know more than ever I can count on you all.

Ao Mauricio, meu coorientador, que trouxe a ideia deste projeto, fez com que despertasse a vontade de aprender coisas novas e contribuiu muito para que esta tese fosse realizada, apesar da distância.

A todos da Uni Monash que contribuíram bastante para que tudo fosse realizado. A todos os ensinamentos, amizade e conselhos, tanto na parte profissional para realização dos experimentos e adquirir novos conhecimentos, quanto na parte pessoal. Em especial ao Scott por me aceitar no seu laboratório; ao Inaki por toda a ajuda e orientação na parte celular; À eterna “família” do Insetário do Renê Rachou e à Marcele por me ensinar muita coisa sobre *Leishmania*. Enfim, todos vocês são mais que especiais!

À todas as amizadas que fiz na Austrália, à crazy crew RSF pelos momentos de distração; às amizadas que mantenho no Brasil e em qualquer outro lugar do mundo, pelo carinho, compreensão e torcida para que eu alcance o que há de melhor.

À Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou e ao programa de Doutorado Sanduiche da CAPES pelo curso e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e com um grande conhecimento. A todos os colaboradores deste trabalho, incluindo Yara, Erich e Andrea, pelo auxílio para a realização deste projeto.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho:  
MUITO OBRIGADA!

## **AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Agradeço às agências de fomento CAPES e Ministério da Saúde (DECIT/DEVIT) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho, além da Universidade Monash na Austrália e à Fundação Bill e Melinda Gates através do Instituto Nacional de Saúde e do programa de Controle de Transmissão através de Vetores (VCTR).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001  
"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

À CAPES, pela concessão da minha bolsa de doutorado e pelo Programa Ciências Sem Fronteiras.

## RESUMO

As leishmanioses são importantes doenças negligenciadas causadas pelo parasito *Leishmania* spp. e são transmitidas por flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor do agente causador de leishmaniose visceral nas Américas. As metodologias de controle da leishmaniose baseadas no tratamento dos doentes, controle vetorial utilizando-se inseticidas e eutanásia de cães infectados não são eficientes, resultando em cerca de 1,5 milhão de casos registrados anualmente em todo o mundo, o que aponta uma necessidade de se desenvolver novas estratégias e intervenções para o controle da doença. A bactéria *Wolbachia pipientis* está sendo usada para o controle de arbovírus transmitidos por mosquitos, como os vírus da Dengue e Zika, e sua introdução em vetores de patógenos causadores de doenças foi eficaz contra parasitos como o *Plasmodium*. Neste trabalho, mostramos o primeiro estabelecimento bem-sucedido da *W. pipientis* em duas diferentes linhagens celulares embrionárias de *L. longipalpis*, LL-5 e Lulo, e analisamos seus efeitos no sistema imune inato destas células, seguido pela interação *in vitro* de *Leishmania infantum* com células transfectadas por *W. pipientis*. Nossos resultados mostram que após diversas tentativas, a cepa wMel não foi capaz de estabelecer uma infecção estável em nenhuma das linhagens celulares de flebotomíneos. Por outro lado, a cepa wMelPop-CLA foi capaz de infectar e se manter nas células Lulo em alta densidade, enquanto que em LL-5 em níveis mais baixos. As células LL-5 responderam às cepas wMel e wMelPop-CLA nas primeiras 72 horas pós-infecção, através da expressão de peptídeos antimicrobianos e óxido nítrico, resultando na diminuição da detecção de *W. pipientis* nos estágios iniciais da infecção. A presença de *W. pipientis*, após uma infecção estável em LL-5, não causou nenhum efeito na expressão de genes do sistema imune. Já nas células Lulo com infecção estável por *W. pipientis*, a expressão de genes de imunidade envolvidos com a regulação negativa das vias imunes inatas de IMD, Toll e Jak-Stat foi significativamente reduzida, em comparação com o controle não infectado, sugerindo ativação imune após transinfecção por *W. pipientis*. Além disso, a transinfecção por *W. pipientis* não promoveu um efeito negativo sobre a carga parasitária de *L. infantum* nessas células. Interessantemente, a presença de *W. pipientis* diminuiu significativamente a carga viral de um dos vírus endógenos presentes naturalmente nesta linhagem celular, em comparação com o controle não infectado. Como conclusão, as respostas imunes iniciais fortes observadas em células LL-5 podem explicar a ineficiência de infecções estáveis e com alta densidade nessas células. Em relação às células Lulo, a alta densidade indicou que esta linhagem se apresentou mais permissiva à infecção por *W. pipientis*, causando um efeito no sistema imune inato, mas não contra a interação *in vitro* de *L. infantum*. Isto estabelece as células Lulo como um bom sistema para a adaptação de *W. pipientis* em *L. longipalpis*.

**Palavras-chave:** *Wolbachia*, *Lutzomyia longipalpis*, célula Lulo, célula LL-5, *Leishmania infantum*

## ABSTRACT

Leishmaniasis are important neglected diseases caused by the parasite *Leishmania* spp. and transmitted by phlebotomine, with *Lutzomyia longipalpis* being the main vector of visceral leishmaniasis in the Americas. The methods for Leishmaniasis control are based on patient treatment, vector control using insecticides and the euthanasia of infected dogs, which are not effective, resulting in about 1.5 millions of recorded cases annually worldwide. This indicates the need for new strategies and interventions for Leishmaniasis control. The bacterium *Wolbachia pipientis* is being used to control mosquito-borne arboviruses, such as Dengue and Zika viruses, and its introduction into invertebrate vectors has been effective against the parasite *Plasmodium*. In this study, we show the first successful establishment of *W. pipientis* into two different embryonic cell lines of *L. longipalpis*, LL-5 and Lulo, and its effects on the innate immune system of these cells has been analyzed, followed by the in vitro interaction of *Leishmania infantum* with the phlebotomine cell lines transfected with *W. pipientis*. Our results shown that after several attempts, the wMel strain was not able to establish a stable infection in any of the phlebotomine cell lines. On the other hand, the wMelPop-CLA strain was able to infect and maintain stable at high densities into Lulo cells, while into LL-5, the density was kept in lower levels. The immune system of LL-5 cells responded to the wMel and wMelPop-CLA strains in the first 72 hours post-infection, through the expression of antimicrobial peptides and nitric oxide, resulting in decreased detection of *W. pipientis* at early stages of infection. After stable infections, the presence of *W. pipientis* had no effect on the expression of immune system genes. In Lulo cells with stable infection, the expression of immune genes that control negatively the immune pathways IMD, Toll e Jak-Stat was significantly decreased, in comparison with the uninfected control, which suggests the activation of immune genes after the *W. pipientis* transinfection. Furthermore, the *W. pipientis* transinfection did not promote a negative effect on the parasite load of *L. infantum* in Lulo cells. Interestingly, the presence of *W. pipientis* significantly decreased the viral load of one of the endogenous viruses in this cell line, compared with the uninfected control. In conclusion, the strong initial immune responses observed in LL-5 cells may explain the inefficiency of stable infections with *W. pipientis* and also its low density. In Lulo, the high density indicated that this line was more permissive to *W. pipientis* infection, causing an effect on the innate immune system, but not against the in vitro interaction of *L. infantum*. This points out Lulo cells as a good system for the adaptation of *W. pipientis* into *L. longipalpis*.

**Key-words:** *Wolbachia*, *Lutzomyia longipalpis*, Lulo cells, LL-5 cells, *Leishmania infantum*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição das leishmanioses baseada em casos notificados.....	17
<b>Figura 2:</b> Ciclo da <i>Leishmania</i> nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. ....	22
<b>Figura 3:</b> O fenômeno da incompatibilidade citoplasmática (IC) em insetos. ....	26
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático representando as principais vias de imunidade de invertebrados.....	29
<b>Figura 5:</b> Gráficos de quantificação absoluta por qPCR de <i>W. pipientis</i> wMel à cada passagem das células.....	54
<b>Figura 6:</b> FISH com as células RML12 e Mos55 infectadas por wMel para validação o protocolo de infecção.....	55
<b>Figura 7:</b> FISH com as células LL-5 e Lulo para confirmar a infecção de <i>W. pipientis</i> .....	56
<b>Figura 8:</b> FISH com as células controle de mosquitos e de flebotomíneos.....	57
<b>Figura 9:</b> Teste de seleção das células de flebotomíneos com maior densidade da cepa da bactéria wMel.....	58
<b>Figura 10:</b> Comparação da densidade de <i>W. pipientis</i> entre as células aderidas e flutuantes nos frascos infectados com wMel.....	59
<b>Figura 11:</b> Comparação das densidades de <i>W. pipientis</i> nas células de flebotomíneos após duas semanas sem passagem.....	60
<b>Figura 12:</b> Acompanhamento das células de flebotomíneos infectadas por wMel, após modificações no protocolo de manutenção das células.....	61
<b>Figura 13:</b> Ensaio de imunofluorescência com as células LL-5 e Lulo infectadas com wMel.....	62
<b>Figura 14:</b> Gráficos representativos da quantificação absoluta da cepa wMelPop-CLA de <i>W. pipientis</i> nas células de flebotomíneos.....	63
<b>Figura 15:</b> Quantificação relativa de <i>W. pipientis</i> , cepa wMelPop-CLA, nas células de flebotomíneos.....	64
<b>Figura 16:</b> Gráfico representativo da variação da densidade de <i>W. pipientis</i> nas células Lulo e LL-5 infectadas com a cepa wMelPop-CLA.....	65

<b>Figura 17:</b> Estágios iniciais das principais vias da resposta imune inata das células LL-5 após infecção por <i>W. pipientis</i> .....	67
<b>Figura 18:</b> Estágios iniciais da expressão de AMPs nas células LL-5 após infecção por <i>W. pipientis</i> .....	68
<b>Figura 19:</b> Estágios iniciais da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo nas células LL-5 após infecção por <i>W. pipientis</i> ... ..	69
<b>Figura 20:</b> Gráfico da quantificação relativa de wMelPop-CLA nas células de flebotomíneos para estudo da expressão gênica do sistema imune.....	70
<b>Figura 21:</b> Resultados da comparação da expressão de genes de imunidade entre as células Lulo infectadas por wMelPop-CLA e não infectadas.....	72
<b>Figura 22:</b> Resultados da comparação da expressão de genes de imunidade entre as células LL-5 infectadas por wMelPop-CLA e não infectadas.....	74
<b>Figura 23:</b> Interação entre <i>Leishmania (L.) infantum</i> e linhagens celulares Lulo infectadas e não infectadas por <i>W. pipientis</i> .....	76
<b>Figura 24:</b> Efeito da bactéria <i>W. pipientis</i> na quantidade de vírus endógenos presentes nas células Lulo.....	77



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Iniciadores utilizados no experimento de expressão gênica em estágios iniciais de infecção de <i>W. pipientis</i> nas células LL-5.....	42
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados para monitoramento e quantificação de <i>W. pipientis</i> nas linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i> .....	43
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados na análise da expressão de genes do sistema imune em células de <i>L. longipalpis</i> infectadas por <i>W. pipientis</i> em comparação com as células controle.....	48
<b>Tabela 4:</b> Iniciadores utilizados para verificar a carga viral em células Lulo infectadas por <i>W. pipientis</i> em comparação com as células controle.....	51

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	16
1.1 As leishmanioses.....	16
1.2 Transmissão.....	18
1.3 O ciclo da <i>Leishmania</i> .....	19
1.4 Prevenção e controle.....	22
1.5 <i>Wolbachia pipientis</i> como medida de controle.....	24
1.6 Linhagens celulares LL-5 e Lulo de <i>L. longipalpis</i> .....	31
2 Justificativa.....	33
3 Objetivos.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 Metodologia.....	35
4.1 Manutenção da cultura de células de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	35
4.2 Extração de <i>W. pipientis</i> a partir de ovários de <i>Aedes aegypti</i> transfectados e infecção em linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i> .....	36
4.3 Extração de cepas de <i>W. pipientis</i> a partir de linhagens celulares de <i>Aedes albopictus</i> transfectadas e infecção em linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i> .....	37
4.4 Estudo da expressão de genes de imunidade inata da linhagem LL-5 em estágios iniciais de infecção por <i>W. pipientis</i> .....	40
4.5 Monitoramento da infecção estável de <i>W. pipientis</i> em linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i> via PCR em tempo real.....	42
4.6 Monitoramento da infecção estável de <i>W. pipientis</i> em linhagens celulares de <i>L. longipalpis</i> via Hibridização Fluorescente in situ (FISH).....	44
4.7 Análise da expressão de genes do sistema imune de <i>L. longipalpis</i> após infecção estável por <i>W. pipientis</i> .....	45
4.8 Interação com <i>Leishmania (L.) infantum</i> em células Lulo controle e células Lulo infectadas por <i>W. pipientis</i> .....	49
4.9 Efeito da presença de <i>W. pipientis</i> na infecção por vírus endógenos em células Lulo.....	50

5 Resultados.....	53
5.1 Transfecção de <i>W. pipientis</i> em células de flebotomíneos.....	53
5.2 Obtenção de infecção estável de <i>W. pipientis</i> em células de <i>L. longipalpis</i> .....	63
5.3 Estudo da expressão de genes ligados ao sistema imune inato em células LL-5 nos estágios iniciais de infecção por <i>W. pipientis</i> .....	66
5.4 Análise da expressão de genes ligados ao sistema imune inato em células de flebotomíneos com infecção estável por <i>W. pipientis</i> .....	69
5.5 Efeito da presença de <i>W. pipientis</i> nas células Lulo na interação com <i>Leishmania (L.) infantum</i> .....	75
5.6 Efeito na carga viral de vírus endógenos em células Lulo após infecção estável por <i>W. pipientis</i> .....	77
6 Discussão.....	78
7 Conclusão .....	84
8 Referências bibliográficas.....	85
9 Anexos.....	96
Anexo 1 – Artigo aceito para publicação.....	97
Anexo 2 – Projeto paralelo.....	110

## 1 Introdução

### 1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças endêmicas em 98 países, com uma incidência anual de 0,7 a 1,2 milhões de casos para as formas tegumentares (figura 1A), cerca de 300.000 novos casos de leishmaniose visceral (figura 1B) e estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas vivam em área de risco de transmissão (PIGOTT et al., 2014; WHO, 2014).

Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Peru, Brasil, Afeganistão, Irã, Paquistão, Colômbia, Argélia, Arábia Saudita e Síria, enquanto que, para leishmaniose visceral, a mesma proporção dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e, para a forma muco cutânea, a grande maioria ocorre no Brasil, Peru e Bolívia (DESJEUX, 1996; WHO, 2016).

As leishmanioses têm sido associadas com áreas rurais, peri-rurais e de pobreza, mas atualmente elas têm se adaptado também à ambientes urbanos, e em várias regiões do globo, como em áreas tropicais, subtropicais, sudeste da Europa, Américas e Ásia (HERWALDT, 1999; MARKLE et al., 2004, PIGOTT et al., 2014).

No Brasil, o primeiro registro da ocorrência de leishmaniose cutânea ocorreu em 1913 em material originado do município de Boa Esperança, no Mato Grosso, e o primeiro relato de leishmaniose visceral ocorreu em 1934, quando foi feito o diagnóstico em pacientes com suspeita de febre amarela (PENNA et al., 1934). Atualmente, no país, cerca de 20.000 e 3.000 casos de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral foram relatados por ano, respectivamente, no período de 2007 a 2015 (PORTAL DA SAÚDE, 2015). A doença se estabeleceu, na década de 80, em centros urbanos do país principalmente devido a migrações internas, à elevada população de cães (importante reservatório urbano) e à alta adaptabilidade da espécie *Lutzomyia longipalpis* (principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas) às áreas com a presença do homem (HARHAY et al, 2011).

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* sp., as quais podem desenvolver para uma das três principais formas da doença: cutânea, muco cutânea ou visceral (WHO, 2016). A forma cutânea, a mais comum das três formas, pode causar feridas crônicas na pele que, se não tratadas, estas não cicatrizam; a muco cutânea, a forma mais desfigurante, afeta principalmente nariz, boca e garganta, o que pode deformar o tecido da região; e a visceral, a qual os parasitos afetam órgãos vitais como baço e fígado e, se não tratada, pode evoluir para morte, sendo esta a mais séria dentre os três tipos da doença (HERWALDT, 1999; WHO, 2016).

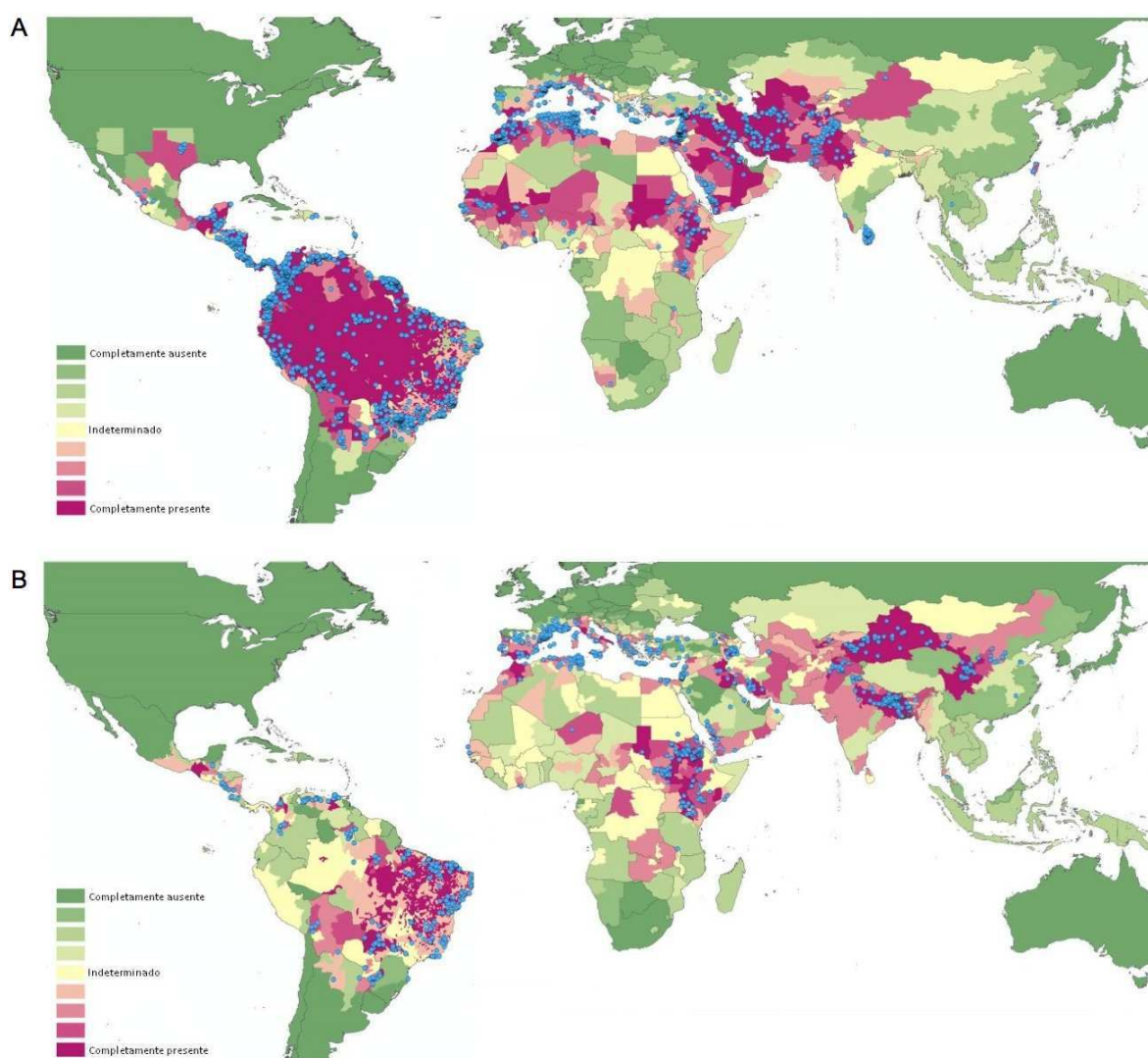


Figura 1: Distribuição das leishmanioses baseada em casos notificados. Evidência da presença da doença de acordo com a escala de cores, sendo verde ausente e em vinho áreas com alta transmissão. Os pontos em azul indicam pontos de ocorrência. Em (A) está representada a distribuição da leishmaniose cutânea, enquanto que em (B) a forma visceral (modificado de PIGOTT et al., 2014).

## 1.2 Transmissão

A transmissão dos parasitos causadores das leishmanioses ocorre principalmente através da picada de fêmeas de flebotomíneos de diferentes espécies, sendo estes insetos os hospedeiros invertebrados de espécies de *Leishmania* sp. (KILLICK-KENDRICK, 1999). Atualmente, estima-se que existam cerca de 1000 espécies de flebotomíneos descritas, com aproximadamente 277 destas descritas no Brasil (SHIMABUKURO et al., 2017). Destas 1000 espécies descritas, aproximadamente 30 estão envolvidas na transmissão de parasitos do gênero *Leishmania* (BATES, 2007; ANDRADE-FILHO et al., 2017). Outras formas de transmissão, mas pouco comuns, são através de transmissão congênita e parenteral, como por exemplo, através de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas ou acidente laboratorial (HERWALDT, 1999; CARDO, 2006).

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e ordem Diptera, possuindo seis subtribos (Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina) e os gêneros de flebotomíneos contendo importantes vetores do parasito são *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (YOUNG & DUNCAN, 1994; AKHOUNDI et al., 2016). Estes insetos são bastante pequenos, com cerca de 2-3mm de comprimento, seu voo é silencioso, possuem o corpo coberto de cerdas, quando pousam mantêm as asas semi-abertas sobre o abdômen, possuem preferência por locais úmidos e são mais ativos na fase crepuscular e noturna (KILLICK-KENDRICK, 1999; PIGOTT et al., 2014).

Tanto os machos como as fêmeas necessitam de se alimentar de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções açucaradas de insetos parasitos de plantas como fonte de energia (MOLYNEUX et al., 1991; HAMILTON & NAIEM, 2000). A alimentação sanguínea é exercida apenas pelas fêmeas e esse tipo de dieta propicia nutrientes para a maturação do ovário e produção de ovos (YOUNG & DUNCAN, 1994).

O parasito do gênero *Leishmania* foi descoberto por Cunningham em 1885 e este mesmo parasito foi descrito por Leishman e Donovan em 1903, a partir do

isolamento do parasito em baço de pacientes da Índia, sendo denominado *Leishmania donovani*, o qual foi posteriormente concluído que se tratavam do mesmo protozoário (CUNNINGHAM, 1885; DONOVAN, 1903; LEISHMAN, 1903). Este gênero abrange protozoários da família Trypanosomatidae, os quais se subdividem em subgêneros de acordo com o desenvolvimento no intestino do vetor e/ou distribuição geográfica, sendo os principais do subgênero *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987; SHAW, 1994).

Há diversas espécies causadoras das leishmanioses, sendo que, dentre as 30 espécies causadoras das diferentes formas da doença em mamíferos, 21 delas tem a capacidade de infectar o homem (DPDx, 2015). Dentre as espécies causadoras mais comuns de leishmaniose tegumentar temos: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania guyaniensis*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania shawi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania amazonensis* (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MCCALL et al., 2013). Já para leishmaniose visceral, as principais espécies são *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania chagasi*) (MCCALL et al., 2013).

### 1.3 O ciclo da *Leishmania*

O ciclo da *Leishmania* constitui-se de dois estágios, também chamado de heteroxênico, sendo um destes com a sua ocorrência dentro do flebotomíneo vetor, e o outro no reservatório ou hospedeiro vertebrado (figura 2). Os hospedeiros vertebrados podem ser diversos mamíferos, como cães domésticos, roedores, preguiças, marsupiais e o homem como hospedeiro acidental, o qual parece não ter papel importante na manutenção do ciclo na natureza, com exceção da Índia, onde o ciclo é principalmente antroponótico (GONTIJO & CARVALHO, 2003; PIGOTT et al., 2014; DPDx, 2015).

Os parasitos causadores destas doenças possuem diferentes formas evolutivas no seu ciclo de vida, sendo estas conhecidas genericamente como amastigotas e promastigotas. O estágio evolutivo denominado amastigota é encontrado principalmente no interior de células do sistema monocítico fagocitário dos

hospedeiros vertebrados e possui forma arredondada ou oval, sendo seu flagelo rudimentar e não exteriorizado. Por outro lado, as promastigotas são encontradas principalmente no tubo digestivo dos insetos vetores e apresentam formato alongado e um flagelo livre (GONTIJO & CARVALHO, 2003; McCALL et al., 2013).

Flebotomíneos adultos apresentam boa longevidade em campo e, para manutenção do ciclo na natureza, as fêmeas precisam fazer um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado com *Leishmania* sp. e permanecerem cerca de duas semanas no ambiente, sendo este tempo suficiente para transmitirem o parasito para o hospedeiro sadio (CASANOVA et al., 2009).

O ciclo se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo dilacera os tecidos do hospedeiro vertebrado, incluindo vasos sanguíneos, para realização da telmofagia. Assim, é formado um concentrado de sangue e células na pele do hospedeiro, onde a fêmea ingere os parasitos na forma amastigota livres ou dentro de macrófagos (BATES et al., 2007).

A transição entre o hospedeiro vertebrado e o vetor faz com que o parasito se desenvolva para a forma promastigota procíclica no intestino do flebotomíneo através de mudanças fisiológicas como mudanças do pH intestinal, diminuição da temperatura e ação de enzimas digestivas (BOROVSKY & SCHLEIN, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990; DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012). Estas novas formas possuem um flagelo curto, pouca movimentação e se limitam ao interior da matriz peritrófica, onde se proliferam através de fissão binária (BATES et al., 2007).

Após escaparem da matriz peritrófica através da expressão e secreção de quitinases, estes parasitos diminuem sua proliferação e adquirem uma forma mais alongada e móvel chamada de nectomonada, as quais se aderem às células do epitélio (dependendo do subgênero), através do LPG (lipofosfoglicano) que cobre todo o corpo do parasito, para evitar que sejam expelidas durante a excreção de dejetos originários do final da digestão (BATES et al., 2007; DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012).

Em seguida, de acordo com o subgênero, os parasitos migram para a região torácica do tubo digestivo médio e colonizam a válvula do estomodeu, sendo este um processo essencial para uma transmissão efetiva, uma vez que os parasitos secretam quitinases que causam danos à quitina que reveste esta válvula. A mesma perde sua função, que é de impedir o refluxo de sangue para o intestino



anterior durante a hematofagia (SCHLEIN et al., 1983; ROGERS et al., 2002). Além disso, nesta região, os parasitos transformam-se em outro tipo morfológico denominado formas leptomonadas que, além de continuarem a replicação do parasito, secretam uma matriz gelatinosa formada principalmente por proteofosfoglicanos filamentosos denominada de PSG (do inglês “promastigote secretory gel”) que obstrui a região torácica do intestino médio e intestino anterior, mantendo a válvula do estomodeu constantemente aberta (ROGERS et al., 2004). Ao mesmo tempo em que ocorre a produção de PSG, a queda de pH e exaustão de nutrientes observados nesta etapa do ciclo evolutivo de *Leishmania* induz a transformação dos parasitos nas formas metacíclicas altamente móveis, com menor tamanho celular e um longo flagelo livre que é regurgitada e liberada na pele do hospedeiro vertebrado durante o novo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990; DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012). O dano causado pela secreção de quitinase, aliado à obstrução do tubo digestivo pelo PSG são, desta forma, responsáveis pela transmissão de espécies de *Leishmania* por flebotomíneos aos hospedeiros vertebrados.

O hospedeiro vertebrado, no momento da picada do flebotomíneo infectado, adquire as formas promastigotas metacíclicas do parasito que, em poucos minutos, são fagocitadas por células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, sendo estes os mais importantes para a proliferação dos parasitos (PETERS et al., 2008). Após internalização, as formas promastigotas começam a se diferenciar em amastigotas, se multiplicam dentro do fagolisossomo até que a célula se rompa, liberando os parasitos que podem assim infectar novos macrófagos ou outras células em diferentes tecidos (PETERS et al., 2008; LIU & UZONNA, 2012).

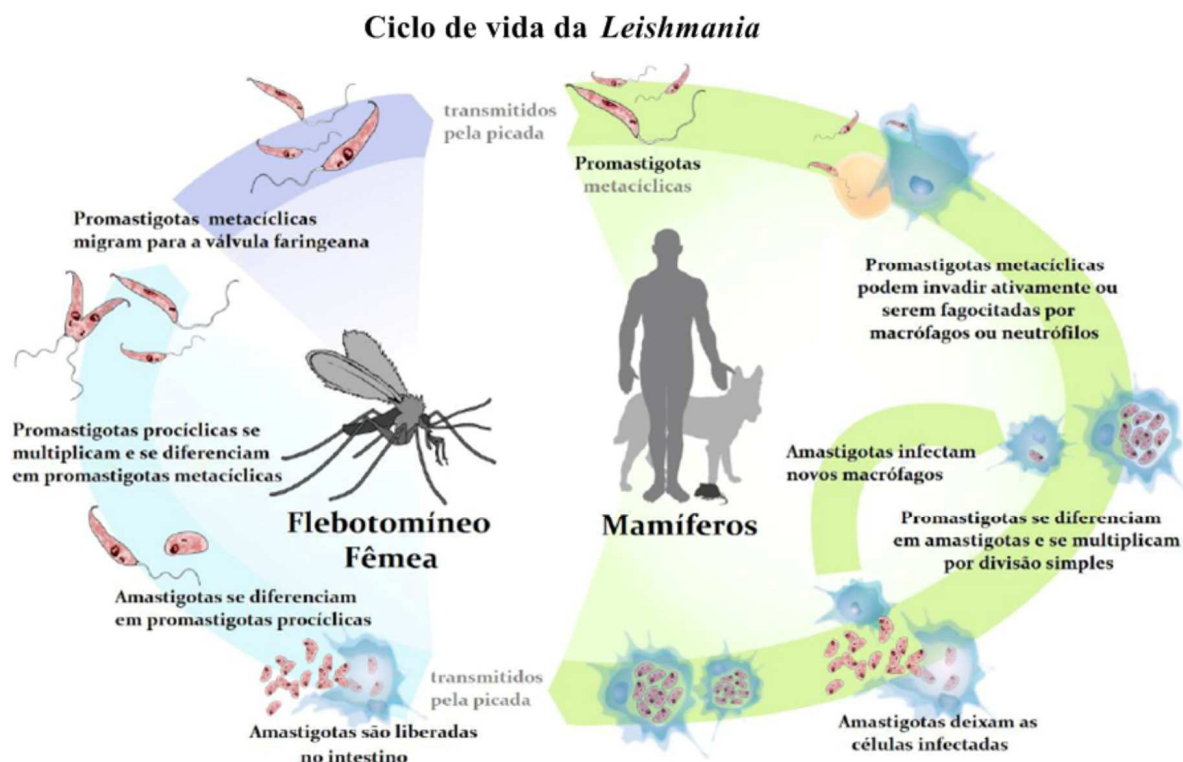


Figura 2: Ciclo da *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Desenho esquemático demonstrando a manutenção do ciclo de transmissão da *Leishmania* que ocorre no flebotomíneo vetor e no hospedeiro mamífero (FRÉZARD, 2015).

## 1.4 Prevenção e controle

Atualmente não há vacinas e drogas eficazes disponíveis capazes de prevenir a infecção de leishmaniose visceral em humanos, sendo a melhor forma de controle um conjunto de estratégias contra a picada do inseto vetor, além de diagnóstico precoce, tratamento adequado, controle de animais reservatórios do parasito, evitar lixo orgânico para reduzir as chances de proliferação do inseto e controle do vetor com o uso de inseticidas. Mesmo assim os números de casos continuam elevados (WHO, 2014; DPDx, 2015).

O uso de inseticidas ainda tem sido utilizado para o controle de flebotomíneos. O uso do piretróide lambdacialotrina foi responsável pela redução

do risco da forma cutânea da doença em 60% em Kabul e em 54% nos Andes Peruvianos, mas ainda não se sabe o efeito em massa da redução da população dos insetos no ambiente (DAVIES et al., 2003). De acordo com o Manual de Vigilância Sanitária do Brasil, os produtos empregados no país são a cipermetrina e deltametrina, os quais são aplicados em borrifações no período do ano em que se observa o aumento da densidade do vetor e, nas áreas com transmissão moderada ou intensa, é necessária uma segunda aplicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Em estudos feitos com ambos inseticidas, foi observado que, apesar das espécies vetoras serem sensíveis aos inseticidas dentro do domicílio borrifado (e esta proteção não se mantém em áreas fora do mesmo), o efeito residual dos inseticidas tem uma duração de apenas 2 a 4 meses, o que limita a eficácia do método (BARATA et al., 2001).

Outra forma de evitar a picada do vetor na leishmaniose visceral é o uso de mosquiteiros, devido ao fato deste se alimentar preferencialmente dentro das casas. Um estudo no Nepal mostrou que o uso de mosquiteiros reduziu em 70% as chances de se adquirir leishmaniose visceral (BERN et al., 2000) e, se tratadas com piretróides, reduziu entre 64 e 100% as chances do inseto se alimentar do homem, segundo um estudo na Síria (TAYEH et al., 1997). O uso de mosquiteiros com inseticidas mostrou uma melhor proteção, mas esta metodologia ainda não foi introduzida em programas de controle em outros países cuja incidência é elevada, além da ausência de estudos relacionados ao impacto da redução da população de flebotomíneos nestas regiões e no ecossistema (DAVIES et al., 2003).

As estratégias para o controle zoonótico de leishmaniose visceral consistem em diagnóstico precoce e tratamento com drogas antimoniais com elevado custo e altamente tóxicas (GAVGANI et al., 2002). Em alguns países, como China e Brasil, têm se aplicado medidas de controle de cães, sendo estes importantes reservatórios do parasito, através da eutanásia dos mesmos. Esta metodologia se mostrou efetiva na China (XU, 1989), mas no Brasil, onde uma das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose Visceral (PVCLV) era a eutanásia de cães infectados, o número de casos continuou a subir, o que demonstrou a baixa eficácia da metodologia em diferentes regiões, podendo ser devido à não importância de cães como reservatórios do parasito em determinadas áreas (LACERDA, 1994; VON ZUBEN & DONALÍSIO, 2016). Outro método para

controle visando o cão doméstico consiste do uso de coleiras impregnadas com deltametrina, o que reduz as chances de picada do animal por flebotomíneos e, mais recentemente, o uso de vacinas, os quais se mostram efetivos na redução de casos nos locais onde os cães possuem importante papel na transmissão da doença (GAVGANI et al., 2002).

Vacinas para leishmaniose também têm sido utilizadas como forma de controle da doença. As vacinas de primeira geração utilizavam promastigotas vivos para imunizar indivíduos que viviam em áreas endêmicas, mas devido aos graves efeitos adversos, seu uso foi descontinuado (MODABBER, 2000). Além disto, foram feitos testes utilizando vacinas com parasitos mortos ou atenuados, o que apresenta uma grande diversidade de antígenos. Estas vacinas induziram a proliferação de várias células de defesa, anticorpos e, assim, poderiam promover uma proteção contra *Leishmania*, mas estas vacinas apresentam baixa estabilidade e eficácia, além de não serem consideradas seguras em comparação com outras que apresentam subunidades ou proteínas do parasito (GIUNCHETTI, et al., 2007; FIUZA et al., 2013). Existem diversas vacinas que podem conferir proteção contra leishmanioses, mas não foram ainda testadas em humanos para que, caso eficazes, sejam disponíveis para a população (GHORBANI & FARHOUDI, 2018).

Diante das limitações dos programas de prevenção e controle das leishmanioses, há a necessidade urgente de estudos à procura de estratégias alternativas e complementares. Recentemente, com o potencial uso de bactérias simbiotes obrigatórias no combate de doenças transmitidas por insetos vetores, esta tem se tornado uma importante estratégia, uma vez que pode reduzir a capacidade de um artrópode vetor em transmitir o organismo patógeno para o homem (MOREIRA et al., 2009; HOFFMANN et al., 2011). A bactéria em questão é denominada *Wolbachia pipientis*.

### **1.5 *Wolbachia pipientis* como medida de controle**

Atualmente, a abordagem para controle de doenças veiculadas por insetos vetores que consiste na utilização da bactéria *W. pipientis* como uma medida de

diminuição ou bloqueio da transmissão de patógenos tem sido amplamente utilizada, como foi visto contra Dengue, Chikungunya, Plasmodium e, mais recentemente, contra os vírus Zika e Mayaro (MOREIRA et al., 2009; HOFFMANN et al., 2011; BIAN et al., 2013; ALIOTA, et al., 2016; DUTRA et al., 2016, PEREIRA et al., 2018). A proteção causada pela presença da bactéria no inseto hospedeiro parece estar relacionada à indução do sistema imune do vetor contra patógenos (KAMBRIS et al., 2009; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011a), bem como por competição intracelular por nutrientes (MOREIRA et al., 2009).

*W. pipientis* é uma  $\alpha$ -proteobactéria intracelular simbiote que infecta naturalmente cerca de 40% a 70% das espécies de artrópodes do planeta, é transmitida maternamente entre as gerações e é capaz de invadir uma população de insetos rapidamente, através do fenômeno da incompatibilidade citoplasmática (WERREN et al., 2008; ZUG & HAMMERSTEIN, 2012).

A incompatibilidade citoplasmática, ou IC, é uma importante característica para a disseminação da bactéria no ambiente através do cruzamento de machos infectados por *W. pipientis* com fêmeas não infectadas, o que resulta na ausência de descendentes. Já o cruzamento entre fêmeas infectadas com machos não infectados ou com aqueles contendo a bactéria, resultam na progênie viável e infectada por *W. pipientis* (STOUTHAMER et al., 1999; WERREN et al., 2008). Desta forma, fêmeas infectadas por *W. pipientis* apresentam uma vantagem reprodutiva em relação às não infectadas, como podemos observar no esquema a seguir (figura 3).

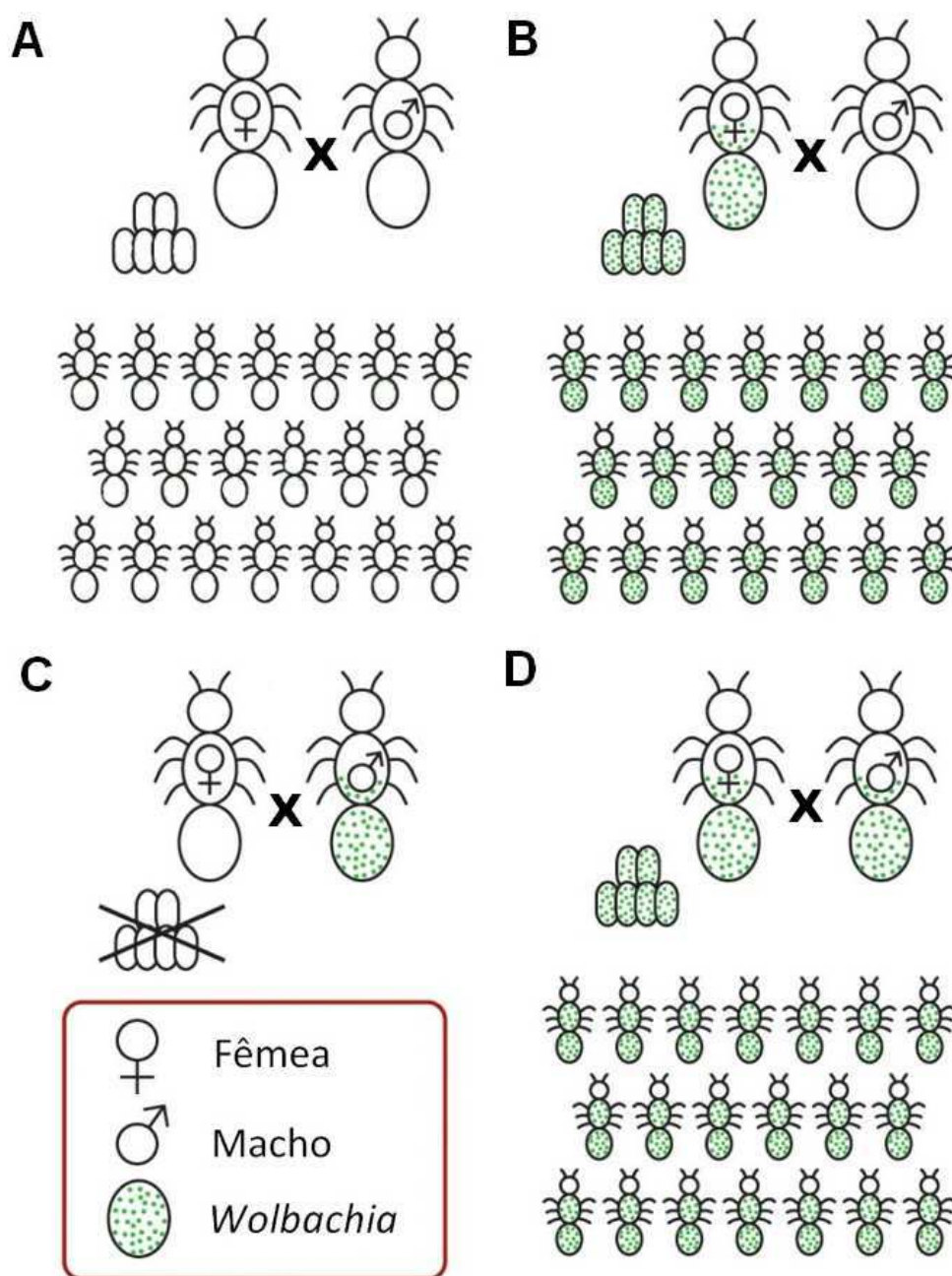


Figura 3: O fenômeno da incompatibilidade citoplasmática (IC) em insetos. Desenho esquemático demonstrando a diferença dos cruzamentos de insetos infectados e não infectados por *W. pipientis*. Em (A) temos o cruzamento dos não infectados pela bactéria, gerando descendentes; em (B) o cruzamento da fêmea infectada por *W. pipientis* e o macho não infectado, o que gera descendentes infectados pela bactéria; em (C) temos o fenômeno da IC, que ocorre quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas, não gerando descendentes férteis; e em (D) o cruzamento de ambos insetos infectados, o que também gera descendentes infectados por *W. pipientis*. (modificado de: <http://www.eliminatedengue.com/our-research/wolbachia>).

Recentemente, infecções experimentais de diferentes mosquitos vetores com espécies de *W. pipientis* abriram novas perspectivas para o controle de insetos transmissores de agentes causadores de doenças e a adaptação de uma certa espécie de *W. pipientis* em um novo hospedeiro depende da habilidade desta bactéria em colonizar diversos tecidos do hospedeiro (BRAIG et al., 1994; WALKER & MOREIRA, 2011). Neste sentido, para facilitar a transferência de *W. pipientis* para novos hospedeiros filogeneticamente distantes da espécie de inseto que é naturalmente infectada, a cultura de *W. pipientis* em linhagens celulares constitui-se de uma etapa fundamental na adaptação e na habilidade de *W. pipientis* em infectar células e tecidos deste novo hospedeiro (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011a; WALKER & MOREIRA, 2011).

Após contínuas passagens em linhagens celulares de *Aedes aegypti*, a linhagem de *W. pipientis* que infecta naturalmente *Drosophila melanogaster*, wMelPop, foi transferida com sucesso para adultos de *A. aegypti* através de microinjeções em embriões, sendo capaz de invadir vários tecidos do hospedeiro, gerar linhagens de insetos com 100% de transmissão vertical e reduzir a longevidade do inseto adulto em cerca de 50% (McMENIMAN et al., 2009). Esta nomenclatura, wMelPop-CLA, se dá ao fato desta cepa de wMelPop ter se adaptado a linhagens celulares após um longo período em cultivo (McMENIMAN et al., 2008).

Os estudos de comportamento alimentar em *A. aegypti* infectados pela cepa wMelPop-CLA de *W. pipientis* demonstraram que insetos adultos com mais de 15 dias após a eclosão infectados com a bactéria apresentaram um aumento significativo do tempo gasto para picar e maior dificuldade em completar o repasto sanguíneo em hospedeiros humanos em comparação com insetos controle não infectados por *W. pipientis* (MOREIRA et al., 2009a). Além disso, fêmeas de *A. aegypti* infectadas por *W. pipientis* apresentam mudanças fenotípicas das peças bucais ao atingirem idade mais avançada, apresentando uma probóscide maleável, o que prejudicou o processo de alimentação (TURLEY et al., 2009).

Outro efeito que a cepa wMelPop-CLA causou no hospedeiro *A. aegypti* foi o aumento da expressão de genes do sistema imune do hospedeiro. As principais vias de insetos foram descritas baseando-se nas vias de *Drosophila* sp., sendo as principais Toll, IMD e Jak-Stat (ROSETTO et al., 1995; LEMAITRE et al., 1995; ZEIDLER et al., 2000).

A via Toll é ativada principalmente através de infecções por fungos e bactérias Gram-positivas (figura 4), o que leva a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como por exemplo a Drosomicina. Esta via é composta de componentes humorais e celulares e contém vários genes, como o gene Cactus que controla a via negativamente, o gene Dorsal que migra para o núcleo para ativar a transcrição de genes, e o Myd88 que está envolvido em cascatas para fosforilação e degradação do gene Cactus (VALANNE et al., 2011).

A via IMD, do inglês “immuno deficiency”, controla grande parte de peptídeos antimicrobianos (figura 4), como Dipterocina e Cecropina, e é uma via essencial da imunidade de insetos (LEMAITRE et al., 1995), sendo ela ativada a partir do reconhecimento de peptidoglicanos (PGN) presente em grande parte de bactérias patogênicas (JANEWAY, 2013; STÖVEN et al., 2003). O gene que controla negativamente esta via é denominado Caspar, e a ativação do gene Relish através da sua fosforilação, leva à transcrição de genes que codificam AMPs no núcleo (STÖVEN et al., 2003).

A via de sinal de transdução, denominada JAK/STAT (figura 4), contém também várias moléculas importantes para sua ativação, sendo similares à mesma via em mamíferos (DARNELL, 1997). Foram descritos diversos componentes, como o ligante “unpaired”, ou UPD, os receptores JAK e STAT, além das moléculas que regulam negativamente, como a proteína que inibe o STAT chamada de PIAS (do inglês “Protein Inhibitor of Activated STAT”) e o supressor de sinalização de citocina chamado SOCS (do inglês “Suppressor Of Cytokine Signaling”) (CHUNG et al., 1997; ZEIDLER et al., 2000).



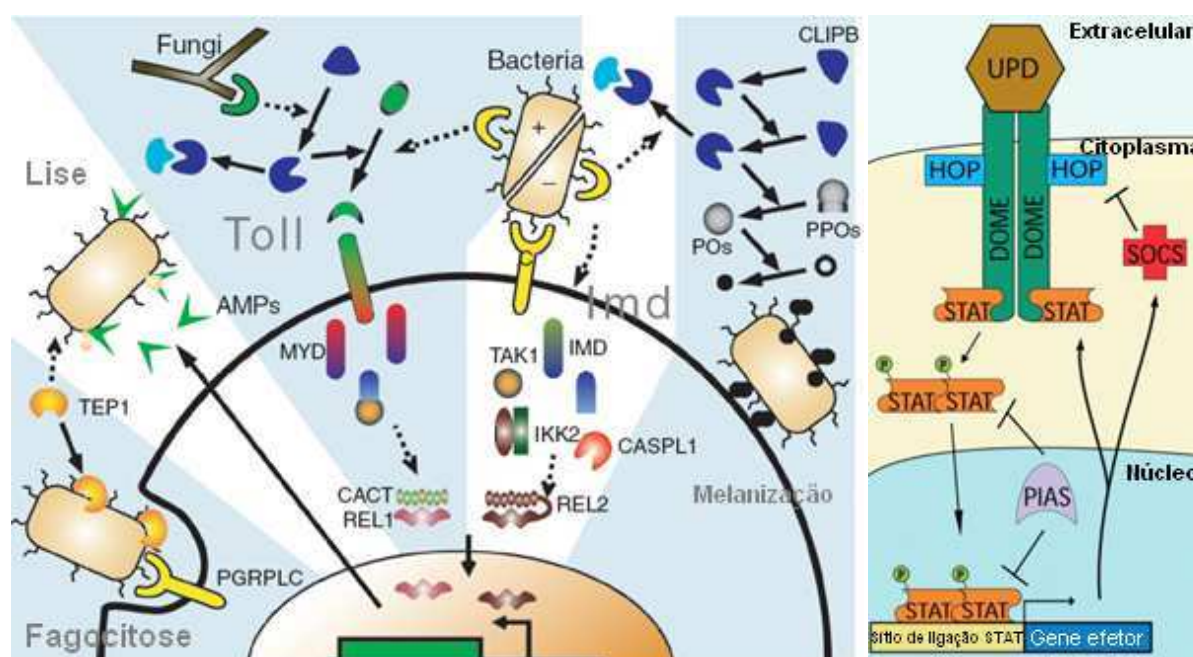


Figura 4: Desenho esquemático representando as principais vias de imunidade de invertebrados. Através de estudos envolvendo a mosca *Drosophila melanogaster*, as principais vias de imunidade de invertebrados foram estabelecidas, sendo estas IMD, TOLL e JAK-STAT, além dos genes que regulam negativa ou positivamente, fatores de transcrição e efeitos causados nas células (modificado de SOUZA-NETO et al, 2009).

Foi observado efeitos da cepa *wMelPop-CLA* em diversas vias de imunidade, como o efeito em algumas serino-proteases, TEPs (proteínas contendo tio-éster), profenoloxidasas que participam no processo de melanização, lisozimas, peptidoglicanos, peptídeos antimicrobianos e o fator de transcrição de NF- $\kappa$ B. Já alguns genes da via Toll, tripsina e outros tiveram a sua expressão reduzida. Além disto, estes mosquitos foram infectados com nematódeos filarióides da espécie *Brugia pahangi* e foi observado uma redução significativa no número destes nematódeos presentes no mosquito com *W. pipiens*, em relação aos selvagens (KAMBRIS et al., 2009).

Em relação à proteção contra parasitos, através da injeção de embriões de *Anopheles stephensi* (o principal vetor de malária na Ásia) com a cepa de *W. pipiens* *wAlbB* proveniente de *Aedes albopictus*, a bactéria foi capaz de infectar diversos

tecidos, incluindo os ovários do hospedeiro e causar a incompatibilidade citoplasmática, o que favoreceu a disseminação da bactéria nas populações de mosquitos, em condições de laboratório. Além disso, a presença de wAlbB em *A. stephensi* reduziu significativamente a carga parasitária de oocistos de *Plasmodium falciparum* na lâmina basal do intestino e de esporozoítos na glândula salivar de mosquitos infectados em comparação com mosquitos controle não infectados (BIAN et al., 2013). Outro trabalho com *Anopheles gambiae* e infecção transiente por wMelPop-CLA demonstrou que, nestes mosquitos infectados, genes como TEP1 que apresenta similaridade com a proteína C3 do complemento dos vertebrados e atua na fagocitose, e os peptídeos antimicrobianos Cecropina e Defensina foram super expressos e apresentaram uma redução significativa no número de oocistos de *Plasmodium berghei*, em comparação com mosquitos não infectados (KAMBRIS et al., 2010).

Cepas de *W. pipientis* infectam naturalmente várias espécies e populações de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A espécie *Phlebotomus papatasi* foi encontrada infectada pela cepa wPap, *Phlebotomus perniciosus* por wPrn, enquanto que *Lutzomyia shannoni* e *Lutzomyia whitmani* ambas infectadas por wWhi (ONO et al., 2001; BENLARBI & READY, 2003). Como estas duas espécies de *Lutzomyia* não são estreitamente relacionadas, o fato de ambas serem infectadas pela mesma cepa de *W. pipientis* sugere uma recente transmissão horizontal da bactéria e estes dados confirmam a existência de infecções naturais de *W. pipientis* em flebotomíneos (ONO et al., 2001; PARVIZI et al, 2013, DE OLIVEIRA et al., 2015). Além destas, as espécies *Psychodopygus davisii*, *Psychodopygus llanosmartinsi*, *Sciopemyia sordellii* e *Evandromyia sericea* coletadas de campo também foram encontradas naturalmente infectadas pela bactéria (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Recentemente, em outras três espécies do gênero *Lutzomyia* foi possível detectar a presença de *W. pipientis*: *Lutzomyia dubitans*, *Lutzomyia cayennensis* e *Lutzomyia evansi*, sendo estas pertencentes ao supergrupo B (VIVERO et al., 2017).

Em diversos trabalhos anteriores, a espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor de *L. infantum* o qual causa leishmaniose visceral, não tinha sido detectada infectada com *W. pipientis*, considerando-se indivíduos de diferentes populações (ONO et al., 2001; SANT'ANNA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto,

recentemente, a bactéria *W. pipientis* foi detectada na espécie *L. longipalpis* em uma pequena população coletada no Brasil, o que pode ser resultado de um evento raro de transmissão horizontal através dos hábitos alimentares da larva, após ingestão de outros artrópodes, ou até mesmo uma infecção local, já que a espécie em questão é um complexo de espécies (MAINGON et al., 2008; DA ROCHA et al., 2017). Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1912 por Lutz e Neiva no Brasil e, após diversos outros estudos, foram apontadas várias diferenças morfológicas e fenotípicas que se acreditavam se tratar de espécies distintas ou espécies irmãs (MANGABEIRA, 1969, WARD et al., 1983; LAMPO et al., 1999). Posteriormente, estudos utilizando enzimas de multi-locus e aqueles relacionados à variabilidade genética, foi levantada a hipótese de ter ocorrido especiação, serem espécies irmãs ou uma espécie com alta heterogeneidade (LANZARO et al., 1993; BAUZER et al., 2007). Recentemente, não se sabe ao certo quantas espécies irmãs existem de *L. longipalpis*, sendo que no Brasil foram determinadas pelo menos sete destas (ARAKI et al., 2009). Espera-se que, com novos estudos e metodologias mais sofisticadas, seja possível entender melhor a evolução molecular deste complexo de espécies e avaliar se determinados genes e padrões fenotípicos podem ter efeito na capacidade vetorial de *L. longipalpis* em transmitir o parasito do gênero *Leishmania* (SOUZA et al., 2017).

### **1.6 Linhagens celulares LL-5 e Lulo de *L. longipalpis***

A linhagem celular LL-5 foi estabelecida por Tesh em Modi em 1983 através de ovos de flebotomíneos coletados da colônia vinda da Inglaterra, sendo esta originada da Lapinha, no Brasil. Estas células possuem pelo menos dois tipos diferentes de células, epitelióides e fibroblastóides (TESH & MODI, 1983). Em 2000, Rey e colaboradores publicaram o estudo da caracterização da linhagem celular Lulo a partir de material embrionário de ovos e larvas coletados de colônia estabelecida na Colômbia. Esta linhagem contém células predominantemente epitelióides e, ambas as células LL-5 e Lulo, foram suscetíveis a infecções por arborvírus (TESH & MODI, 1983; REY et al., 2000).

Atualmente, somente um trabalho utilizou a linhagem celular LL-5 de flebotomíneos para estudos sobre expressão de genes do sistema imune (TINOCO-NUNES et al., 2016), mas existem vários utilizando ambas em ensaios de adesão de *Leishmania* e interação com outros tripanossomatídeos (FAMPA et al., 2003; CORTÊS et al., 2011; SOARES et al., 2017). Outros estudos apontaram a célula Lulo como um bom modelo para estudo de interação com *Leishmania* e do ciclo de vida do parasito (REY et al., 2000; BELLO et al., 2005; CORTÊS et al., 2011). Nestes estudos, mesmo sendo células embriônicas epitelióides, foi possível observar a adesão do parasito através do flagelo, do polo posterior e até mesmo pela lateral do mesmo. Além disto, em estudos do ciclo de vida, foi observado formas amastigotas nestas células presentes no vacúolo parasitóforo (BELLO et al., 2005).

Mais recentemente, através do estudo da resposta das células Lulo frente à infecção por vírus, foi descoberta a infecção natural destas células por vírus específicos de insetos, sendo estes denominados Lulo Vírus 1, pertencente à família *Luteoviridae*, e Lulo Vírus 2, classificado como pertencente à família *Permutotetraviridae* (FERREIRA et al., 2018).

Diante das vantagens do uso de *W. pipientis*, além da recente publicação de um protocolo de microinjeção em embriões em flebotomíneos (JEFFRIES et al., 2018), acreditamos ser de extrema importância estudos envolvendo a introdução de *W. pipientis* em linhagens celulares de flebotomíneos para que ocorra a adaptação da bactéria no novo hospedeiro. Este passo inicial de contato de *W. pipientis* com um novo hospedeiro utilizando-se a replicação da bactéria em linhagens celulares foi utilizado com sucesso em *A. aegypti*, servindo como ponto de partida para estratégias de introdução de *W. pipientis* que gerassem transfecções permanentes com geração de incompatibilidade citoplasmática e com potencial de bloquear a replicação do vírus da dengue, tanto no corpo como nas glândulas salivares do mosquito. Desta forma, propomos neste trabalho desenvolver um protocolo de transfecção de linhagens celulares de *Lu. longipalpis* com cepas de *W. pipientis*, investigando sua ação na expressão de genes envolvidos na resposta imune inata deste hospedeiro, bem como a interação de formas promastigotas de *Leishmania infantum* com células de flebotomíneos transfectadas e não transfectadas por *W. pipientis*.

## 2 Justificativa

Recentemente, infecções experimentais de mosquitos com diferentes cepas de *W. pipientis* abriram novas perspectivas para o controle de insetos transmissores de patógenos causadores de doenças, como o World Mosquito Program ([www.worldmosquitoprogram.org](http://www.worldmosquitoprogram.org)), o qual tem utilizado esta bactéria como controle biológico da transmissão da Dengue, Zika e Chikungunya em diversos países.

Para que a infecção por *W. pipientis* aconteça, é necessária a adaptação desta cepa de *W. pipientis* no novo hospedeiro, o que depende da habilidade desta bactéria em colonizar tecidos variados, além de não apresentar efeitos extremamente negativos no fenótipo deste novo hospedeiro. Neste sentido, para melhor transferência de *W. pipientis* a hospedeiros filogeneticamente distantes, McMeniman e colaboradores em 2008 demonstraram que o estabelecimento da infecção por *W. pipientis* em um novo hospedeiro é um processo laborioso que necessita diversas tentativas até que se obtenha sucesso na infecção.

Como a espécie *L. longipalpis* foi encontrada naturalmente infectada por *W. pipientis* apenas em uma pequena população e em apenas 2% dos indivíduos, a transfeção desta bactéria em linhagens celulares constitui-se como fator fundamental na adaptação e na habilidade de *W. pipientis* em infectar células e tecidos deste novo hospedeiro. Após infecção, é importante verificar se a presença da bactéria pode afetar o sistema imune destas células e, através do efeito na expressão gênica, reduzir a infecção por *L. infantum*. Além disto, já que flebotomíneos são transmissores de vírus, foi analisado se a *W. pipientis* pode reduzir a carga viral de vírus específicos de insetos presentes naturalmente nas células Lulo.

Com isto, estudos *in vitro* sobre a interação *W. pipientis*-*Leishmania*-vetor são importantes para verificar, posteriormente, se o uso da bactéria nestes insetos *in vivo* pode se tornar uma alternativa adicional para redução da transmissão de *Leishmania* pelo vetor no campo.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito da transfecção de cepas de *Wolbachia pipientis* em linhagens celulares de *Lutzomyia longipalpis* na expressão de genes relacionados com a imunidade inata e na interação *in vitro* de *Leishmania infantum*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a transfecção das cepas wMel e wMelPop-CLA de *W. pipientis* nas linhagens celulares LL-5 e Lulo de *L. longipalpis*;
- Verificar se *W. pipientis* induz a expressão de genes das principais vias do sistema imune nas linhagens celulares Lulo e LL-5;
- Avaliar se a presença da bactéria interfere na adesão de promastigotas de *Leishmania infantum* nas células infectadas por *W. pipientis* em relação às células controle;
- Avaliar se a presença da bactéria interfere na carga viral de vírus específicos de insetos nas células de flebotomíneos infectadas por *W. pipientis*;

## 4 Metodologia

### 4.1 Manutenção da cultura de células de *Lutzomyia longipalpis*

Foram utilizadas as células embrionárias LL-5 (TESH & MODI, 1983) e Lulo (CÔRTEZ et al., 2011) gentilmente cedidas pelo laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Estas células foram cultivadas em meio L-15 Leibovitz L-glutamina (Sigma) enriquecido com 10% de Caldo de Triptose Fosfato (TPB, Sigma), 10% de Soro Fetal Bovino inativado a 56 °C por 30 minutos (GIBCO) e antibióticos Penicilina e Estreptomicina nas concentrações 100U-100ug/mL respectivamente (Invitrogen), sendo incubadas a 28 °C, sem atmosfera de CO<sub>2</sub> (BELLO et al., 2005).

As células LL-5 e Lulo foram cultivadas em garrafas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> sem filtro, contendo 5 mL de meio e a passagem foi realizada uma vez por semana. Quando as células estavam confluentes formando uma monocamada, elas foram soltas utilizando raspadores e, na mesma garrafa (por até três passagens), foi mantido 1 mL e adicionado 4 mL de meio fresco. O restante do meio com células era descartado, ou congelado para manutenção do estoque celular.

O estoque celular foi mantido em freezer a -80 °C ou em nitrogênio líquido e, para congelamento das células, no momento da passagem, cerca de 4 mL de meio contendo as células foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL que foi centrifugado à 600 × g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuscitado em solução de congelamento (meio L-15 suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino, 10% de Caldo de Triptose Fosfato e 10% de DMSO), transferido para tubos de criopreservação e então foram mantidos em freezer a -80 °C. Antes da transferência de células para o nitrogênio líquido, as alíquotas foram estocadas em freezer a -80 °C por, pelo menos 24 horas, para evitar o rompimento das mesmas no processo de congelamento.

Para descongelamento das células, as alíquotas estocadas em freezer -80 °C ou em nitrogênio líquido foram mantidas à temperatura ambiente e, após serem

descongeladas, o conteúdo do tubo de criopreservação foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e foram adicionados 4 mL de meio fresco. Em seguida, o tubo foi centrifugado à  $600 \times g$  por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento de células foi ressuspensionado em 5 mL de meio fresco e por fim foram transferidos para uma nova garrafa de cultivo celular.

#### **4.2 Extração de *W. pipientis* a partir de ovários de *Aedes aegypti* transfectados e infecção em linhagens celulares de *L. longipalpis***

Inicialmente, foi utilizado o protocolo de extração de *W. pipientis* a partir de ovários de linhagens do mosquito *A. aegypti* transfectados com a cepa wMel mantida no laboratório de Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor no Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ/MG, Brasil. A colônia de mosquitos foi mantida à temperatura média de  $27 \pm 1$  °C, umidade de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. As larvas foram mantidas em bandejas com água e um tablete de ração para peixe Tetramin® Tropical Fish Food tablets (Tetra, Alemanha, Cat. No. 16110-03). Já os mosquitos foram mantidos em gaiolas com solução de sacarose 10% ad libitum e, cerca de uma semana após as fêmeas terem emergido, estas foram alimentadas através de sistema artificial com sangue humano proveniente de banco de sangue, tanto para manutenção da colônia, como para dissecação dos ovários para extração de *W. pipientis* (DUTRA et al., 2015).

Cerca de 48 horas após o repasto sanguíneo, aproximadamente 120 fêmeas foram dissecadas em tampão estéril de Sacarose, Fosfato e Glutamato (tampão SPG: 218 mM sacarose, 3,8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,2 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 4,9 mM de L-glutamato em pH 7.2) e os ovários foram transferidos para um eppendorf de 1,5 mL contendo 500  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão em gelo até o fim da dissecação. Posteriormente, foi feito o protocolo de extração que se inicia com a lavagem dos ovários três vezes em tampão SPG, lavagem em etanol 80% por 5 minutos e repetição da lavagem em tampão SPG três vezes. Após cada lavagem, estes foram centrifugados à  $1000 \times g$  por 1 minuto à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os mesmos foram ressuspensionados em 500  $\mu\text{L}$  do tampão. Após lavagens, foi feita a



maceração dos ovários em Mini-Beadbeater-16 (BioSpec, Cat# 607) contendo uma pérola de vidro de 2mm por 30 segundos, adição de 1 mL de tampão SPG no macerado seguida por centrifugação à 1000 × g por 10 minutos à 4 °C para formação de sedimento de debris celulares. O sobrenadante foi passado em filtro de seringa de 2,7 µM, seguido pelo filtro de seringa de 1,2 µM e centrifugação do filtrado à 14.000 g por 15 minutos à 4 °C para obtenção do sedimento de *W. pipientis*. O sobrenadante foi descartado e o sedimento da bactéria foi ressuspensionado em tampão SPG em volume suficiente para adição de 100-200 µL por poço contendo as células que foram infectadas. A placa contendo células e *W. pipientis* foi selada com parafilme e centrifugada à 1500 × g por 1 hora a 28 °C para aumentar o contato entre ambos, finalizando com a transferência da placa para a incubadora em condições ideais de crescimento, sendo a incubação à 28 °C, sem atmosfera de CO<sub>2</sub>.

Para infecção de *W. pipientis* nas linhagens celulares, as células Lulo e LL-5 foram transferidas para placas de 12 poços. A partir de uma garrafa de células confluentes, 500 µL de células foram transferidos para cada um dos poços (pelo menos um poço para cada linhagem celular) e a placa foi mantida na incubadora por pelo menos duas horas para que as células se aderissem à placa. No dia seguinte da infecção, todo o conteúdo de cada poço infectado foi transferido para uma garrafa de cultivo celular, contendo 4 mL de meio fresco.

#### **4.3 Extração de cepas de *W. pipientis* a partir de linhagens celulares de *Aedes albopictus* transfectadas e infecção em linhagens celulares de *L. longipalpis***

Foi utilizado outro protocolo de extração de *W. pipientis* a partir da linhagem celular RML12 de *A. albopictus* (VORONIN et al., 2009) previamente estabelecidas no laboratório do projeto World Mosquito Program na Austrália, sendo inicialmente utilizada a cepa wMel devido a sua baixa virulência (WALKER et al., 2011), e posteriormente, a cepa wMelPop-CLA (VORONIN et al., 2009), a qual foi adaptada à esta linhagem celular. Para cultivo e posterior extração da bactéria, a linhagem

celular RML12 controle e infectadas com as diferentes cepas de *W. pipientis* foram mantidas em meio contendo 45% de meio Schneider (GIBCO), 45% de meio M&M, 10% de Soro fetal bovino (GIBCO) e antibióticos Penicilina e Estreptomicina nas concentrações 100U-100 µg/mL respectivamente (Invitrogen). As células foram incubadas a 28 °C sem atmosfera de CO<sub>2</sub>.

O protocolo de extração de *W. pipientis* é semelhante ao utilizado a partir de ovários, com modificações (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011b). As células de mosquito infectadas com *W. pipientis*, após atingirem confluência em frascos de 175 cm<sup>2</sup> sem filtro, foram transferidas para tubos Falcon, em um volume de 70 mL de meio contendo células ( $\approx 2,5 \times 10^8$  células). Estes tubos foram centrifugados à 1000 × g por 10 minutos à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 10 mL de tampão SPG para lavagem das células. Esta lavagem foi repetida três vezes e, em seguida, foi feita a sonicação das células duas vezes por 10 segundos a 20-25 watts para liberação da *W. pipientis*, sendo que os tubos Falcon foram mantidos no gelo para preservação da bactéria, e posteriormente foram centrifugados à 1000 × g por 10 minutos à 4 °C para formação do sedimento dos debrís celulares. O sobrenadante foi então filtrado em filtros de seringa de 2,7 µM, seguido de 1,2 µM e o filtrado foi centrifugado à 14.000 × g por 15 minutos à 4 °C para obtenção do sedimento de *W. pipientis*. O sobrenadante obtido após centrifugação foi descartado e o sedimento de *W. pipientis* foi ressuspendido em tampão SPG em volume suficiente para adição de 100-200 µL por poço contendo as células para infecção. A placa contendo as células e a bactéria *W. pipientis* foi selada com parafilme, centrifugada à 1500 × g por 1 hora a 28 °C e transferida para incubadora em condições ideais, como descrito anteriormente.

Para infecção de *W. pipientis* nas linhagens celulares, as células Lulo e LL-5 foram transferidas para placas de 24 poços e mantidas na incubadora por pelo menos duas horas antes da infecção para permitir a adesão das células na placa. A partir de uma garrafa de células confluentes, diferentes proporções de células e de *W. pipientis* purificada foram testadas em placas de 24 poços. Foram testados os volumes de 250 µL, 500 µL e 750 µL de células à 90% de confluência para cada um dos poços (pelo menos um poço para cada linhagem celular) e 100 µL, 150 µL e 200 µL de *W. pipientis* purificada para cada poço. Cerca de 3 dias após a infecção, todo o conteúdo de cada poço infectado foi transferido, diretamente para

a garrafa de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, ou primeiro para placa de 6 poços até a confluência e por fim para garrafa de cultivo com a mesma dimensão. Cada garrafa continha 4 mL de meio fresco e, inicialmente a passagem foi realizada a cada 5 dias.

Para os experimentos de infecção por *W. pipientis* nas células LL-5 e Lulo, as células RML12 e Mos55 (MARHOUL & PUDNEY, 1972) foram também infectadas para validação da técnica. Além disto, em alguns casos, foram feitas três sucessivas infecções nas diferentes células de flebotomíneos para aumentar as chances de sucesso da infecção, como descrito por Voronin e colaboradores (VORONIN et al., 2009).

Outras metodologias pós-infecção foram testadas na tentativa de aumentar a infecção das células de flebotomíneos. Para isto, após a infecção e transferência das células para frascos de cultivo celular, foi feito o qPCR em tempo real (descrito no item 4.4) para a escolha do frasco com maior densidade de *W. pipientis*. Em seguida, as células foram soltas usando raspadores e 100 µL do meio contendo as células foram transferidos para placas de 96 poços e foi feita a diluição seriada 1:10 até a diluição 1:10<sup>12</sup> e, por fim, foi adicionado 50 µL de meio fresco. Esta diluição seriada foi feita na tentativa de selecionar os poços contendo um maior número de células infectadas por *W. pipientis*.

Além da metodologia descrita acima, foram propostos diferentes métodos de manutenção das células pós-infecção para diminuir o crescimento das mesmas para permitir que a bactéria se multiplique e dissemine entre as células e, desta forma, tentar obter uma maior quantidade de células infectadas, tais como:

- Verificar se as células flutuantes no meio de cultura apresentavam maior densidade de *W. pipientis* do que as células aderidas no frasco.
- Redução da frequência da passagem das células para 1 vez a cada 2 semanas, sendo feita a troca do meio a cada 4 dias.
- Redução da frequência da passagem das células para, pelo menos, uma vez a cada 7 dias, sendo feita a troca do meio 4 dias após a passagem, adicionando meio com as mesmas concentrações de reagentes descritas anteriormente, reduzindo o SFB para 2%.

Após a passagem das células, o meio restante foi congelado em freezer - 80 °C (como descrito no item 4.1) e 200 µL do meio foi transferido para tubo de 1,5

mL para extração de DNA (descrito no item 4.4). Além disto, também foram coletados 200  $\mu$ L de meio que foram centrifugados a 600  $\times$  g por 5 minutos para formação do sedimento de células que foi ressuscitado em TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Fisher, Cat No. 15596-018) e mantidos em freezer -80 °C para posterior extração RNA e análise da expressão gênica destas células em comparação com as células controle.

#### **4.4 Estudo da expressão de genes de imunidade inata da linhagem LL-5 em estágios iniciais de infecção por *W. pipientis*.**

Seguindo o mesmo protocolo de extração de *W. pipientis*, foi proposto o estudo dos estágios iniciais da infecção nas células LL-5, como descrito anteriormente (TINOCO-NUNES et al., 2016). Um dia antes da extração de ambas as cepas de *W. pipientis* a partir das células RML12, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células LL-5 foram transferidas em placa de 24 poços contendo 1 mL de meio fresco. No dia seguinte, após execução do protocolo de extração da bactéria descrito anteriormente, 100  $\mu$ L da *W. pipientis* extraída, (wMel e wMelPop-CLA, separadamente) foram adicionados em cada poço com as células LL-5. Para o controle, foi adicionado o mesmo volume do tampão SPG. As placas foram centrifugadas por 60 minutos à 1,500  $\times$  g, para aumentar o contato entre a bactéria e as células e, finalmente, incubadas à 28 °C. Após o processo de infecção e centrifugação, as células foram monitoradas e coletadas nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Em cada tempo do estudo de cinética, as células aderidas à placa de 24 poços foram então ressuscitadas em 50  $\mu$ L do reagente TRIzol (Invitrogen) e todas as amostras foram mantidas em freezer -80 °C até o processamento das mesmas.

Ao final da coleta, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas utilizando uma pérola de vidro de 2 mm por 30 segundos utilizando o Mini-Beadbeater-96. O RNA total de cada amostra foi isolado seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Para a síntese do cDNA, 1  $\mu$ g do RNA foi submetido a tratamento com DNase I (Invitrogen) e a síntese da fita

complementar foi realizada utilizando o kit de Superscript Reverse Transcriptase III (Invitrogen), sendo que ambos os protocolos foram seguidos baseando-se nas instruções do fabricante. Este mesmo experimento foi repetido em três réplicas independentes.

A quantificação relativa de *W. pipientis* foi realizada por qPCR em tempo real utilizando a expressão do gene *wsp* (BRAIG et al, 1998) normalizado pelo gene de referência GAPDH de *L. longipalpis* (ID: LLOJ001891), sendo ambos os iniciadores listados na tabela 1. O estudo da expressão de genes do sistema imune também foi feito por qPCR em tempo real relativo ao gene GAPDH das células LL-5. Os iniciadores utilizados para os genes de imunidade Cactus e Dorsal (via Toll); Caspar e Relish (via IMD); PIAS e STAT (via JAK-STAT); os peptídeos antimicrobianos Attacina, Cecropina, Defensina 1 e Defensina 2 (TELLERIA et al, 2013); e espécies reativas de oxigênio (ROS) mediados pelo gene de imunidade da Catalase (ID: LLOJ007605), Superóxido Dismutase (SOD3A) (ID: LLOJ008594) e Óxido Nítrico Sintase (iNOS) (ID: LLOJ005465) foram obtidos à partir de trabalhos publicados anteriormente e estão listados na tabela 1.

As reações foram realizadas através do equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. Cada amostra foi analisada em duplicata através do método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O resultado foi apresentado em fold change, sendo relativo ao grupo controle não infectado das células LL-5. A análise estatística foi feita pelo teste Two-way ANOVA para verificar a diferença significativa entre os grupos estudados.

**Tabela 1: Iniciadores utilizados no experimento de expressão gênica em estágios iniciais de infecção de *W. pipientis* nas células LL-5**

Gene	Sequência	Referência
LLiNOS-F	TGGCTGTCGCAATTTGTGTG	LLOJ005465 (Vector Base)
LLiNOS-R	CCGCAATGTTACCTCAACC	
LLCatalase-F	CGACCGTGGTATCCCTGATG	LLOJ007605 (Vector Base)
LLCatalase-R	AGAAGGCCTCCCCTTTGTTG	
LLSOD3A-F	CCGATAGCGCTGTGAGACAC	LLOJ008594 (Vector Base)
LLSOD3A-R	ATCGGAAATTGCGACCTTGC	
GAPDH-F	TTCGCAGAAGACAGTGATGG	LLOJ001891 (Vector Base)
GAPDH-R	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	
wsp-F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	AF020070.1 (GenBank)
wsp-R	AAAATTAACGCTACTCCA	

#### **4.5 Monitoramento da infecção estável de *W. pipientis* em linhagens celulares de *L. longipalpis* via PCR em tempo real**

Para investigar o processo de infecção e estabilização de *W. pipientis* nas linhagens celulares de *L. longipalpis*, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizando os iniciadores para o gene TM513 para *wMel* (JOURBERT et al., 2016) e iniciadores específicos para *wMelPop-CLA* (dados não publicados), normalizado com o gene GAPDH de *L. longipalpis* (ID: LLOJ001891). Posteriormente utilizamos iniciadores do gene *wsp* (*Wolbachia surface protein*) para ambas as cepas de *W. pipientis* (FRENTIU et al., 2014) (tabela 2).

Para isto, a cada passagem, 200  $\mu$ L de células de cada frasco infectado até 90% de confluência foram submetidos ao protocolo rápido de extração de DNA que se inicia com a centrifugação da alíquota de células a 4000  $\times$  g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada uma pérola de vidro de 2mm e 50  $\mu$ L do tampão de extração (4 mM EDTA, 20 mM Trisbase, 0,4 mM NaCl, 0,25  $\mu$ g/mL

de proteinase K [Bioline, Cat No. BIO-37084]) para homogeneização das amostras em Mini-Beadbeater-16 (BioSpec, Cat No. 607) por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas à 56 °C por 5 minutos para ação da proteinase K e extração do DNA, seguidas por incubação à 98 °C por 5 minutos para inativação da enzima proteinase K.

Para detecção e análise da densidade de *W. pipientis* nas células infectadas por PCR em tempo real, foi adicionado 1 µL do DNA extraído (aproximadamente 60 ng de DNA), em cada reação contendo 1x SYBR® Green I Master mix (Roche LightCycler® 480 SYBR® Green I Master, Cat # 04707516001) e 0,5 µM de cada um dos iniciadores, em um volume final de 10 µL. As reações utilizando os iniciadores para *W. pipientis* e o gene constitutivo foram realizadas separadamente no equipamento LightCycler® 480 (Roche), seguindo os passos de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguida de 45 ciclos de: 95 °C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos e 72 °C por 2 segundos, extensão por 72 °C por 5 minutos. Cada amostra foi analisada através da razão dos genes utilizando a tabela qGENE, via método de quantificação relativa (SIMON, 2003).

**Tabela 2: Iniciadores utilizados para monitoramento e quantificação de *W. pipientis* nas linhagens celulares de *L. longipalpis* Lulo e LL-5.**

Gene	Sequência	Referência
GAPDH_Fw	5'- TTCGCAGAAGACAGTGATGG -3'	Gene ID: LLOJ001891
GAPDH_Rv	5'- CCCTTCATCGGTCTGGACTA -3'	
TM513_Fw	5'-CAAATTGCTCTT GTCCTGTGG -3',	JOURBERT et al, 2016
TM513_Rv	5'-GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG -3	
WSPTM_Fw	5'- CATTGGTGTTGGTGTTGGTG -3'	FRENTIU et al, 2014
WSPTM_Rv	5'- ACACCAGCTTTTACTTGACCAG -3'	

#### **4.6 Monitoramento da infecção de *W. pipientis* em linhagens celulares de *L. longipalpis* via Hibridização Fluorescente in situ (FISH)**

A confirmação da presença de *W. pipientis* dentro das células de flebotomíneos foi realizada através do método de hibridização fluorescente in situ (FISH, do inglês Fluorescent In Situ Hybridisation) (RASGON et al., 2006b) utilizando sondas específicas para o gene 16S de *W. pipientis* marcadas com o corante Rodamina, sendo estas W1: 5' -AATCCGGCCGARCCGACCC- 3' e W2: 5' -CTTCTGTGAGTACCGTCATTATC- 3'. No momento da passagem, 100 µL das células infectadas e não infectadas à 90% de confluência foram adicionados em cada poço de uma "Chamber slide" de 8 poços (Thermo Fisher, Cat No. 171080) contendo 400 µL de meio fresco. Após a transferência das células, as lâminas foram mantidas em incubadora por pelo menos 3 horas para que as células se aderissem ao poço e, em seguida foram fixadas por 10 minutos utilizando solução à 4 °C contendo 4% de formaldeído, 1x PBS e 0,5% Triton X-100. Após o período de fixação, as lâminas foram lavadas em PBS (1x) três vezes por 5 minutos cada, incubadas em etanol absoluto por 5 minutos e, após secagem, as lâminas foram novamente incubadas a 37 °C overnight (aproximadamente 18 horas) sendo que, em cada poço, foram adicionados, em ambiente escuro, cerca de 120 µL do tampão de hibridização. Para preparo deste, 100 ng de cada uma das sondas foram adicionados na solução contendo 50% de formamida (AMRESCO, Cat# 606), solução de SSC 5x (3M de NaCl, 0,34M de Citrato de Sódio em pH 7), 200 g/L de Sulfato de Sódio Dextran (Sigma, Cat# D8906), 250 mg/L de Poli A (Sigma, Cat# P9403), 250 mg/L de ssDNA (AMBION, Cat# AM9680), 250 mg/L de tRNA (Sigma, Cat# D0632), 0,1 M de DTT (Sigma, Cat# D0632), 0,5x de solução de Denhardt's (Invitrogen, Cat#750018).

Após a incubação, as lâminas foram lavadas com solução SSC 1x rapidamente para remoção da lamínula e, para os passos seguintes, as lâminas foram transferidas para em recipiente escuro para evitar que a luz causasse degradação dos corantes. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução SSC 1x e 10mM de DTT (Ditiotreitol, Sigma Cat# D0632) à 55 °C, em banho-maria, por 15 minutos, posteriormente lavadas duas vezes com solução



SSC 0,5x e 10mM de DTT à 55 °C também por 15 minutos e por fim mais uma vez com solução SSC 0,5x e 10mM de DTT à temperatura ambiente por 10 minutos para remoção das sondas ligadas inespecificamente. Para que fosse possível observar o núcleo das células, as lâminas foram incubadas em solução SSC 0,5x contendo 0,75 µg/mL do corante universal de DNA, DAPI (Sigma-Aldrich, Cat#D9542) por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas três vezes com água Mili-Q e foi adicionado aproximadamente 120 µL de Prolong Gold (Life Technologies, Cat# P36930) para evitar a descoloração dos corantes, e seladas com esmalte. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager II, equipado com câmera AxioCam, nas magnitudes de 20x e 40x, sendo que foram utilizadas as mesmas condições de exposição para cada canal de filtros: o corante DAPI é excitado pelo laser violeta de 405 nm possui excitação máxima de 305 nm e emissão máxima de 470 nm, e o Rodamina é excitado pelo laser ultravioleta de 488/532 nm, sendo excitação máxima de 557 nm e emissão máxima de 576 nm.

Para confirmação da infecção de *W. pipientis* nas células de *L. longipalpis* e acompanhamento da infecção, a cada três ou quatro passagens todas as células, tanto infectadas por *W. pipientis* quanto as controle, foram submetidas ao ensaio de FISH.

#### **4.7 Análise da expressão de genes do sistema imune de *L. longipalpis* após infecção estável por *W. pipientis***

Após obtenção de linhagens celulares com infecção estável por *W. pipientis*, foram realizados estudos de expressão gênica de genes envolvidos nas cascatas de diferentes vias, como IMD, TOLL e JAK-STAT, nas células Lulo e LL-5. A partir da 15ª passagem, 200 µL de cada um dos frascos à 90% de confluência, infectados e controle, foram coletados, centrifugados a 600 rpm por 5 minutos para formação do sedimento de células e este foi ressuspendido em 100 µL de TRIzol® para extração de RNA. Foi adicionada uma pérola de vidro de 2 mm para homogeneização das amostras em homogeneizador automático por 30 segundos e

o processo de extração seguiu as condições fornecidas pelo fabricante. Após extração, todas as amostras foram dosadas em espectrofotômetro SynergyMX e foram estocadas em freezer -80 °C até o momento da síntese de cDNA.

Após a extração, 2 µg de RNA foram submetidos ao tratamento com DNase I (Invitrogen, Cat# 18068015) para evitar a contaminação das amostras por DNA. Para isto, cada amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos em reação contendo 2 U de DNase, 1x tampão de reação (200 mM Tris-HCl em pH 8,4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl), num volume final de 20 µL. Para desativar a ação da enzima, foi adicionado 1 µL de EDTA 0,2M em cada amostra e estas foram incubadas a 75 °C por 10 minutos.

Para a síntese de cDNA, em cada amostra foi adicionado 1 µL de Random primer a 250 ng/µL (Invitrogen, Cat# 48190011) e 2 µL de dNTP a 10 mM (Promega, Cat# U151B), estas foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, seguido de banho de gelo por 3 minutos. Posteriormente, foi feita a reação para síntese de cDNA com 12 µL das amostras e, com a outra metade foi feito o mesmo procedimento, mas sem a adição da enzima Superscript III transcriptase reversa (Invitrogen, Cat# 18080-044), para verificar se não houve contaminação por DNA. Para a reação, foi utilizado 1x First-Strand Buffer, 1 µL de DTT a 1 µM, 100 U da enzima transcriptase reversa e água para volume final de 20 µL. Em seguida, ambas as reações foram incubadas a 25 °C por 10 minutos, seguido de 50 °C por 60 minutos e um passo final de 70 °C por 10 minutos. As amostras foram mantidas a -20 °C até o momento do PCR quantitativo.

Para confirmar que a extração e síntese de cDNA foi feita corretamente, todas as amostras foram submetidas à PCR em tempo real utilizando os mesmos iniciadores para o gene constitutivo GAPDH (ID: LLOJ001891) e nas mesmas condições descritas no item 4.3. Já para a análise da expressão de genes do sistema imune, foram desenhados iniciadores para genes das diferentes vias de imunidade utilizando a ferramenta do site NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As sequências utilizadas foram baseadas no genoma anotado de *L. longipalpis* presentes no banco de dados Vector Base (<https://www.vectorbase.org/>), sendo os genes Cactus1 (ID:

LLOJ004612), Caspar (ID: LLOJ002950), PIAS (ID: LLOJ002593-RA), Profenoxidase (ID: LLOJ001742), TEP1 (ID: LLOJ007923), IMD (ID: LLOJ002454), Myd88 (ID: LLOJ009628) e Relish (TINOCO-NUNES et al., 2016). A seleção dos iniciadores foi baseada no conteúdo CG (em torno de 55%), Tm em torno de 60 °C e, após desenho dos mesmos, foi feito BLAST para verificar possível amplificação de outros genes (tabela 3). Cada amostra foi feita em duplicata e a análise foi feita utilizando o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  através do uso da tabela qGENE, sendo estes normalizados pelo gene GAPDH (ID: LLOJ001891). Também foram estudados os peptídeos antimicrobianos (AMPs) relacionados às vias estudados, no caso de células de flebotomíneos com *W. pipientis* que apresentaram diferença significativa em algum dos genes de imunidade estudados. Para isto, foram utilizados iniciadores previamente publicados em estudos anteriores utilizando as células LL-5 (TINOCO-NUNES et al., 2016).

**Tabela 3: Iniciadores utilizados na análise da expressão de genes do sistema imune em células de *L. longipalpis* infectadas por *W. pipientis* em comparação com as células controle.**

Gene	Sequência
Cactus_LlongF	5'- GGCACGTTGACATTCTTCGG -3'
Cactus_LlongR	5'- GCTCATCTTCCTGCCCAACT -3'
Caspar_LlongF	5'- ACACGGGAATGTTGGGGTAG -3'
Caspar_LlongR	5'- CTCACGAATCTCCACACGCT -3'
PIAS_LlongF	5'- GCATCAACCTGCTCCCATCT -3'
PIAS_LlongR	5'- AACTGCCTGCTTATCGCACA -3'
Proph_LlongF	5'- CACCGTACAATGCCAACACG -3'
Proph_LlongR	5'- TGAGGAGAACATTGGCTGGG -3'
TEP1_LlongF	5'- GCTGCACAAAAAGGTCCCAG -3'
TEP1_LlongR	5'- CGGGTTCTGTGTCATTCCGA -3'
IMD_LlongF	5'- TGCCCAGGAGATTGCTCAAG -3'
IMD_LlongR	5'- GGAAAAACATCCGCCTGTCTG -3'
Myd88_LlongF	5'- ACACGGGAATGTTGGGGTAG -3'
Myd88_LlongR	5'- CTCACGAATCTCCACACGCT -3'

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas, após teste de normalidade dos dados, via software GraphPad PRISM versão 5.03, considerando o valor de  $P \leq 0.05$ .

#### **4.8 Interação com Leishmania (L.) infantum em células Lulo controle e células Lulo infectadas por W. pipientis**

Para testar se a presença de *W. pipientis* causa algum efeito na interação com *Leishmania* *in vitro*, utilizamos as células Lulo, com e sem a cepa wMelPop-CLA, e promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, cepa PP75 (MHOM/BR/74/PP75).

Estudos anteriores demonstraram que, através da cultura de *Leishmania*, é possível obter as diversas formas do parasito (procíclicas, nectomonadas e leptomonadas) e realizar ensaios de interação *in vitro* e em ensaios *ex vivo* (GOSSAGE et al., 2003; PINTO-DA-SILVA et al., 2005; DI-BLASI et al., 2015). Para isto, testamos duas densidades de *W. pipientis* nas células para investigar se a quantidade de bactéria nestas células poderia interferir na adesão do parasito. Para isto, antes do contato entre parasito-célula, foram feitas reações de PCR para determinar estas densidades, sendo utilizadas as proporções de 5 e 10 *W. pipientis* por célula, em comparação com as células não infectadas pela bactéria (controle).

Os parasitos do gênero *Leishmania* foram cultivados em meio Schneider's (GIBCO) suplementado com 10% de SFB inativado (GIBCO), 1% v/v GlutaMAX (GIBCO), 1% v/v BME Solução de Vitaminas 100x (Sigma-Aldrich), 2% urina humana estéril e os antibióticos Penicilina (100 U/ml) e Estreptomicina (100 µg/ml) (GIBCO), e mantidos em frascos de cultivo em incubadoras à 28 °C sem CO<sub>2</sub>.

O experimento foi realizado como descrito anteriormente por Cortes e colaboradores, com algumas modificações (CORTÉS et al., 2011). Para a infecção entre as células de flebotomíneos e os promastigotas, diferentes concentrações de *L. infantum* e células foram testadas, sendo 10:1, 5:1 1:1 e 0,1:1 parasitos por célula.

As células Lulo infectadas por *W. pipientis* e as não infectadas (controle) foram cultivadas em lamínulas de vidro em uma placa de 24 poços, sendo a quantidade final de células de  $2 \times 10^6$  células por poço, um dia antes da infecção pelos parasitos. No dia da infecção, as promastigotas foram coletadas na fase de log (crescimento), sendo estas oriundas da terceira ou quarta passagem após isolamento de hamsters, e diluídas em Isoton para posterior contagem das mesmas

em câmara de Neubauer na mesma concentração que as células. Após contagem, os parasitos foram diluídos em meio L-15 Leibovitz, como descrito anteriormente, adicionados em cada um dos poços contendo as células Lulo e mantidos em incubadora à 28 °C sem CO<sub>2</sub>.

Duas horas após a interação entre as células e parasitos, as promastigotas presentes no sobrenadante foram descartadas junto com o meio e as células foram lavadas com a solução salina PBS para remover as promastigotas não aderidas (pH 7,2). Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio L-15 fresco e as células foram monitoradas e coletadas 2, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. A cada tempo do estudo da cinética, as células aderidas à lamínula de vidro foram fixadas com metanol e coradas com o kit Quick Dip Field Staining (Thermo Fisher), seguindo as condições do fabricante, e montadas em lâminas de microscopia com Bálsamo de Canadá (Sigma-Aldrich) para posteriores análises. Quatro experimentos independentes foram realizados neste estudo.

Ao término da coleta de todos os tempos, o número de promastigotas aderidas por célula em ambas, com e sem *W. pipientis*, foi determinado pela contagem de 200 células por lamínula de vidro através de microscópio (AXIO Imager II, Zeiss) equipado com AxioCam, utilizando a objetiva de imersão de aumento de 100x. O resultado da contagem foi expresso através da percentagem de células com o parasito em diferentes tempos pós-infecção. A análise estatística foi calculada utilizando os testes ANOVA e Bonferroni para comparação de todos os resultados através do software GraphPRISM versão 5.03, considerando o valor de  $P \leq 0.05$ .

#### **4.9 Efeito da presença de *W. pipientis* na infecção por vírus endógenos em células Lulo**

Estudos anteriores mostraram que as células Lulo são naturalmente infectadas por dois vírus específicos de insetos, Luteovírus e Permutotetravírus (FERREIRA et al., 2018). Para analisar se a bactéria *W. pipientis* tem efeito na carga viral destes vírus específicos de insetos, amostras de células Lulo, com e

sem wMelPop-CLA (após estabilidade da infecção) com densidades semelhantes de infecção, foram utilizados neste experimento.

Para isto, 200 µL de cada um dos frascos de células Lulo à 90% de confluência, infectados e controle, foram coletados, centrifugados à 600 rpm por 5 minutos para formação do sedimento de células e este foi ressuspendido em 100 µL de TRIzol para extração de RNA. O processo de extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA foi feito seguindo os mesmos protocolos descritos no item 4.7 e amostras foram mantidas a -20 °C até o momento do PCR quantitativo.

Para confirmar que a extração e síntese de cDNA foi feita corretamente, todas as amostras foram submetidas à PCR em tempo real utilizando os mesmos iniciadores para o gene constitutivo GAPDH (ID: LLOJ001891) e nas mesmas condições descritas no item 4.3. Para detecção de ambos os vírus, iniciadores foram desenhados baseando-se no genoma viral (FERREIRA et al., 2018) utilizando a ferramenta do site NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A seleção dos iniciadores foi baseada no conteúdo CG (em torno de 55%), Tm em torno de 60 °C e, após desenho dos mesmos, foi feito BLAST para verificar possível amplificação de outros genes (tabela 4). Cada amostra foi feita em duplicata e a análise foi feita utilizando o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  com a tabela qGENE, sendo estes normalizados pelo gene GAPDH (ID: LLOJ001891).

**Tabela 4: Iniciadores utilizados para verificar a carga viral em células Lulo infectadas por *W. pipientis* em comparação com as células controle.**

Iniciador	Sequência
Luteov_coat F	5'- GGAGCCCCTTATGTTGGACC -3'
Luteov_coat R	5'- AAGGCTGTATTGGCTTCCCC -3'
Permut_coat F	5'- AAGTGGTGGGAGTCGTTGAC -3'
Permut_coat R	5'- GGACCAGAAAGCGTGACAGA -3'

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas, após teste de normalidade dos dados, via software GraphPad PRISM versão 5.03, considerando o valor de  $P \leq 0.05$ .



## 5 Resultados

### 5.1 Transfecção de *W. pipientis* em células de flebotomíneos

Ambas as células LL-5 e Lulo foram submetidas a sucessivas tentativas de infecção pela cepa wMel utilizando ovários de mosquitos mantidos no laboratório de Mosquitos Vetores no Instituto de Pesquisas René Rachou. Os resultados a partir de PCR quantitativo em tempo real confirmaram a ausência de *W. pipientis* em ambas as células de flebotomíneos infectadas a partir deste método.

Diante disto, os experimentos seguintes foram feitos a partir do protocolo de extração de *W. pipientis* a partir da linhagem celular RML12 de *Aedes albopictus* com as cepas wMel e wMelPop-CLA. Além da infecção em células de flebotomíneos, as células RML12 e Mos55 também foram infectadas como controle para validação do protocolo de extração e infecção.

Foi observado que, em alguns dos experimentos, as células não sobreviveram após as infecções ou demoravam bastante até que se multiplicassem suficientemente para serem transferidas para a garrafa de cultivo celular.

Para o monitoramento da bactéria *W. pipientis* nas células infectadas, a cada passagem dos frascos infectados, alíquotas foram coletadas para extração de DNA e qPCR para verificar a infecção por *W. pipientis*, além do congelamento de parte das células para manter um back-up caso a infecção por *W. pipientis* tivesse uma densidade elevada e caso ocorresse algum problema de contaminação. Inicialmente, foi feito o qPCR utilizando SYBR Green e os iniciadores para detecção do gene TM513 para wMel e iniciadores específicos para wMelPop-CLA (dados não publicados). A análise dos resultados foi baseada no valor absoluto do número de cópias de determinado gene dado pelo valor de Cp da PCR em tempo real. Em todas as células, a densidade de *W. pipientis* foi monitorada a cada passagem através da extração de DNA e quantificação pelo PCR em tempo real (figura 5).

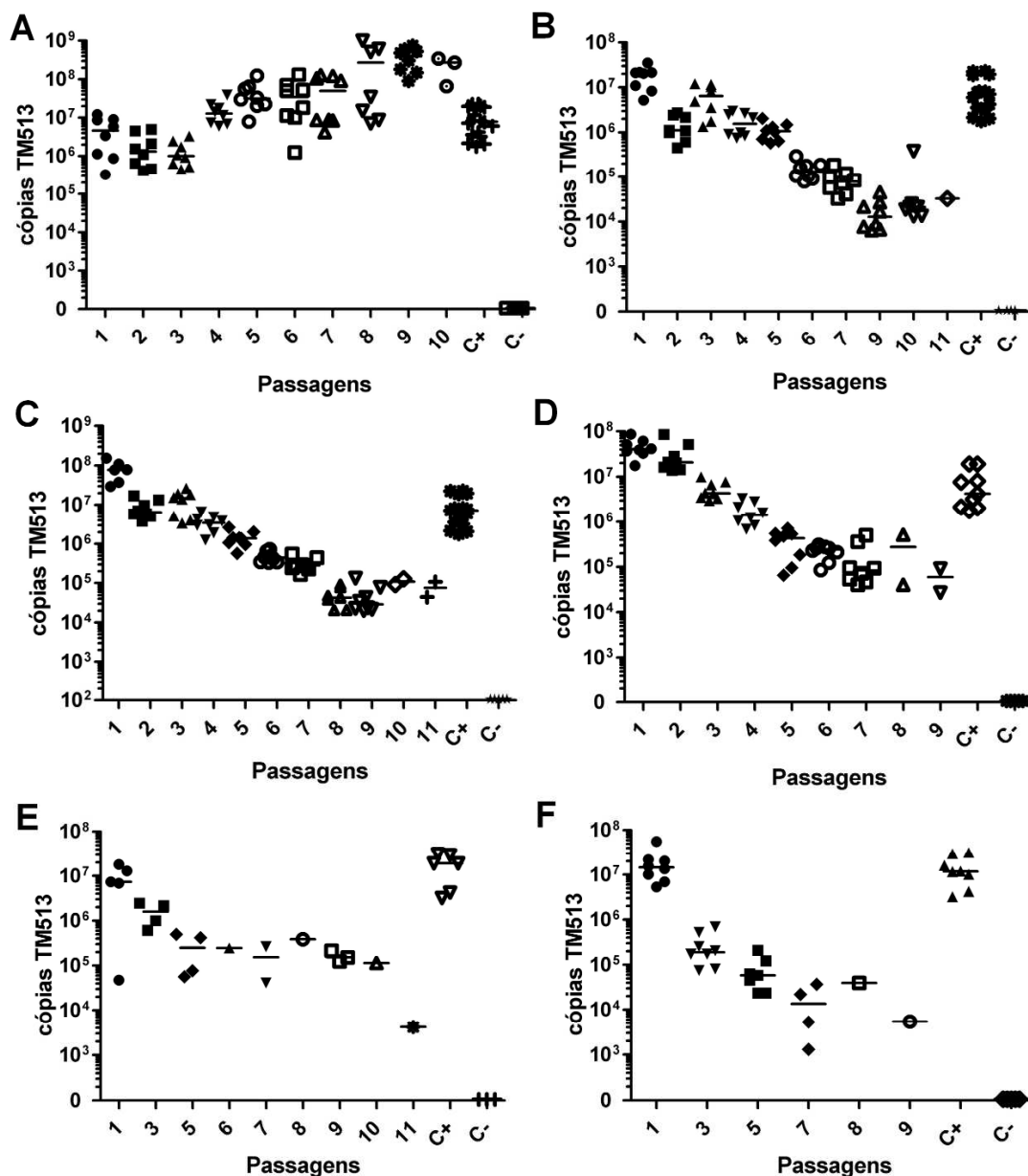


Figura 5: Gráficos de quantificação absoluta por qPCR de *W. pipientis* wMel à cada passagem das células. Foi possível observar o aumento da quantidade de *W. pipientis* nas células controle RML12 (A), o que não ocorreu nos frascos contendo as células de flebotomíneos ao longo das passagens, como demonstrado nas células Lulo (B, D e F) e LL-5 (C e E). Cada gráfico representa células infectadas à partir do mesmo extraído de *W. pipientis* e cada um dos pontos representam diferentes garrafas de células infectadas. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

Nas infecções iniciais, a passagem das células foi feita a cada 5 dias e, talvez devido a alta frequência das passagens, em conjunto com o não crescimento das células após várias passagens, não foi possível a multiplicação e disseminação

da *W. pipientis* nas células de flebotomíneos LL-5 e Lulo. Já nas células de mosquitos RML12, podemos observar que a cada passagem o valor absoluto foi aumentando, o que indica a eficiência do processo de extração e infecção de *W. pipientis* a partir de linhagens celulares (figura 5A).

Outra forma de confirmar a infecção por *W. pipientis* foi feita através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A cada três ou quatro passagens, as células infectadas foram submetidas à técnica para confirmar a presença de *W. pipientis* nas células recém-infectadas, tanto de mosquitos (figura 6), quanto de flebotomíneos (figura 7).

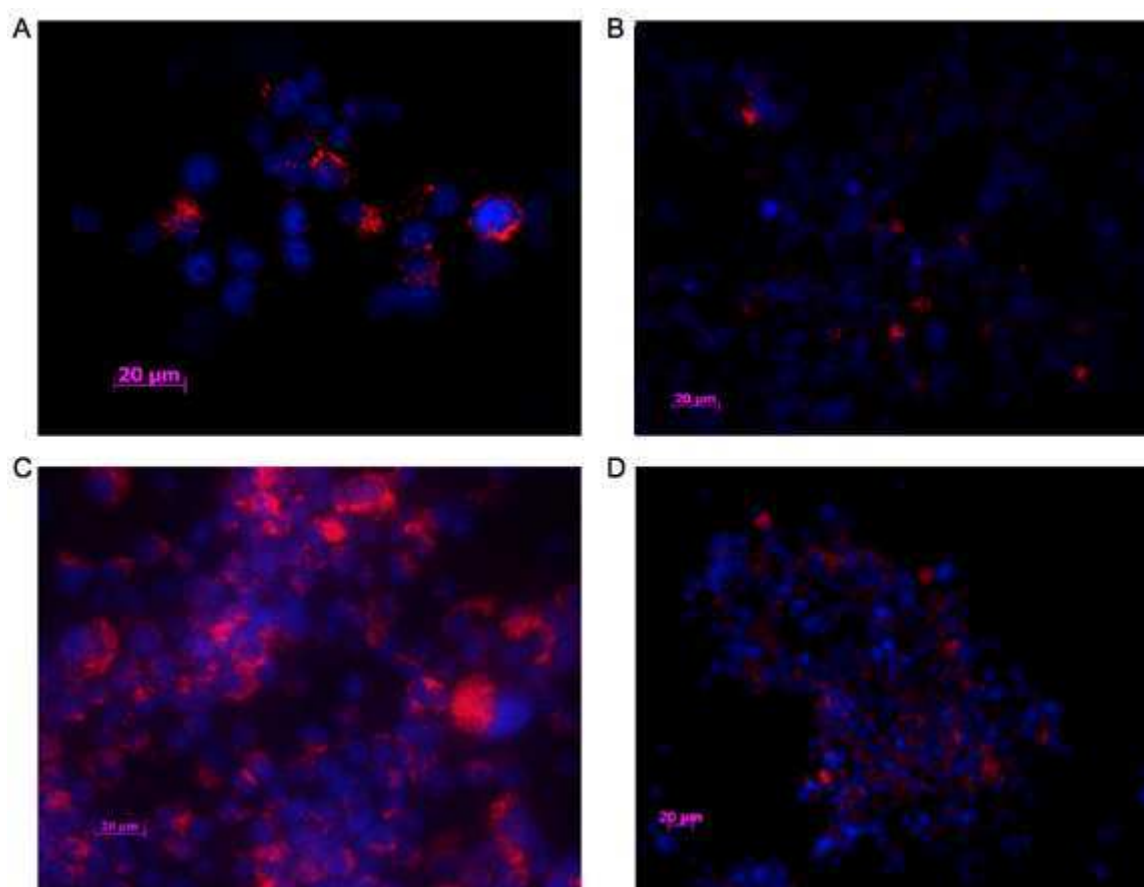


Figura 6: FISH com as células RML12 e Mos55 infectadas por *wMel* para validação do protocolo de infecção. Em (A) observamos as células RML12 e em (B), as células Moss55, ambas na 4ª passagem após transferência para o frasco. Em (C) as células RML12 e em (D) as células Moss55, ambas na 7ª passagem, onde podemos observar claramente a disseminação e estabelecimento de *W. pipientis* nas células de mosquitos em vermelho e, em azul, observamos o núcleo das células.

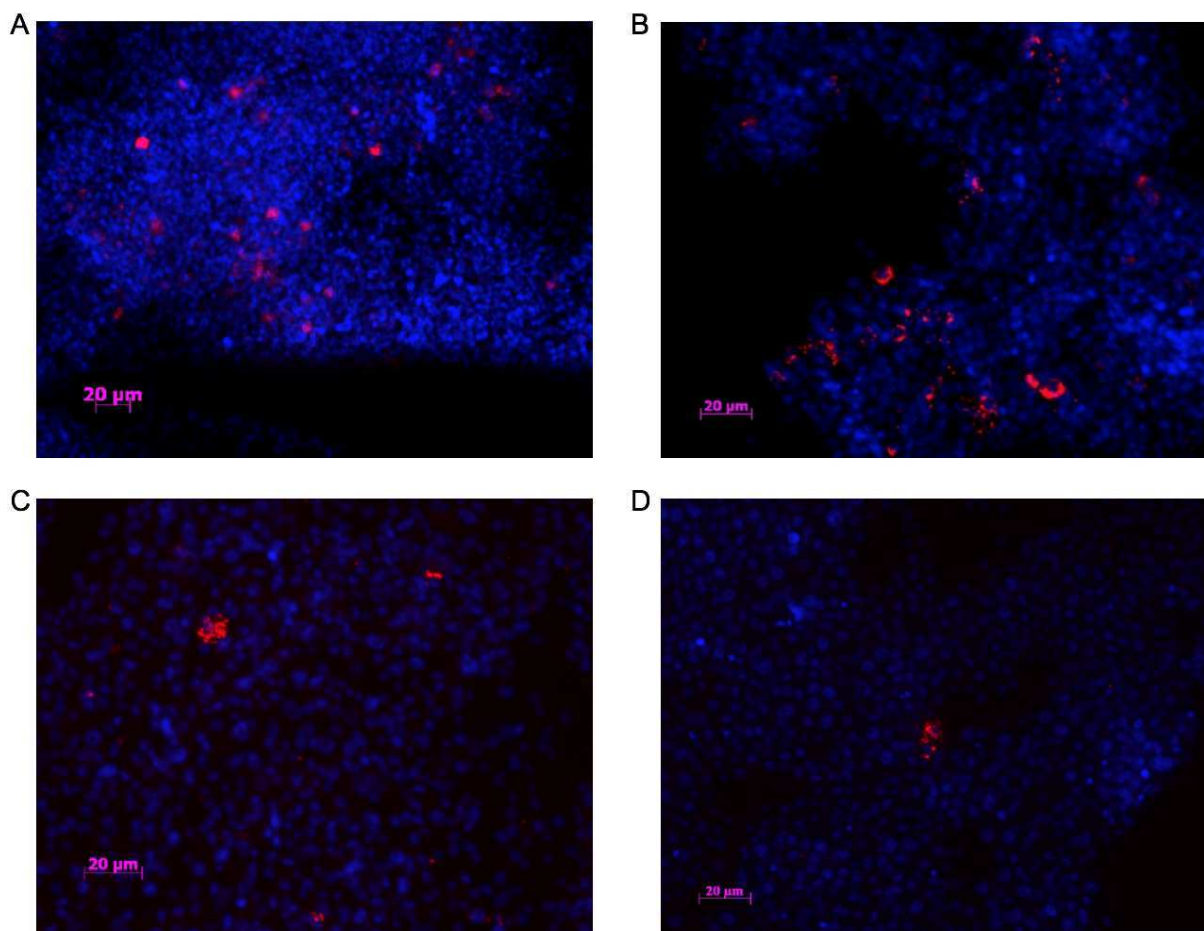


Figura 7: FISH com as células LL-5 e Lulo para confirmar a infecção de *W. pipientis*. As células LL-5 (A) e Lulo (B) infectadas por wMel na 4<sup>a</sup> passagem após infecção, e LL-5 (C) e Lulo (D) na 7<sup>a</sup> passagem pós-infecção, ambas com baixa densidade de *W. pipientis*, representada em vermelho e, em azul, observamos o núcleo das células.

Juntamente com as células infectadas, as células controle de flebotomíneos e de mosquitos foram submetidas à hibridização fluorescente *in situ*, para confirmar ausência de *W. pipientis* e possíveis contaminações cruzadas (figura 8).

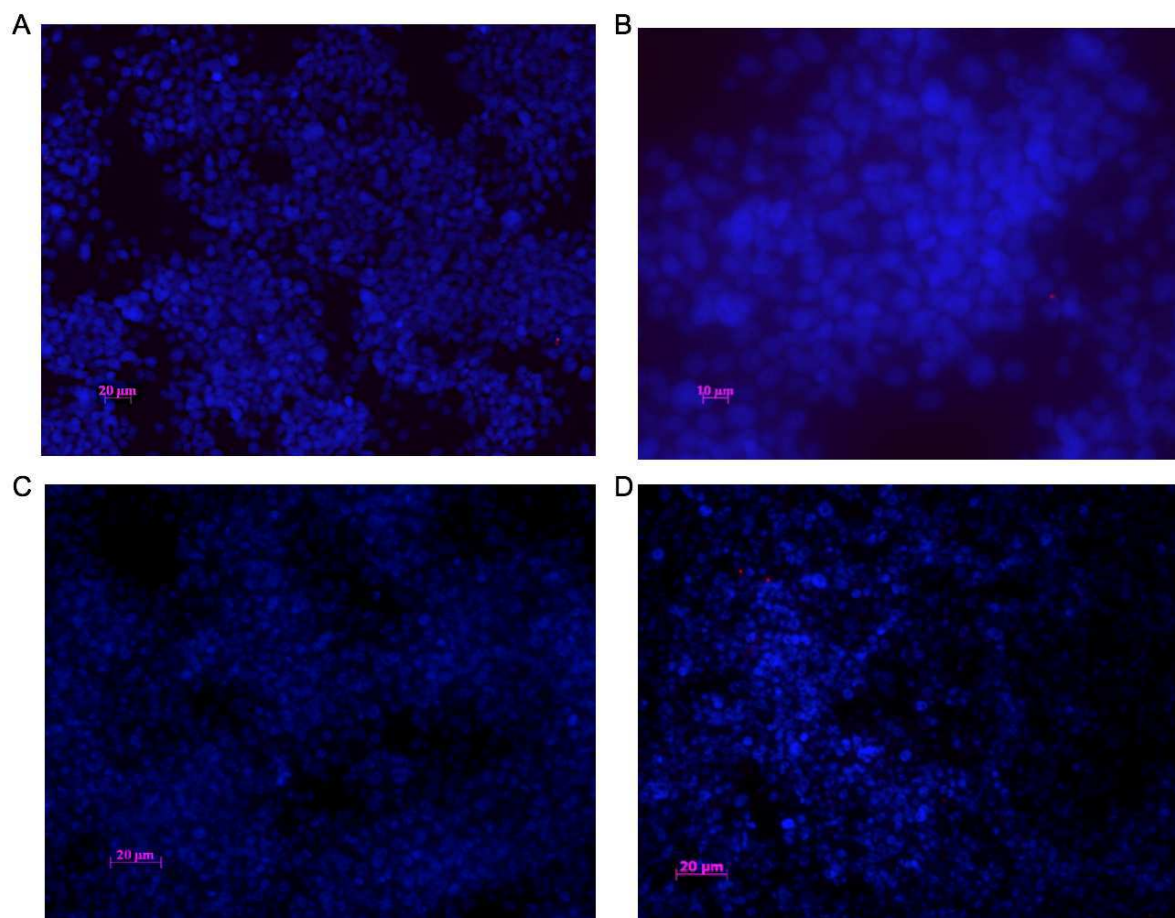


Figura 8: FISH com as células controle de mosquitos e de flebotomíneos. Imagem das células controle de mosquitos em RML12 (A) e Mos55 (B), além de células de flebotomíneos, sendo LL-5 (C) e Lulo (D), sem a presença de *W. pipientis*. Em azul, observamos o núcleo das células.

Como foi descrito anteriormente, a transmissão de *W. pipientis* para as novas células é um processo difícil, já que a divisão celular não é um evento simétrico, sendo que a partir de uma célula infectada não necessariamente serão geradas células 100% infectadas (VORONIN, 2009), e também pela perda da infecção após várias passagens devido a baixa taxa ou não crescimento das células infectadas, além da ausência de confluência (McMENIMAN et. al., 2008). Diante disto, diversas metodologias foram aplicadas, após a infecção, para tentar aumentar a densidade de *W. pipientis* nas células de flebotomíneos. Uma delas foi tentar selecionar as células com maior densidade através da transferência dos frascos infectados para placa de 96 poços. Através do qPCR em tempo real utilizando os iniciadores específicos para *wMel*, TM513, os poços os quais

possuíam maior densidade da bactéria foram selecionados e então transferidos para placa de 24 poços até que ficassem confluentes, e o processo de transferência para placa de 96 poços e seleção dos mesmos com maior densidade foi repetido. Esta seleção foi feita três vezes, mas, após a última seleção, a densidade de *W. pipientis* voltou a cair (figura 9).

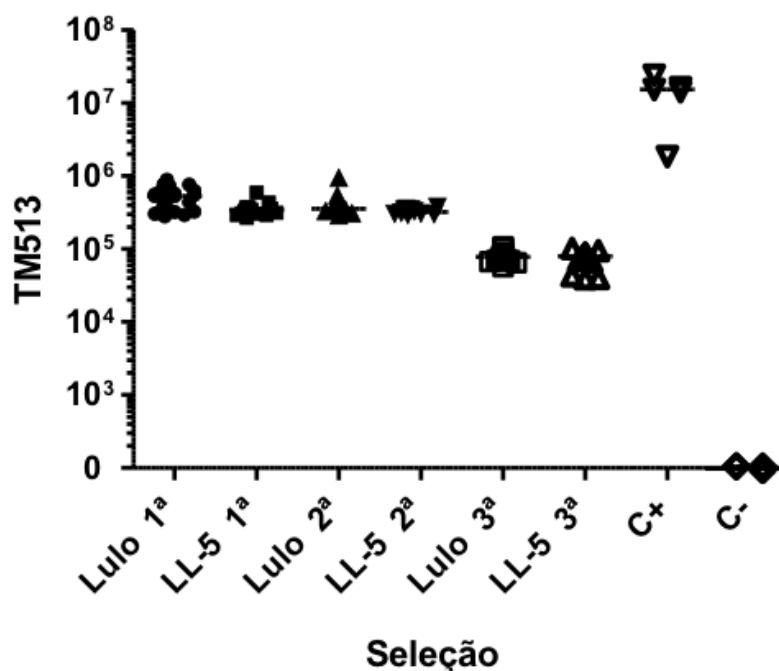


Figura 9: Teste de seleção das células de flebotomíneos com maior densidade da cepa da bactéria wMel. Foram feitos testes de seleção das células com maior densidade de *W. pipientis* com ambas as células LL-5 e Lulo. Cada ponto representa diferentes frascos de células provenientes de diferentes infecções por *W. pipientis*. C+: controle positivo. C-: controle negativo.

Foi realizada a comparação da densidade de *W. pipientis*, da cepa wMel, nas células aderidas ao frasco em relação às células não aderidas para verificar se estávamos perdendo as células infectadas ao longo das passagens devido a estas células flutuantes no meio. Após teste com as células de mosquitos e de flebotomíneos, foi observado que as células aderidas apresentavam densidade bastante semelhante ou maior do que as células flutuantes, tanto nas células de mosquitos, quanto de flebotomíneos (figura 10).



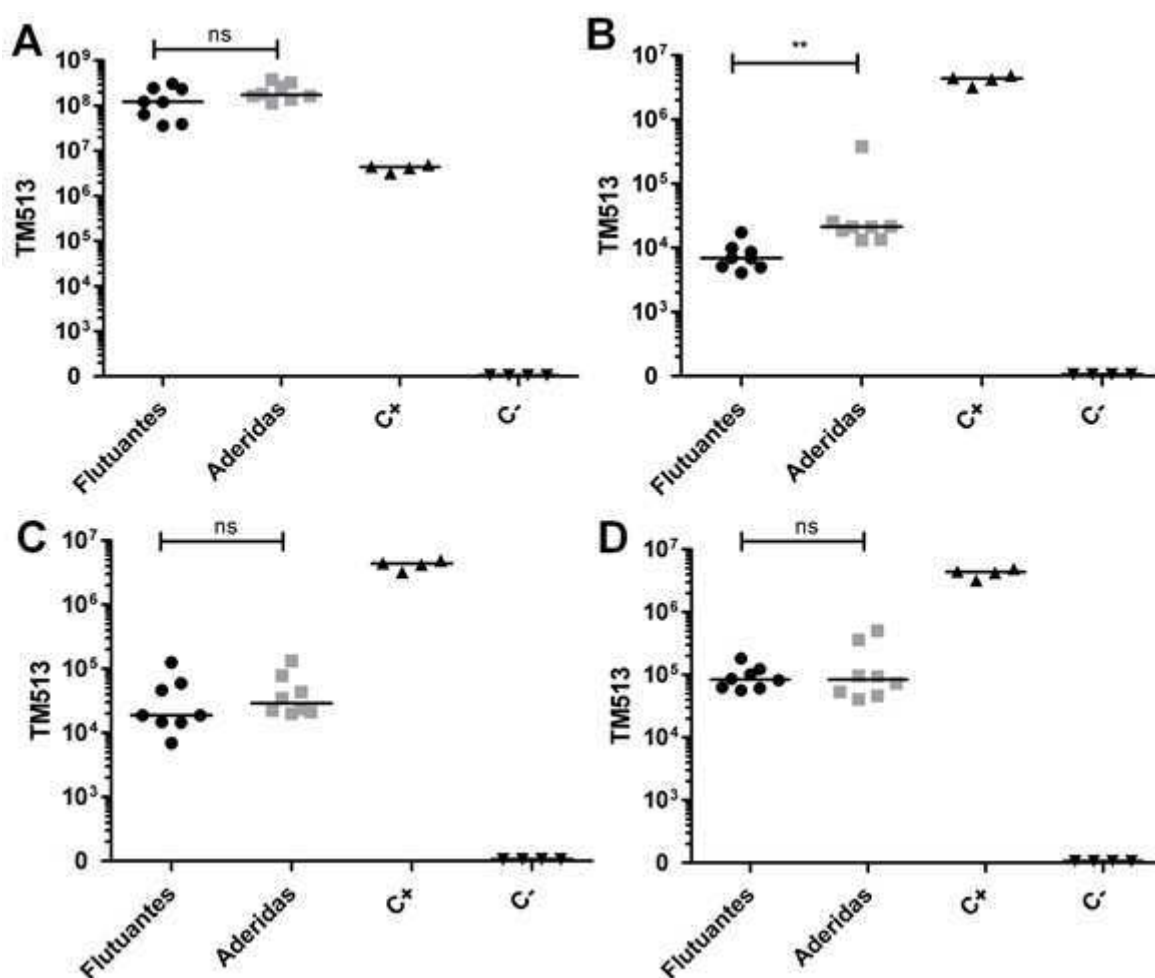


Figura 10: Comparação da densidade de *W. pipientis* entre as células aderidas e flutuantes nos frascos infectados com wMel. Nas células de mosquitos RML12 (A), não teve diferença significativa entre as células aderidas e flutuantes. Em Lulo (B), a densidade de *W. pipientis* foi maior nas células aderidas. Nas células Lulo (C) e LL-5 (D), as células de flebotomíneos aderidas aos frascos também não apresentaram diferença estatística na densidade de *W. pipientis* em relação as células flutuantes. O gráfico apresenta a mediana e  $P \leq 0.05$ , sendo cada asterisco o nível de significância

Outra tentativa de aumentar a densidade de *W. pipientis* nas células infectadas foi deixá-las por duas semanas sem fazer passagem, somente trocando o meio, de forma que a bactéria tivesse tempo de se multiplicar e infectar novas células sem que estas últimas se multiplicassem mais rapidamente. Após duas

semanas, foi feita a passagem das células e o PCR quantitativo para verificar se houve diferença na concentração absoluta de *W. pipientis*, mas a densidade se manteve bastante semelhante ou menor (figura 11).

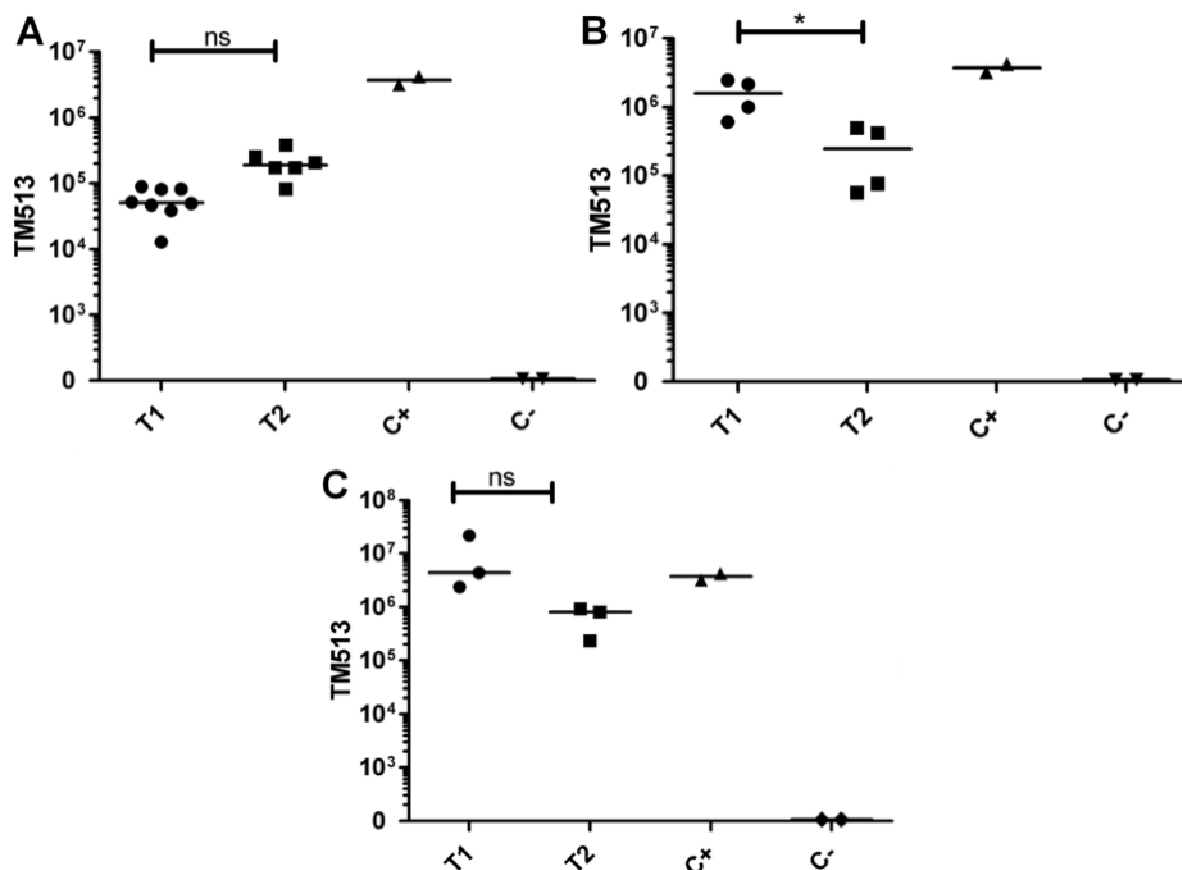


Figura 11: Comparação das densidades de *W. pipientis* nas células de flebotomíneos após duas semanas sem passagem. Tanto nas células de mosquitos RML12 (A) quanto de flebotomíneos Lulo (B) e LL-5 (C), após duas semanas (T2) sem que fosse feita a passagem foi possível observar que não houve aumento significativo na densidade de *W. pipientis* em relação à passagem anterior (T1). As barras representam a mediana. C+: controle positivo e C-: controle negativo.

Após diferentes tentativas de aumento da densidade de *wMel*, foi estabelecido que a frequência de passagem nas células fosse reduzida, sendo feita a cada 7-10 dias e, após 4 dias da passagem anterior, o meio foi descartado e adicionado 4 mL de meio fresco seguindo as mesmas concentrações descritas no item 4.2, com exceção de SFB que foi adicionado apenas 2%, para evitar o crescimento rápido das células nos frascos.



Novas infecções foram feitas e ainda assim a cepa wMel não conseguiu se estabelecer nas células de flebotomíneos, tanto na LL-5 (figura 12A) quanto na Lulo (figura 12B). No ensaio de imunofluorescência também foi possível observar a densidade baixa de *W. pipientis* nestas células (figura 13).

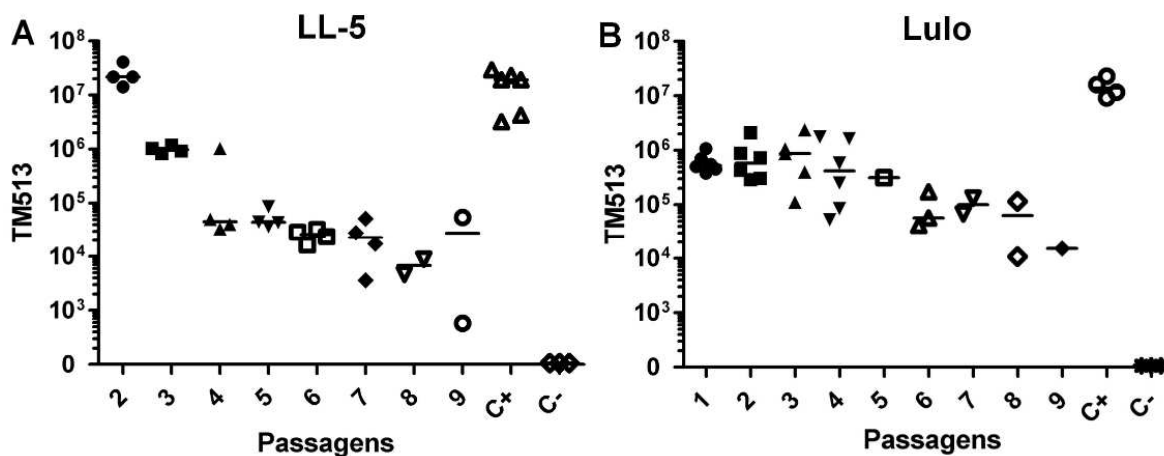


Figura 12: Acompanhamento das células de flebotomíneos infectadas por wMel, após modificações no protocolo de manutenção das células. Após diversas tentativas de modificações do protocolo, foi possível observar que a densidade desta cepa de *W. pipientis* continuou a diminuir ao longo das passagens nas células LL-5 (A) e Lulo (B). As barras representam a mediana. C+: controle positivo e C-: controle negativo.

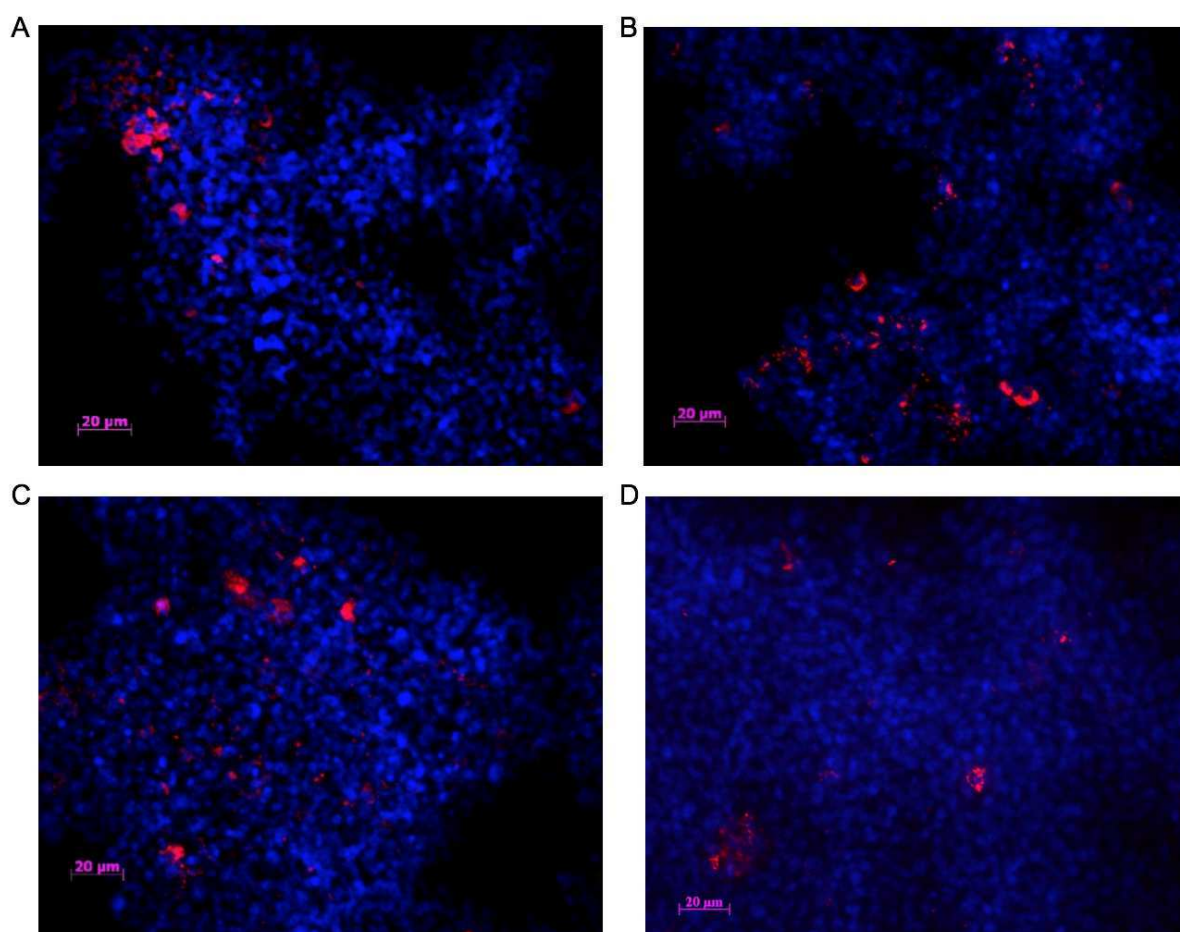


Figura 13: Ensaio de imunofluorescência com as células LL-5 e Lulo infectadas com wMel. Em (A) as células LL-5 estavam na sua terceira passagem, enquanto que em (B), as mesmas estavam na sétima passagem. Em (C), observamos as células Lulo também na terceira passagem e, em (D), na sétima passagem. Ambas as células com baixa densidade de *W. pipiensis*, representada em vermelho, e, em azul, observamos o núcleo das células.

Devido a dificuldade de se obter uma infecção estável por wMel, foram feitas novas infecções utilizando também a cepa virulenta wMelPop-CLA nas células de flebotomíneos LL-5 e Lulo, aplicando-se estas novas modificações estabelecidas para manutenção das mesmas pós-infecção.

Ao longo das passagens, pôde-se observar que a cepa wMelPop-CLA se apresentou mais estável na célula Lulo, em comparação com as infecções na célula LL-5 (figura 14).

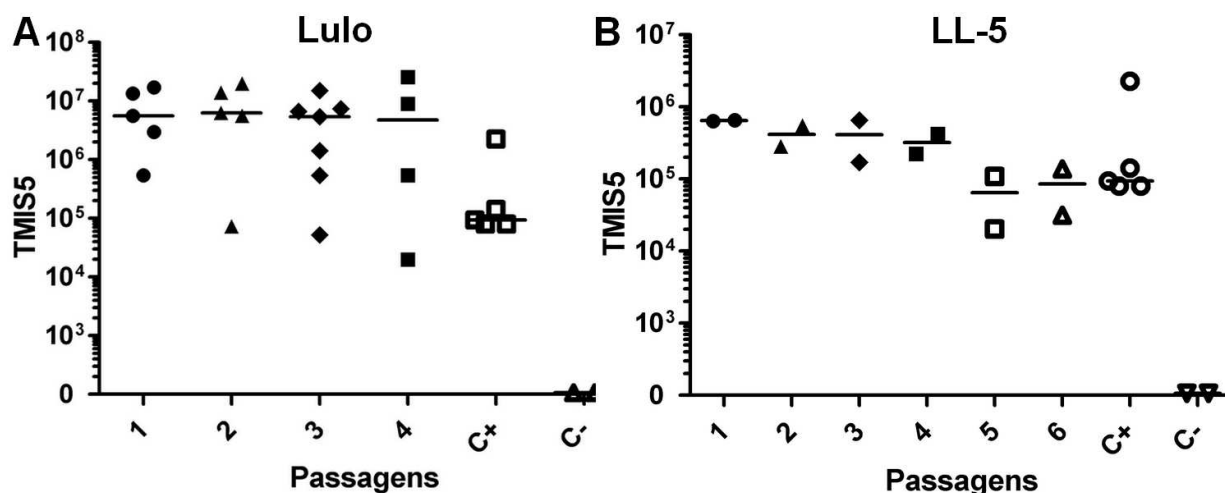


Figura 14: Gráfico representativo da quantificação absoluta da cepa wMelPop-CLA de *W. pipientis* nas células de flebotomíneos. Nas infecções iniciais de wMelPop-CLA em células de flebotomíneos, Lulo (A) apresentou uma densidade da bactéria mais constante nas primeiras passagens em comparação com LL-5 (B). C+: controle positivo, C-: controle negativo.

## 5.2 Obtenção de infecção estável de *W. pipientis* em células de *L. longipalpis*

Durante as infecções com a cepa wMelPop-CLA, inicialmente observamos que, por quantificação absoluta, a densidade de *W. pipientis* em ambas as células não foi reduzida drasticamente, como observado nos resultados das infecções por wMel. Inicialmente, a infecção por esta cepa foi melhor nas células Lulo, em comparação com as células LL-5, utilizando qPCR com quantificação relativa (figura 15A e 15D). Através da técnica de FISH, foi possível confirmar o melhor estabelecimento de wMelPop-CLA na célula Lulo (figura 15E e 15F), em comparação com a infecção na célula LL-5 (figura 15B e 15C).

Após diversas tentativas de infecção estável pelas cepas de *W. pipientis*, foi observado que as células com a quantidade absoluta de *W. pipientis* semelhantes no qPCR não apresentavam semelhantes densidades em FISH. Diante desta divergência, para melhor quantificação da densidade de *W. pipientis* nas células, foi utilizada a quantificação relativa. Inicialmente foram utilizados os iniciadores

específicos para cada cepa (figura 15A e 15D), mas para melhor comparação da densidade de ambas as cepas, foi utilizado iniciadores para o gene *wsp* de *W. pipientis*, normalizado com os iniciadores para o gene *GAPDH* de *L. longipalpis*.

Ao longo das passagens, através da quantificação relativa, observamos que a densidade de *W. pipientis* varia a cada passagem e também entre as infecções (figura 15A e 15D).

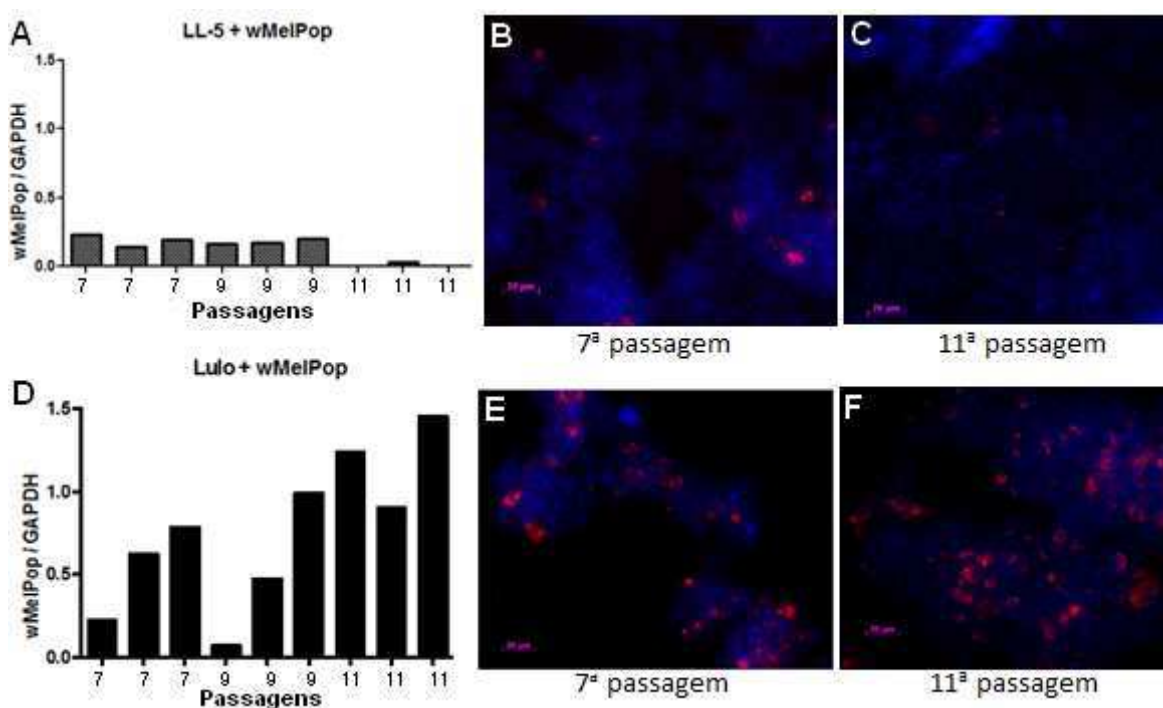


Figura 15: Quantificação relativa de *W. pipientis*, cepa wMelPop-CLA, nas células de flebotomíneos. Quantificação relativa da densidade de *W. pipientis* nas primeiras infecções das células LL-5 (A) e Lulo (D), por wMelPop-CLA. Cada barra representa células oriundas de diferentes infecções nas suas respectivas passagens. Confirmação da infecção através de FISH nas células LL-5 (B e C) e em Lulo (E e F), onde em vermelho observamos a bactéria e em azul o núcleo das células.

A cepa wMelPop-CLA conseguiu se multiplicar e se estabelecer nas células Lulo mais facilmente e com maior densidade do que nas células LL-5. A alta densidade de *W. pipientis* nas células de flebotomíneos foi confirmada através da técnica de hibridização *in vitro*, onde foi possível visualizar a disseminação da

bactéria em ambas as células, sendo maior a densidade nas células Lulo (figuras 16B e 16E).

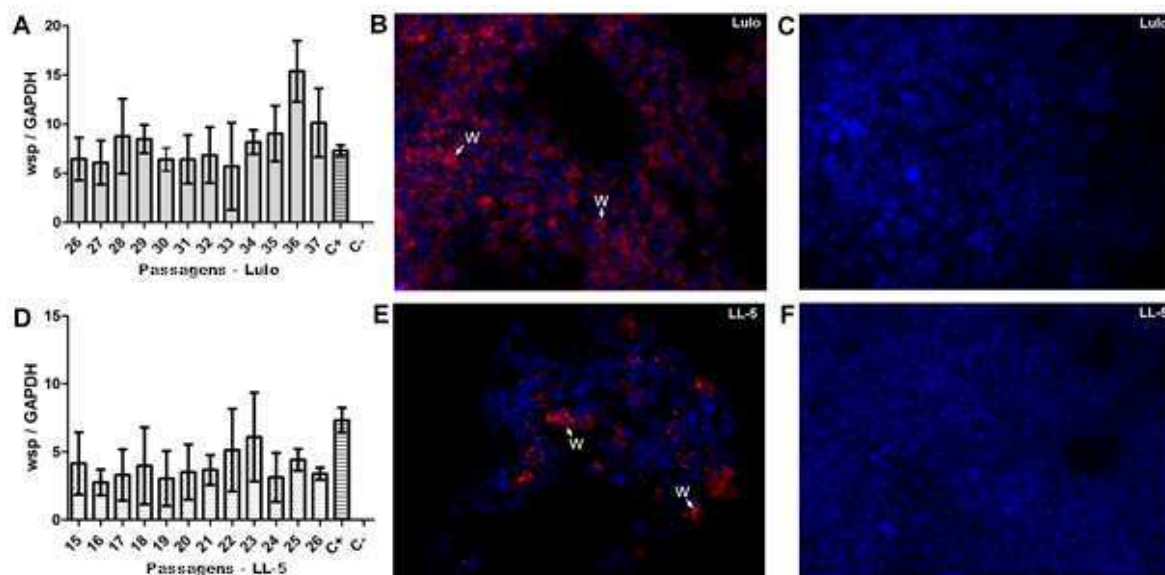


Figura 16: Gráfico representativo da variação da densidade de *W. pipientis* nas células Lulo e LL-5 infectadas com a cepa wMelPop-CLA. Cada barra representa a respectiva passagem das células e a quantificação relativa de *W. pipientis* utilizando os genes *wsp* e *GAPDH*. Em (A), observamos a variação da densidade de *W. pipientis* as células Lulo ao longo das passagens e, em (D), nas células LL-5. Em (B) e (E) observamos a densidade de *W. pipientis* (em vermelho) nas células de flebotomíneos e, em (C) e (F) observamos o núcleo das células controle (em azul). C+: controle positivo, C-: controle negativo.

Na célula Lulo, a alta densidade da cepa wMelPop-CLA de *W. pipientis* se manteve ao longo das passagens, apesar de variações ao longo do tempo, sendo que as mesmas têm sido mantidas por mais de 70 passagens em laboratório (aproximadamente 1,8 anos). Por outro lado, nas células LL-5, foi mais demorada a disseminação da bactéria e, mesmo com a baixa densidade em comparação com Lulo, estas células têm sido mantidas por cerca de 35 passagens. Além disso, alíquotas das células foram congeladas e mantidas em freezer à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, mesmo após o processo de congelamento e descongelamento, as células foram

recuperadas e a densidade de *W. pipientis* se manteve em níveis semelhantes, principalmente nas células Lulo.

### **5.3 Estudo da expressão de genes ligados ao sistema imune inato em células LL-5 nos estágios iniciais de infecção por *W. pipientis***

Para melhor compreensão da dificuldade de se obter uma infecção estável de *W. pipientis* nas células LL-5, foi proposto o estudo da expressão gênica do sistema imune destas células nos estágios iniciais de infecção por ambas as cepas, wMel e wMelPop-CLA, seguindo um estudo previamente publicado por colaboradores (TINOCO-NUNES et al., 2016). Após infecção, as células foram monitoradas nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós-infecção pelas cepas de *W. pipientis* em comparação com as células controle.

Após o processamento das amostras, através da detecção do gene *wsp*, foi observado que a densidade de ambas as cepas de *W. pipientis* foi diminuindo gradativamente desde o início até 72 horas pós infecção (figura 17A).

Em relação à expressão dos genes de imunidade, quando comparado com o grupo não-infectado (controle), as células LL-5 responderam à ambas as cepas aumentando significativamente a expressão dos fatores de transcrição Dorsal no tempo de 12 horas pós infecção (figura 17C). Já o gene Relish apresentou um aumento de expressão 12 horas após contato com wMelPop-CLA e o STAT no tempo de 24 horas após infecção por wMel (figura 17E e 17G).

O gene que suprime a via Toll, Cactus, não apresentou diferença significativa na sua expressão em comparação com as células controle (figura 17B), enquanto que a expressão de Caspar e PIAS, repressores das vias IMD e JAK-STAT, foi significativamente aumentada 48 horas e 12 horas pós infecção, respectivamente (figura 17D e 17F) em resposta à cepa wMelPop-CLA.





Os peptídeos antimicrobianos Attacina, Cecropina, Defensina 1 e Defensina 2, os quais são moléculas efetoras da resposta imune inata as quais combatem infecções por bactérias, fungos e/ou vírus, tiveram sua expressão aumentada significativamente nos tempos de 12 horas e/ou 24 horas pós infecção (figura 18A, 18B, 18C e 18D, respectivamente) após infecção por ambas as cepas, exceto Defensina 1 que somente foi aumentada significativamente no tempo de 6h. O peptídeo Defensina 2 foi altamente expresso a partir de 12 horas até 48 horas pós infecção por wMelPop-CLA (figura 19D).

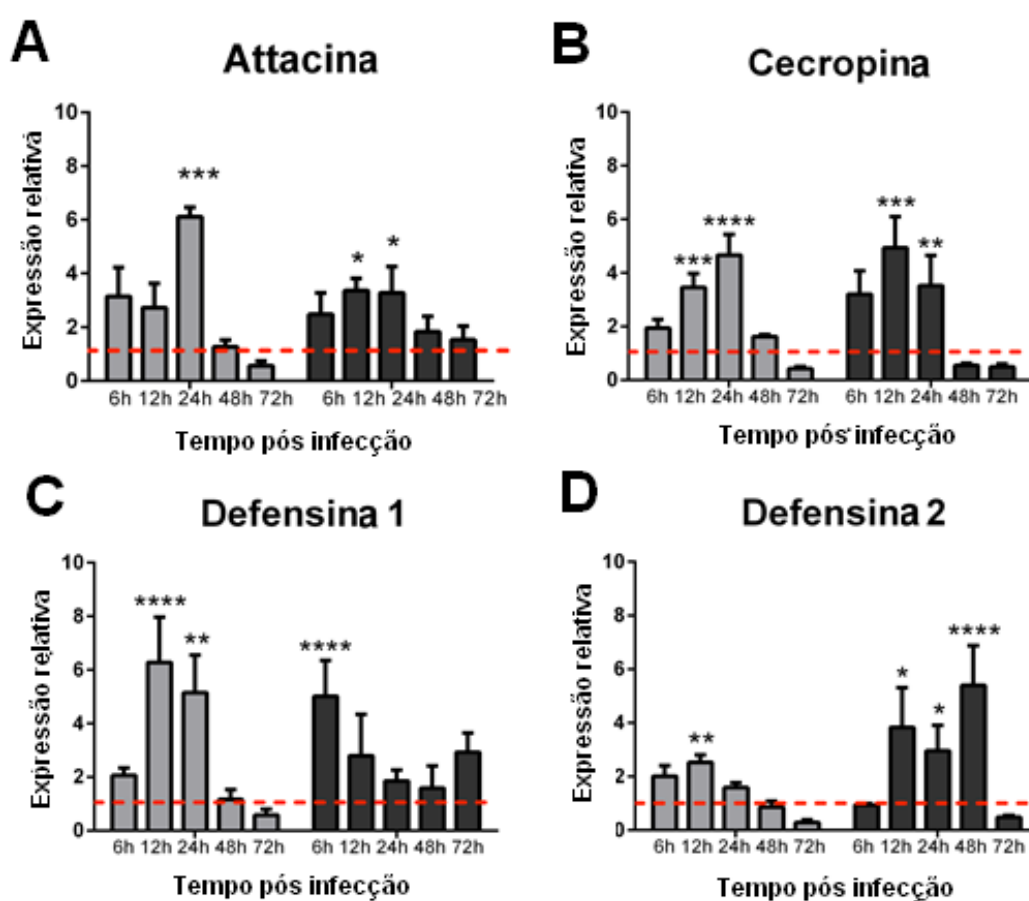


Figura 18: Estágios iniciais da expressão de AMPs e estresse oxidativo das células LL-5 após infecção por *W. pipientis*. Expressão dos AMPs nas células LL-5 infectadas com as cepas wMel (cinza) e wMelPop-CLA (preto): Attacina (A), Cecropina (B), Defensina 1 (C) e Defensina 2 (D). As barras representam fold change em relação as células controle, com a média e desvio padrão de três replicas biológicas coletadas nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h e 72h pós infecção, sendo em cinza após o contato com a cepa wMel e em preto com a cepa wMelPop-CLA. Valores de P: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , e \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .



Além disto, nos genes relacionado com o estresse oxidativo, as células LL-5 expressaram altos níveis de iNOS nos tempos de 12 horas para a cepa wMel e 24 horas pós infecção por wMelPop-CLA (figura 19A) e baixos níveis de expressão do gene da Catalase 48 horas pós infecção por wMel e 72 horas após contato com wMelPop-CLA (figure 19B). Não houve alteração da expressão do gene SOD3A após contato com ambas as cepas de *W. pipientis* na maioria dos tempos analisados (figura 19C), exceto 6 horas após contato com a cepa wMel, quando este foi significativamente aumentado.

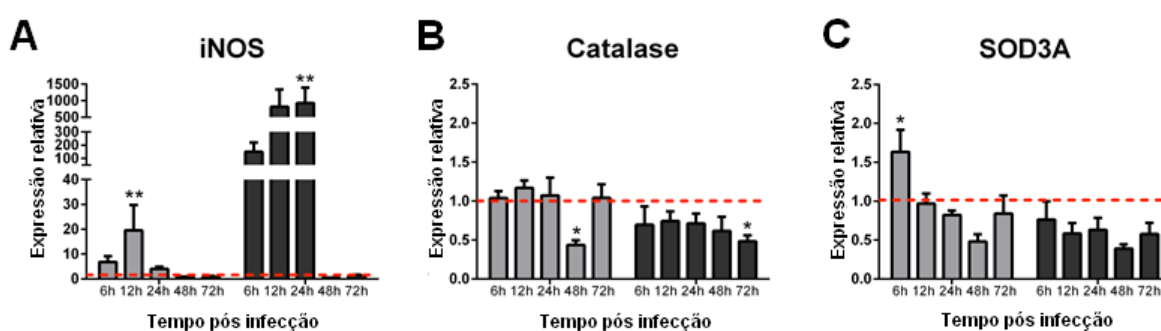


Figura 19: Estágios iniciais da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo das células LL-5 após infecção por *W. pipientis*. Expressão de genes nas células LL-5 infectadas com as cepas wMel (cinza) e wMelPop-CLA (preto): iNOS, Catalase e SOD3A (A, B e C). As barras representam fold change em relação as células controle, com a média e desvio padrão de três replicas biológicas coletadas nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h e 72h pós infecção, sendo em cinza após o contato com a cepa wMel e em preto com a cepa wMelPop-CLA. Valores de P: \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , e \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

#### 5.4 Análise da expressão de genes ligados ao sistema imune inato em células de flebotomíneos com infecção estável por *W. pipientis*

Após obtenção de uma infecção estável de wMelPop-CLA nas células de flebotomíneos, foi realizado o estudo da expressão gênica de alguns genes do sistema imune inato nas células Lulo e LL-5 em comparação com o controle. Devido a variação da densidade de *W. pipientis* nas células infectadas ao longo

das passagens (figura 19), para o estudo da expressão gênica as amostras foram selecionadas e agrupadas de acordo com a densidade de *W. pipientis* em cada passagem.

Para a célula Lulo, devido a sua maior densidade de *W. pipientis*, as amostras selecionadas para análise da expressão gênica apresentavam uma razão entre *wsp*-GAPDH em torno de 10, enquanto que para LL-5 esta razão foi em torno de 5 (figura 20).

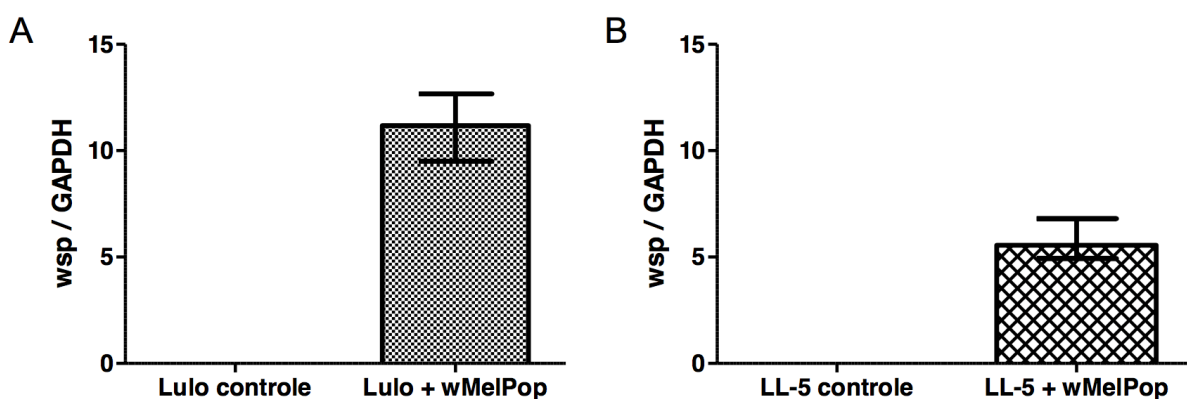


Figura 20: Gráfico da quantificação relativa de wMelPop-CLA nas células de flebotomíneos para estudo da expressão gênica do sistema imune. Dados representativos de dois experimentos, sendo que, em (A), observamos a densidade de *W. pipientis* presente nas células Lulo em comparação com o controle e, em (B), nas células LL-5. As barras representam a mediana de cada grupo com o intervalo interquartil das amostras.

Após a seleção das amostras, foi realizada a extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão de alguns genes do sistema imune nas células infectadas em comparação as células controle. Os genes estudados das vias de imunidade pertencem à via TOLL (Cactus e MyD88), IMD (Caspar, IMD), JAK-STAT (PIAS) TEP1 (complemento) e o gene Profenoxidase, importante no processo de melanização em insetos.

A partir da análise de expressão gênica realizada, foi observado que os genes que codificam as proteínas Cactus, Caspar e PIAS que regulam negativamente as principais vias de imunidade inata em artrópodes (vias Toll, IMD e JAK-STAT, respectivamente) estavam significativamente menos expressos nas

células Lulo infectadas por wMelPop-CLA em relação as células controle, sugerindo uma ativação destas vias nas células transfectadas com *W. pipientis* (figura 21A, 21B e 21C). Os genes que codificam a enzima Prophenoloxidase e a proteína da via de complemento TEP1 também mostraram uma redução significativa de sua expressão no grupo transfectado em relação ao grupo controle (figura 21D e 21E), sugerindo que a presença de *W. pipientis* nas células Lulo parece ativar as principais vias relacionadas ao sistema imune inato de *L. longipalpis*, como as vias Toll, IMD e JAK-STAT (figura 21). Já o gene Relish, um dos reguladores da via IMD, não teve sua expressão alterada nas células com *W. pipientis* em relação às células controle (figura 21F).

Como foi observada uma diferença na expressão de genes nas células Lulo, foi estudada a expressão de AMPs nas mesmas, mas não foi observada diferença significativa entre as células com *W. pipientis* em relação às controle para os peptídeos Attacina, Cecropina e Defensina 1 (Figura 21G, 21H e 21I).

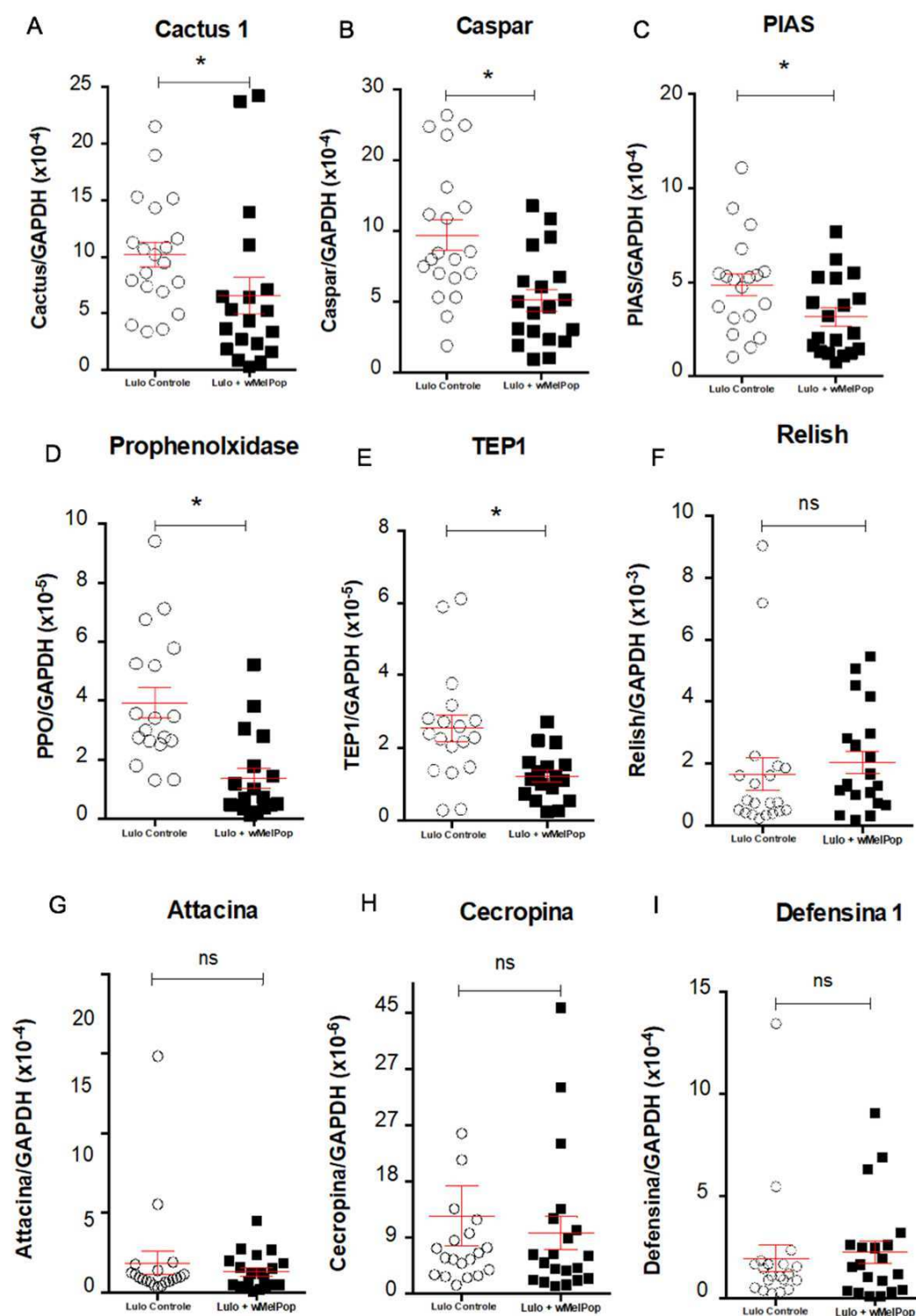


Figura 21: Resultados da comparação da expressão de genes de imunidade entre as células Lulo infectadas por wMelPop-CLA e não infectadas. Nas células Lulo infectadas por *W. pipiensis*, todos os genes selecionados apresentaram-se significativamente menos expressos em comparação com as células controle, com exceção de Relish e os peptídeos antimicrobianos Attacina, Cecropina e Defensina 1, os quais não apresentaram diferença significativa. O gráfico apresenta a mediana com intervalo interquartil e  $P \leq 0.05$ , sendo cada asterisco o nível de significância.

Já nas células LL-5, também foi feita a síntese de cDNA e análise da expressão dos genes do sistema imune apresentados anteriormente nas células Lulo, incluindo o gene Myd88 da via TOLL. Após processamento das amostras, foi observado que não houve diferença significativa em nenhum dos genes de imunidade entre as células infectadas por *W. pipientis* em relação ao controle (figura 22) e, desta forma, não observamos a expressão dos peptídeos antimicrobianos. Além disto, o gene Profenoloxidase não foi apresentado pois não foi detectado em nenhum dos grupos de células estudados.

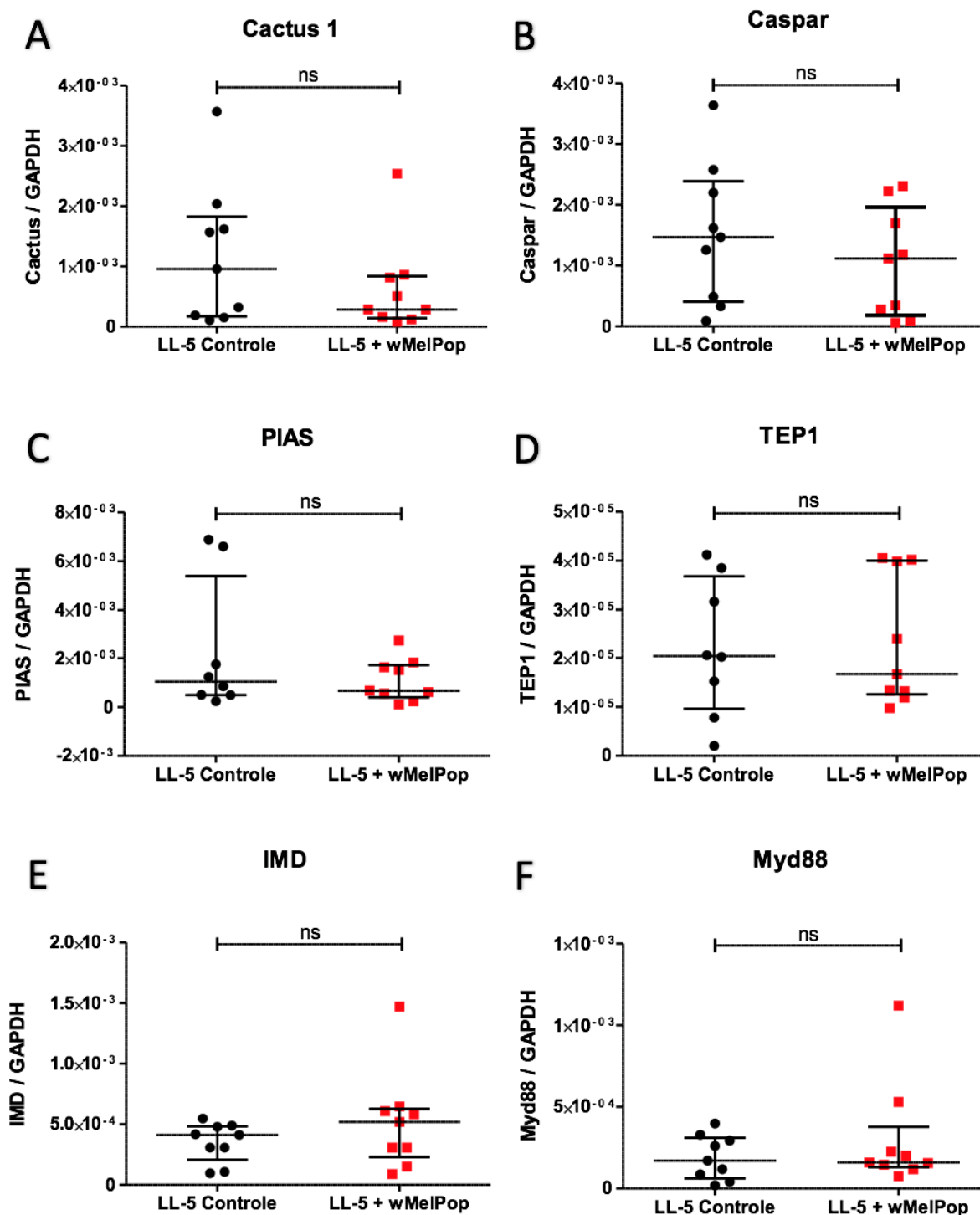


Figura 22: Resultados da comparação da expressão de genes de imunidade entre as células LL-5 infectadas por wMelPop-CLA e não infectadas. Nas células LL-5 infectadas por *W. pipiensis*, nenhum dos genes selecionados apresentaram diferença significativa em comparação com as células controle. O gráfico apresenta a mediana com intervalo interquartil e  $P \leq 0.05$ .

### **5.5 Efeito da presença de *W. pipientis* nas células Lulo na interação com *Leishmania infantum***

Para verificar se a presença da bactéria *W. pipientis* poderia afetar a interação entre as células de flebotomíneos e o parasito *Leishmania infantum*, experimentos foram realizados com as células Lulo contendo diferentes densidades da cepa wMelPop-CLA.

Durante este processo de otimização, foi observado que principalmente 48 horas pós-infecção nas altas taxas de infecção (10:1 e 5:1 parasitos por célula), grande parte das células de flebotomíneos se desgrudaram da lamínula de vidro e, durante o processo de fixação e coloração, resultava em perda de grande parte destas células, o que dificultou a análise dos resultados. Diante deste desafio, testamos outras concentrações de parasitos por célula, sendo 1:1 e 0,1:1 parasito por célula, e determinamos que a melhor concentração para realização dos experimentos foi de 1:1 parasito por célula. O processo de infecção por *Leishmania* em células de flebotomíneos com diferentes densidades de *W. pipientis* foi realizado em 4 experimentos independentes.

Os resultados mostraram que duas horas após contato com o parasito, as células com a densidade de *W. pipientis* alta (razão de 10 bactérias por célula) mostraram um leve decréscimo no número de parasitos aderidos às mesmas, em comparação com os outros dois grupos de estudo, mas não apresentaram diferença significativa entre eles ( $P > 0.05$ ). Neste mesmo tempo, os grupos de células com menor densidade de *W. pipientis* (razão de 5:1) e o controle (não infectado por wMelPop-CLA) tiveram o maior número de células infectadas com parasitos aderidos à membrana em comparação com os outros tempos da cinética, sendo este valor cerca de 12% das células, mas após análise estatística o grupo se apresentou similar aos demais ( $P > 0.05$ ). O grupo de células com maior densidade de *W. pipientis* (10:1) apresentou maior número de células com *Leishmania* no tempo de 24 horas pós contato com os parasitos. No tempo de 48 horas de co-incubação, os três grupos apresentaram um menor número de células com parasitos aderidos à parede celular em comparação com os outros tempos estudados, sendo este valor de cerca de 7% das células, mas sem diferença

estatística entre os outros tempos estudados ( $P>0.05$ ). O mesmo aconteceu no tempo de 72 horas em contato com *Leishmania*, onde não houve diferença estatística observada entre as células infectadas e não infectadas pela cepa wMelPop-CLA ( $P>0.05$ ) (figura 23).

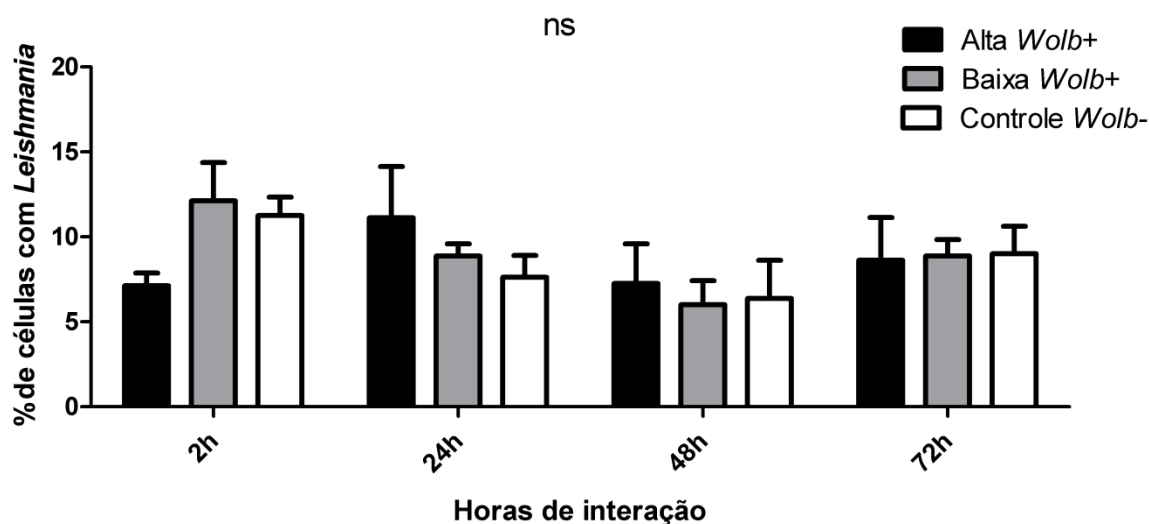


Figura 23: Interação entre *Leishmania* (*L.*) *infantum* e linhagens celulares Lulo infectadas e não infectadas por *W. pipientis*. Representação gráfica da porcentagem de células de flebotomíneos contendo *Leishmania* nos períodos de 2, 24, 48 e 72 horas de co-incubação. A infecção por *Leishmania* foi realizada em três diferentes grupos de estudo, sendo em preto o grupo de células Lulo com alta densidade de *W. pipientis* (razão de 10 bactérias por célula); em cinza, células Lulo com baixa densidade de *W. pipientis* (razão de 5 bactérias por célula); e em branco as células Lulo controles (não infectadas pela cepa wMelPop-CLA de *W. pipientis*). Não foi observada diferença estatística entre os grupos e tempos estudados,  $P>0.05$ .



## 5.6 Efeito na carga viral de vírus endógenos em células Lulo após infecção estável por *W. pipientis*

Após observarmos que a presença de *W. pipientis* não afetou a carga parasitária nos ensaios *in vitro*, decidimos verificar se a cepa *wMelPop-CLA* poderia afetar a carga de vírus endógenos presentes nas células Lulo. Para isto, alíquotas de diversas passagens de células, após obtenção da infecção estável, foram coletadas para quantificação dos vírus descritos por Ferreira et al, 2018, Lulo vírus 1 (LV1) e Lulo vírus 2 (LV2), pertencentes às famílias Luteoviridae e Permutotetraviridae respectivamente. Comparando com as células controle com aquelas contendo a bactéria, não foi observada diferença significativa na carga viral de LV2 mas, para o LV1, as células contendo *W. pipientis* apresentaram um decréscimo significativo na quantidade viral em relação às células controle (figura 24).

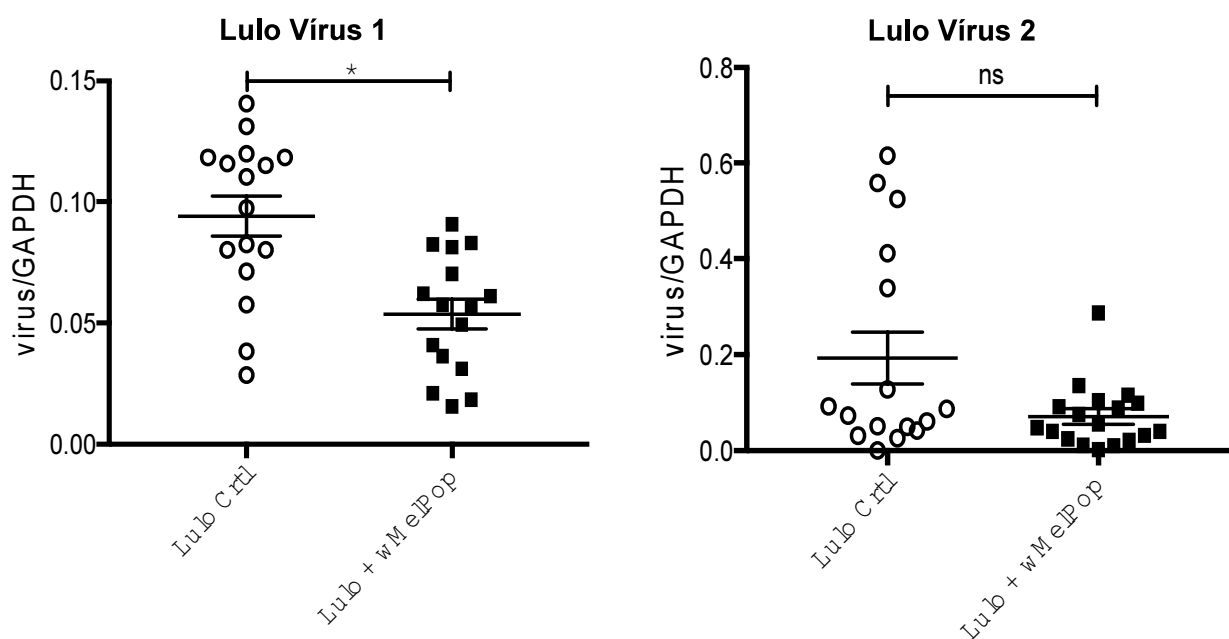


Figura 24: Efeito da bactéria *W. pipientis* na quantidade de vírus endógenos presentes nas células Lulo. Após obtenção da infecção estável por *W. pipientis*, verificamos a quantidade de vírus presente nestas em comparação com as células controle. A quantificação dos vírus LV1 e LV2 foram normalizados com o gene constitutivo GAPDH. \*P < 0,05.

## 6 Discussão

O processo de estabelecimento de *W. pipientis* em cultura de células é o primeiro passo para adaptação deste endossimbionte em novos hospedeiros invertebrados (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011a). Esta adaptação pode ocorrer devido a adequação da carga genética da bactéria às células do novo hospedeiro, facilitando assim seu estabelecimento e multiplicação (McMENIMAN et al, 2008). Nesta primeira fase de adaptação de *W. pipientis* em flebotomíneos, não há a necessidade da criação de insetos por várias gerações, uma vez que o processo de manutenção dos mesmos é bastante laborioso e poucas colônias são mantidas mundialmente com sucesso (VOLF & VOLFOVA, 2011; LAWYER et al, 2017).

Neste estudo demonstramos, pela primeira vez, o estabelecimento de infecção pela bactéria *W. pipientis* em linhagens celulares de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Após diversas tentativas, infelizmente não conseguimos transfectar as células de *Lutzomyia longipalpis* com a cepa wMel, mas, por outro lado, foi possível estabelecer uma infecção estável em ambas as células Lulo e LL-5 com a cepa wMelPop-CLA, o que foi comprovado por meio da técnica de fluorescência in situ e PCR em tempo real.

O processo de introdução e estabilização de *W. pipientis* nas células de flebotomíneos foi bastante difícil, fato que pode ser justificado pela distância filogenética entre o seu hospedeiro natural, a mosca *Drosophila melanogaster* da subordem Brachycera, sendo que a espécie *Lutzomyia longipalpis* pertencente à subordem Nematocera (RAFIKI et al, 2012). Entretanto, a introdução de *W. pipientis* oriunda de dípteros braquíceros em representantes da subordem Nematoceta já foi realizada no passado com sucesso, com a introdução da cepa wMel em *A. aegypti*. Outros fatores que podem ter dificultado a infecção destas células pela bactéria, como proposto em estudos anteriores, seriam o genoma da célula e os componentes citoplasmáticos do novo hospedeiro (DURVASULA et al, 1997).

Os primeiros testes para obtenção de infecção estável por ambas as cepas wMel e wMelPop-CLA nas células LL-5 e Lulo não foram bem sucedidos. Após diversas tentativas com a cepa wMel, até mesmo tentando diferentes metodologias,

não foi possível obter uma infecção estável com esta cepa. Acreditamos que, devido a baixa densidade desta cepa nas células de mosquitos, o processo de infecção na célula do novo hospedeiro flebotomíneo foi impossível de ser realizada. Juntamente com a baixa densidade, provavelmente houve uma perda de *W. pipientis* ao fim do processo de extração, o que pode ter dificultado a infecção.

Por outro lado, foi possível introduzir e manter a infecção pela cepa *wMelPop-CLA* em ambas as linhagens Lulo e LL-5 por várias passagens. De acordo com nossos resultados, tanto por PCR quantitativo e hibridização *in vitro*, na linhagem celular Lulo foi possível obter uma infecção estável com uma alta densidade de *W. pipientis* em comparação com a LL-5, sugerindo que as células Lulo são um melhor modelo experimental para estudos envolvendo esta bactéria.

Para entender melhor essa baixa infecção nas células LL-5, foi estudada a expressão gênica de genes envolvidos na resposta imune inata destas células nas primeiras horas após contato com ambas as cepas de *W. pipientis*. Foi observado que há um aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos juntamente com a ocorrência de estresse oxidativo, podendo acarretar uma baixa sobrevivência de *W. pipientis* nesta linhagem celular. Estudos anteriores mostraram que há um aumento da resposta imune nestas células após contato com diferentes bactérias e levedura (TINOCO-NUNES et al, 2016). Em conjunto com nossos resultados, acreditamos que a resposta do sistema imune das células LL-5 tem um impacto significativo na sobrevivência da bactéria *W. pipientis* nos estágios iniciais de infecção, o que pôde afetar a obtenção de uma infecção estável.

A expressão de genes do sistema imune é um importante mecanismo de defesa de insetos contra patógenos. Após obtenção da infecção estável por *wMelPop-CLA* em ambas as linhagens celulares, foram realizados experimentos para verificar a expressão gênica do sistema imune de ambas as células infectadas por *W. pipientis* em relação às células controle não infectadas. Para isto, foi utilizado o genoma anotado de *L. longipalpis* presente em banco de dados (<https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis>) para seleção de genes do sistema imune, já que existem poucos estudos envolvendo a ativação do sistema imune em flebotomíneos. Os genes selecionados foram Cactus, Caspar e PIAS, os quais regulam negativamente as vias TOLL, IMD e JAK-STAT em insetos, respectivamente (KIM et al, 2006; KINGSOLVER et al, 2013; KIU et al, 2012). Além

disto, foram estudados os genes que codificam as seguintes proteínas: Profenoxidase (PPO), envolvida na melanização de patógenos e TEP1, o qual codifica uma proteína similar à proteína C3b do sistema complemento de vertebrados, a qual atua na opsonização de patógenos (PROVELONES et al, 2009).

Após infecções estáveis por *wMelPop-CLA* nas células LL-5, observamos que a presença de *W. pipientis* não causou nenhum efeito nos níveis de expressão dos genes estudados em comparação com as células controle não infectadas. Nas células Lulo, a qual possui maior densidade de *W. pipientis*, a presença de *wMelPop-CLA* diminuiu a expressão de alguns genes das principais vias, como Cactus, Caspar, PIAS, PPO e TEP1. A diminuição da expressão de Caspar sugere que a presença da bactéria pode ter ativado a via IMD nesta linhagem celular, uma vez que Caspar bloqueia efetivamente a translocação nuclear do fator de transcrição Relish, inibindo assim a expressão de peptídeos antimicrobianos controlados pela via IMD (KIM et al, 2006). De maneira similar, ambos os genes Cactus e PIAS também foram negativamente regulados nas células com *wMelPop-CLA* em relação ao controle, sugerindo a ativação das vias TOLL e JAK-STAT devido a presença da bactéria. Através deste estudo, mostramos os primeiros indícios de que *W. pipientis* pode afetar as diferentes vias do sistema imune de flebotomíneos, mas são necessários estudos mais aprofundados utilizando outras técnicas, como por exemplo RNA de interferência, para confirmação da ativação ou supressão destas vias de imunidade.

Em mosquitos, após o silenciamento do gene Caspar, foi mostrado que a infecção por *Plasmodium* foi reduzida (GARVER et al, 2009). De maneira similar, estudos anteriores mostraram que a redução do gene Caspar contribui na redução da infecção por *Leishmania* no inseto adulto de *L. longipalpis* (TELLERIA et al, 2012). Frente às observações mencionadas, no presente estudo, a infecção por *W. pipientis* nas células Lulo reduziu significativamente a expressão do gene Caspar, mas, após experimentos com *Leishmania* nessas células, a quantidade de parasitos aderidos nas linhagens com e sem a bactéria não apresentaram diferença significativa.

Em relação aos peptídeos microbianos, foi observado que, em experimentos com o flebotomíneo adulto da espécie *Phlebotomus duboscqi*, há uma alta

expressão do peptídeo antimicrobiano Defensina na infecção pelo parasito *Leishmania* (BOULANGER et al, 2004). Em relação aos peptídeos antimicrobianos Defensina e Cecropina, foi observado que, em diferentes hospedeiros infectados por diferentes parasitos, estes apresentaram uma alta expressão para combate destes patógenos (AKUFFO et al, 1998; DURVASULA et al, 1997; HAO et al, 2001). Para as células de flebotomíneos estudada Lulo, não houve diferença significativa nos níveis de expressão de peptídeos antimicrobianos após obtenção de infecção estável por *W. pipientis*, em comparação com as células controle. Semelhantes resultados foram observados em moscas do gênero *Drosophila* e em mosquitos, e isto é um indício que a proteção promovida pela *W. pipientis* no hospedeiro contra patógenos não é unicamente baseada no aumento da expressão de genes do sistema imune das principais vias e nem dos peptídeos antimicrobianos (BOURTZIS et al, 2000; WONG et al, 2011; RANCÈS et al, 2013).

Foram realizados experimentos de interação das linhagens celulares estudadas com *L. infatum* para verificar se a infecção por wMelPop-CLA nas células Lulo poderia reduzir o número de parasitos aderidos nas mesmas em comparação com as células controle sem *W. pipientis*. Anteriormente, foi demonstrado que as células Lulo são um bom modelo para estudo da interação com *Leishmania*, incluindo estudos do ciclo de vida do parasito (BELLO et al, 2005; CORTES et al, 2011). Neste estudo, podemos confirmar a interação do parasito nas células Lulo, infectadas ou não pela cepa wMelPop-CLA, sendo que foram utilizados dois grupos de células com *W. pipientis*: um com alta densidade e outro com baixa densidade da bactéria por célula. No início da interação, as células com alta densidade de *W. pipientis* apresentaram um leve decréscimo no número de células com parasitos em comparação com o grupo de baixa densidade de *W. pipientis* e o grupo controle, apesar de não ser uma diferença significativa. Entretanto, 24, 48 e 72 horas após a interação, os três grupos apresentaram valores semelhantes de parasitos nas respectivas células. Diante disto, foi observado que a presença de *W. pipientis*, mesmo em altas densidades, não resultou em efeitos significativos para redução da adesão de *Leishmania infantum*, inicialmente em ensaios *in vitro*.

Estudos envolvendo *W. pipientis* tem mostrado que a presença da bactéria no hospedeiro invertebrado induz a capacidade destes de inibirem a replicação de

diversas arboviroses, como Dengue, Zika e Chikungunya (MOREIRA et al, 2009; DUTRA et al, 2016; TAN et al, 2017; ALIOTA et al, 2016) e isto tem levado ao desenvolvimento de estratégias de controle destas doenças ([www.worldmosquito.org](http://www.worldmosquito.org)). Resultados similares a estes têm sido observados em infecções pelo parasito *Plasmodium*, o qual necessita invadir as células do hospedeiro invertebrado para completar seu ciclo de vida (KAMBRIS et al, 2010, BIAN et al, 2013). Esta proteção e bloqueio da transmissão de patógenos se deve a diversos fatores, ainda não muito bem estabelecidos, como a competição entre a bactéria e o patógeno de invadir a célula do hospedeiro, competição por recursos para sobrevivência do patógeno e /ou pela ativação de genes do sistema imune do vetor (MOREIRA et al, 2009; DUTRA et al, 2016; JOUBERT et al, 2016).

Por outro lado, no hospedeiro flebotomíneo, para que ocorra a transmissão da *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado, é necessário a aderência das formas promastigotas à parede do intestino médio utilizando moléculas da membrana, como os Lipofosfoglicanos (LPG) e Glicosaminoglicanos (GAG) (CORTES et al, 2012; BATES et al, 2007; DOSTÁLOVÁ et al, 2012; ROGERS et al, 2002). No presente estudo, a presença de *W. pipientis* nas células de *L. longipalpis* não afetou o número de células com *L. infantum* aderidas e este resultado pode estar relacionado à falta de competição entre parasito/célula para invadir a célula do hospedeiro, já que o ciclo da *Leishmania* ocorre em meio extracelular. Além disto, estes resultados podem também estar relacionados à ausência de efeitos na expressão de peptídeos antimicrobianos pelas células dos flebotomíneos, os quais poderiam afetar a interação parasito/célula. Diante disto, há a necessidade de estudos envolvendo a bactéria *W. pipientis* e o flebotomíneo adulto, para melhor compreensão dos efeitos da mesma no inseto e na adesão de parasitos à parede do intestino e, também, se pode haver alguma redução da quantidade de parasitos capazes de migrar para a válvula do estomodeu, processo essencial para que ocorra a transmissão das leishmanioses.

Em relação aos vírus específicos de insetos, a presença de *W. pipientis* nas células Lulo foi capaz de reduzir significativamente a carga viral de LV1 em relação ao grupo controle. Entretanto, para o Permutotetravírus LV2, ambos os grupos apresentaram semelhanças na quantidade de vírus presente nas células Lulo. Diante disto, podemos sugerir que a presença de *W. pipientis* em ensaios *in vitro*

tem efeitos negativos na proliferação de determinado vírus, o que pode ser resultado da competição por recursos intracelulares, bem como de indução do sistema imune, como proposto em trabalhos anteriores (KAMBRIS et al., 2009; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011A; MOREIRA et al., 2009).

Diante desta observação, a bactéria pode ser utilizada em outras espécies de flebotomíneos para bloqueio de vírus de diferentes gêneros transmitidos pelos mesmos, como Phlebovirus, Vesiculovirus e Orbivirus (DEPAQUIT et al, 2010; ALKAN et al, 2013). Estes vírus são transmitidos principalmente na região Mediterrânea e podem se espalhar nas próximas décadas (MORICONI et al, 2017).

No mediterrâneo, os principais flebovírus conhecidos que são transmitidos por flebotomíneos são Naples vírus (SFNV), Sicilian vírus (SFSV) e Toscana vírus (TOSV) (ALKAN et al, MORICONI et al, 2017). O vírus Toscana (TOSV) é considerado como um patógeno emergente que pode causar infecções no sistema nervoso central em humanos e meningite. Os demais Phlebovirus causam “3 dias de febre”, sendo a incidência desconhecida, mas existem pelo menos 250 milhões de pessoas vivendo em área de risco. Poucos estudos demonstraram a presença destes vírus em animais, o que aponta uma necessidade de mais estudos relacionados à protozoários e vírus transmitidos por flebotomíneos nas mais diversas áreas do globo (MORICONI et al, 2017).

## 7 Conclusão

Neste estudo, foi possível a obtenção de uma infecção estável por *W. pipientis* nas linhagens celulares Lulo, sendo que estas células mais permissíveis à cepa wMelPop-CLA, já que não foi possível a infecção pela cepa wMel. A presença da bactéria induziu uma ativação das principais vias do sistema imune de flebotomíneos, sendo estas IMD, Toll e Jak-Stat, mas não parece afetar a adesão da cepa de *L. infantum* estudada. Entretanto, a presença de *W. pipientis* reduziu a carga viral de um dos vírus endógenos presente nestas células, o que pode indicar uma vantagem do uso da bactéria para proteção de vírus transmitidos por flebotomíneos.

Este estabelecimento e adaptação da cepa de *W. pipientis* wMelPop-CLA nas células de *L. longipalpis* pode contribuir para obtenção de linhagens transfectadas do inseto adulto para, posteriormente, observar o efeito na infecção por *Leishmania* in vivo. Para a infecção transiente do inseto vetor por *W. pipientis*, a extração da bactéria feita a partir das células Lulo e LL-5 poderá ser facilitada, já que a mesma pode ter se adaptado a este novo organismo. Através desta cepa adaptada, aliada à técnica de microinjeções em embriões, a multiplicação e disseminação no inseto vetor poderá ser gerada mais rapidamente, o que contribuirá para produção de colônias estáveis de insetos com *W. pipientis*.

Como perspectivas para continuação desta linha de pesquisa, experimentos de introdução de *W. pipientis* em fêmeas adultas de flebotomíneos serão de suma importância para uma melhor compreensão do efeito da *W. pipientis* frente à infecção por *Leishmania*. A produção de linhagens de insetos adultos transfectadas transientemente com *W. pipientis* podem ser obtidas através da microinjeção da bactéria na hemocele do flebotomíneo. Se, a partir deste estudo, nós conseguirmos uma interferência na replicação de espécies de *Leishmania* no intestino de flebotomíneos, o próximo passo seria a tentativa de gerar linhagens de *Lu. Longipalpis* estavelmente transfectadas por *W. pipientis* através da microinjeção de ovos desta espécie de flebotomíneo. Isso possibilitaria o uso da bactéria *W. pipientis* como ferramenta adicional para controle biológico das leishmanioses ou de vírus transmitidos por este vetor.



## 8 Referências bibliográficas

AKHOUNDI, M., KUHL, K., CANNET, A., VOTYPKA, J., DELAUNAY, P., SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n. 3:e0004349, 2016.

ALIOTA, M.T., WALKER, E.C., YEPES, A.U., VELEZ, I.D., CHRISTENSEN, M., OSORIO, J.E.. The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n. 4:e0004677, 2016.

ALKAN, C., BICHAUD, L., LAMBALLERIE, X., ALTEN, B., GOULD, E.A. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. **Antivir Res.** v. 30, p. 54-74, 2013.

ANDRADE-FILHO, J.D., SCHOLTE, R.G.C., AMARAL, A.L.G., SHIMABUKURO, P.H.F., CARVALHO, O.S., CALDEIRA, R.L. Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **J Med Entomol.** 2017 Sep 1;54(5):1430-1434.

AKUFFO, H., HULTMARK, D., ENGSTÖM, A., FROHLICH, D., KIMBRELL, D. *Drosophila* antibacterial protein, Cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipathic peptides. **Int J Molec Medic.** v. 1, n.1, p.77-159. 1998.

ARAKI, A.S., VIGODER, F.M., BAUZER, L.G., FERREIRA, G.E., SOUZA, N.A., ARAÚJO, I.B., et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLoS Negl Trop Dis.** v. 3, n. 1:e365, 2009.

BARATA, R.A., MICHALSKY, E.M., FUJIWARA, E.T., et al. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. **Cad Saúde Pub.** v. 27, n. 11, 2011.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Intern Journal for Parasitol.** v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BAUZER, L.G.S.R., SOUZA, N.A., MAINGON, R.D., PEIXOTO, A.A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A Mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102, p. 1–12, 2007.

BELLO, F.J. MEJÍA, A.J., CORENA, M.P.; et al. Experimental infection of *Leishmania* (*L.*) *chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100(6), p. 519-525, 2005.

BERN, C., JOSHI, A.B., JHA, S.N., DAS, M.L. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. **Am j Trop Med Hyg.** v. 63, p. 184-188, 2003.

BENLARBI, M.; READY, P. D. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. **Bull Entomol Res**, v. 93, p. 383–391, 2003.

BIAN, G.; JOSHI, D.; DONG, Y.; et al. *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. **Science**, v. 340, p. 748–751, 2013.

BOROVSKY, D. & SCHLEIN, Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 1, p. 235–242, 1987.

BOULANGER, N., LOWENBERGER, C., VOLF, P., URSIC, R., SIGUTOVA, L., SABATIER, L., et al. Characterization of a Defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. **Inf Immunity**. 2004;72(12):7140-746.

BOURTZIS, K., PETTIGREW, M.M., O'NEILL, S.L. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. **Insect Mol Biol**. v. 9, n. 6, p. 635-639, 2000.

BRAIG HR1, ZHOU W, DOBSON SL, O'NEILL SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **J Bacteriol**. 1998;180(9):2373-8.

BRAIG, H. R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; O'NEILL, S. L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**, v. 367, p. 453–455, 1994.

CARDO, L.J. *Leishmania*: risk to the blood suply. **Tranfusion**. v. 46, p1641-1645. 2006.

CASANOVA, C., NATAL, D., SANTOS, F.A.M. Survival, Population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Brazil. **J Med Entomol**. v. 46, p. 42-50, 2009.

CHUNG, C.D., LIAO, J., LIU, B., RAO, X., JAY, P., BERTA, P. SHUAI, K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science**. v. 278, n. 5344, p. 1803-1805, 1997.

CÔRTEZ, L. M.; SILVA, R. M.; PEREIRA, B. A.; et al. Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. **Parasites & Vectors**, v. 4 (1), p. 216, 2011.

CÔRTEZ, L.M.C., PEREIRA, M.C.S., SILVA, F.S., PEREIRA, B.A.S., JUNIOR, F.O.O., SOARES, R.O.A., ET AL. Participation of heparina binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites of *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) in vitro. **Parasites Vectors**. v. 5, n. 142, 2012.

CUNNINGHAM, D.D. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Dehli boil. **Scient Mem Med Offrs Army India**. v. 1:21, 1885.

DA ROCHA, N.O., LAMBERT, S.M., DIAS-LIMA, A.G., JULIÃO, F.S., SOUZA, B.M.P.S. Molecular detection of *Wolbachia pipientis* in natural populations of sandfly vectors of *Leishmania infantum* in endemic areas: first detection in *Lutzomyia longipalpis*. **Med Vet Entomol**. v. 32, n. 1, p. 111-114, 2017.

DARNELL, JE Jr. STATs and gene regulation. **Science**. v. 277, n. 5332, p. 1630-5. 1997.

DAVIES, C.R., SIMON, P.K., CROFT, S., SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ Clin Review**. v. 326, p. 377-382, 2003.

DE OLIVEIRA, C.D., GONCALVES, D.S., BATON, L.A., SHIMABUKURO, P.H.F., CARVALHO, F.D., MOREIRA, L.A. Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. **Bull Entomol Res**. v. 105 (3), p. 305-315, 2015.

DEPAQUIT, J., GRANDADAM, M., FOUQUE, F., ANDRY, P.E., PEYREFITTE, C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Eurosurvel**, v. 15, n. 10, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health Aspects and control. **Clin Dermatol**, v. 14 (5), p417-23, 1996.

DI-BLASI, T., LOBO, A.R., NASCIMENTO, L.M., CÓRDOVA-ROJAS, J.L., PESTANA, K., MARÍN-VILLA, M., et al. The flagellar protein FLAG1/SMP1 is a candidate for *Leishmania*-sand fly interaction. **Vector Borne Zoonotic Dis**. v. 15, n. 3, p. 202-9, 2015.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br Med J**. v. ii:79, 1903.

DOSTÁLOVÁ, A., VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DPDx - Center for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. 2015.

DURVASULA, R.V., GLUMBS, A., PANACKAL, A., KRUGLOV, O., AKSOY, S., et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.94, n. 7, p. 3274-3278, 1997.

DUTRA, H. L. C.; DOS SANTOS, L. M.; CARAGATA, E. P.; et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Pelos Negl Trop Dis.** v. 9 (4): e0003689, 2015.

DUTRA, H. L. C., ROCHA, M. N., DIAS, F. B. S., MANSUR, S. B., CARAGATA, E. P., MOREIRA, L. A. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Cell host Microbe.** v. 8, n. 19 (6), p. 771-774, 2016.

FAMPA, P, CORRÊA-DA-SILVA, M. S., LIMA, D. C., OLIVEIRA, S. M. P., MOTTA, M. C. M., SARAIVA, E. M. B. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. **Int J Parasitol.** v. 15, n. 33(10), p. 1019-26, 2003.

FERREIRA, F.V.; AGUIAR, E.R.G.R.; OLMO, R.P.; DE OLIVEIRA, K.P.V.; SILVA, E.G.; SANT'ANNA, M.R.V.; et al. The small non-coding RNA response to virus infection in the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis*. **PLoS Negl Trop Dis.** 12(6): e0006569, 2018.

FIUZA, J.A., SANTIAGO, H.C., SELVAPANDIYAN, A., GANNAVARAM, S. RICCI, N.D., BUENO, L.L. et al. Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. **Vaccine.** v. 31, p.1785-1792, 2013.

FRENTIU, F. D., TASNIM, Z., WALKER, T., et al. Limited Dengue Virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. **Plos Negl Trop Dis.** v. 8 (2): e2688, 2014.

FRÉZARD, F.J.G. A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. **Canal ciência.** Disponível em: <[http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295\\_A\\_caminho\\_da\\_cura\\_da\\_leishmaniose\\_viscerai\\_canina.html](http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerai_canina.html)>, 2015.

FRYDMAN, H. M. Isolation of live bacteria from adult insects. **Protocol Exchange,** 2006.

GAVGANI, A.S.M., HODJATI, M.H., MOHITE, H, DAVIES, C.R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet.** v. 360, p. 374-379, 2002.

GONTIJO, CARVALHO. Leishmaniose tegumentar Americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 36, n. 1, 2003.

GARVER, L.S., DONG, Y., DIMOPOULOS, G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse Anopheline species. **PLoS Path.** v. 5, n. 3:e1000335, 2009.

HAMILTON, J.G.C., NAIEM, D.A. Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. **Med and Veterin Entomol.** n. 14, p. 64-70, 2000.

HAO, Z., KASUMBA, I., LEHANE, M.J., GIBSON, W.C., KWON, J., AKSOY, S. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, n. 22, p. 12648-12653, 2001.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27 (9), p. 403–409, 2011.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p1191-1199.

HOFFMANN, A. A.; MONTGOMERY, B. L.; POPOVICI, J.; et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, p. 454–457, 2011.

ITURBE-ORMAETXE, I.; WALKER, T.; O' NEILL, S. L. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO reports**, v. 12 (6), p. 508–18, 2011a.

ITURBE-ORMAETXE, I.; WOOLFIT, M.; RANCES, E.; DUPLOUY, A.; O'NEILL, SL. A simple protocol to obtain highly pure *Wolbachia* endosymbiont DNA for genome sequencing. **J Microbiol Methods**. v. 84, p. 134-136, 2011b.

JANEWAY, C.A.Jr. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54:1-13. **J Immunol**. v. 191, n. 9, p. 4475–4487. 2013.

JEFFRIES, C.L., ROGERS, M.E., WALKER, T. Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly embryo microinjection: the first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis. **Wellc Open Res**. v. 3, n. 55, 2018.

JOUBERT, D. A.; WALKER, T., CARRINGTON L. B., et al. Establishment of a *Wolbachia* superinfection in *Aedes aegypti* mosquitoes as a potential approach for future resistance management. **Plos Pathog**, v. 12, n. 2:e1005434, 2016.

KAMBRIS, Z., COOK, P.E., PHUC, H.K., SINKINS, S.P. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science**. v. 326 (5949), p. 134-136, 2009.

KAMBRIS, Z., BLAGBOROUGH, A.M., PINTO, S.B., BLAGROVE, M.S.C., et al. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. **Plos Path**. v. 6 (10): e1001143, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp**. v. 65 (1), p. 37-42, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clin of Dermatol**. v. 17 (3), p. 279-289, 1999.

KIM, M., LEE, J.H., LEE, S.Y., KIM, E., CUHNG, J. Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. **PNAS**. v. 103, n. (44), p. 16358-16363, 2006.

KINGSOLVER, M.B., HUANG, Z., HARDY, R.W. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. **J Mol Biol.** v. 425, n. 24, p. 4921-4936, 2013.

KIU, H., NICHOLSON, S.E. Biology and significance of the Jak/Stat signalling pathways. **Growth Factors.** v. 30, n. 2, p. 88-106, 2012.

LACERDA, M.M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. **Mem Ins Oswaldo Cruz.** v. 89, p. 489-495, 1994.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* London: **Acad Press.** v. 1, p. 1–120, 1987.

LAMPO, M., TORGERSON, D., MÁRQUEZ, L.M., RINALDI, M., GARCÍA, C.Z., ARAB, A. Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Venezuela: first evidence from reproductively isolated sympatric populations. **Am J Trop Med Hyg.** v. 61, p. 1004–1009, 1999.

LANZARO, G.C., OSTROVSKA, K., HERRERO, M.V., PAWYER, P.G., WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **Am J Trop Med Hyg,** v. 48, p. 839–847, 1993.

LAWYER P, KILLICK-KENDRICK M, ROWLAND T, ROWTON E, VOLF P. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). **Parasite.** v.24, n.42, 2017.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br Med J.** v. 1:1252, 1903.

LEMAITRE, B., KROMER-METZGER, E., MICHAUT, L., NICOLAS, E., MEISTER, M., GEORGEL, P., REICHHART, L.M., HOFFMANN, J.A. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **Proc Natl Acad Sci.** n. 92, p.9465-9469. 1995.

LIU, D., UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell and Infect Microbiol.** v. 2, n. 83, 20112.

MANGABEIRA, O.F. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. **Rev Bras Malariol Doencas Trop.** v. 12, p. 3–26, 1969.

MAINGON, R.D.C., WARD, R.D., HAMILTON, J.G.C., BAUZER, L.G.S.R., PEIXOTO, A.A. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? **Trends in Parasitol.** v. 24, n. 1, p. 12-17, 2008.

MARHOUL, Z.; PUDNEY, M. A mosquito cell line (Mos55) from *Anopheles gambiae* larva. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 66 (1), p 183-4, 1972.

MARKLE, W. H. e MARKHOUL, K. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and treatment. **Amer Fam Physic**, v. 69 (6), p. 1455-1460, 2004.

MCCALL, L.I., ZHANG, W.W., MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Path.** v. 9 (1): e1003053, 2013.

MCMENIMAN, C. J.; LANE, A. M.; FONG, A. W. C.; et al. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. **App Environ Microbiol**, v. 74, n. 22, p. 6963-6969, 2008.

MCMENIMAN, C. J.; LANE, R. V; CASS, B. N.; et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, p. 141–144, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, Ministério da Saúde, 2003.

MODABBER, F. First generation leishmaniasis vaccines in clinical development: moving, but what next? **Curr Opin Anti Infect Investig Drugs**. v. 2, p. 35–39, 2000.

MOLYNEUX, D.H., MOORE, J., MAROLI, M. Sugars in sandflies. **Parasitology**. n. 33, suppl. 431-6, 1991.

MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, p. 1268–1278, 2009.

MOREIRA, L.A., SAIG, E., TURLEY, A.P., RIBEIRO, J.M.C., O'NEILL, S.L., MCGRAW, E.A. Human probing behaviour of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. **Plos Neg Trop Dis**. v.3 (12): e568, 2009a.

MORICONI, M., RUGNA, G., CALZOLARI, M., BELLINI, R., ALBIERI, A., ANGELINI, P. et al. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: human leishmaniasis and phlebovirus infections. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 11, n. 8:e0005660, 2017.

MOURA, T. R. DE; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G. C.; et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n.6: e712, 2010.

ONO, M.; BRAIG, H. R.; MUNSTERMANN, L. E.; FERRO, C.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera : Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 38 (2), p. 237–241, 2001.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd**. v. 48, p. 949-50, 1934.

PARVIZI, P.; FARDID, F.; SOLEIMANI, S. Detection of a New Strain of *Wolbachia pipientis* in *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus*, a potential vector of Visceral

Leishmaniasis in North West of Iran, by targeting the major surface protein gene. **J Arthropod-Borne Dis**, v. 7, p. 46–55, 2013.

PATEL, A. P., DEACON, A., GETTI, G. Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. **Parasitology**, v. 141 (04), p. 501-510, 2014.

PEREIRA, T.N., ROCHA, M.N., SUCUPIRA, P.H.F., CARVALHO, F.D., MOREIRA, L.A. *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Sci Rep**, v. 8, n. 1:6889, 2018.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; ET AL. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 15;321 (5891), p. 970-974, 2008.

PIGOTT, D. M., BHATT, S., GOLDING, N., et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**. n. 3: e02851, 2014.

PINTO-DA-SILVA, L.H., FAMPA, P., SOARES, D.C., OLIVEIRA, S.M., SOUTO-PADRON, T., SARAIVA, E.M. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. **Int J Parasitol**. v. 35, p. 757-64, 2005.

PORTAL DA SAÚDE. Situação epidemiológica - Dados Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). Disponível em: <http://portal.saude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-vis-ceral-lv>; 2015.

POVELONES, M., WATERHOUSE, R.M., KAFATOS, F.C., CHRISTOPHIDES, G.K. Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. **Science**. v. 324, n. 5924, p.258-261, 2009.

RAFIKI, A.M., PARK, C.H., KWAN, C.W., LEMKE. S., SCHMIDT-OTT, U. BMP-dependent serosa and amnion specification in the scuttle fly *Megaselia abdita*. **Develop**, v.139, p. 3373-3382, 2012.

RANCÈS, E., JOHNSTON, T.K., POPOVIC, J., ITURBE-ORMAETXE, I., ZAKIR, T., WARR, C.G., O'NEILL, S.L. The Toll and Imd pathways are not required for *Wolbachia*-mediated Dengue virus interference. **J Virol**. v. 87, n. 21, p. 11945-11949, 2013.

RASGON, J. L.; REN, X.; PETRIDIS, M. C. Can *Anopheles gambiae* be infected with *Wolbachia pipientis*? Insights from an in vitro system. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 7718–7722, 2006.

RASGON, J. L.; GAMSTON, C. E.; REN, X. Survival of *Wolbachia pipientis* in Cell-Free Medium. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 6934–6937, 2006b.

REY, G.J., FERRO, C., BELLO, F.J. Establishment and Characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its



susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 1, p. 103-110, 2000.

ROGERS, M.E., CHANCE, M.L., BATES, P.A.. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitol**. v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

ROGERS, M.E., ILG, T., NIKOLAEV, A.V., FERGUSON, M.A., BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**. v.430, n.6998, p.463-467. 2004.

ROSETTO, M., ENGSTROM, Y., BALDARI, C.T., TELFORD, J.L., D. HULTMARK, D. Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a *Drosophila* hemocyte cell line. **Biochem Biophys Res Commun**. n. 209, p.111-116. 1995.

SANT'ANNA, M. R. V; ALEXANDER, B.; BATES, P. A.; DILLON, R. J. Gene silencing in Phlebotomine sand flies: xanthine dehydrogenase knock down by dsRNA micro-injections. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 6, p. 652–660, 2009a.

SANT'ANNA, M. R.; DIAZ-ALBITER, H.; MUBARAKI, M.; DILLON, R. J.; BATES, P. A. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. **Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 62, 2009b.

SANT'ANNA, M. R. V; DARBY, A. C.; BRAZIL, R. P.; et al. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. **PloS one**, v. 7 (8): e42531, 2012.

SANT'ANNA, M.R., DIAZ-ALBITER, H., AGUIARA-MARTINS, K., AL SALEM, W.S., CAVALCANTE, R.R., et al. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. **Parasit & Vectors**. n. 7:329, 2014.

SCHLEIN, Y., WARBURG, A., SCHNUR, L.F., SHLOMAI, J. Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* dependent on differentially induced digestion. **Acta Trop**. n. 40, v. 1, p. 65-70, 1983.

SHAW, J. J. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. n. 89 (3), p. 471-478, 1994.

SHIMABUKURO, P.H.F., ANDRADE, A.J., GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **Zookeys**. n. 660, p. 67-100, 2017.

SIMON, P. Q-GENE: processing quantitative real-time RT-QPCR data. **Bioinformatics**, v. 19, p 1439-1440, 2003.

SOARES, R.P., ALTOÉ, E.C.F, ENNES-VIDAL, V., DA COSTA, S.M., RANGEL, E.F., DE SOUZA, N.A., DA SILVA, V.C., VOLF, P., D'AVILA-LEVY, C.M. In vitro inhibition of *Leishmania* attachment to sandfly midguts and LL-5 cells by Divalent

Metal Chelators, Anti-gp63 and Phosphoglycans. **Protist**, v. 168, n. 3, p. 326-334, 2017.

SOUZA, N.A, BRAZIL, R.P., ARAKI, A.S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 161-174, 2017.

STOUTHAMER, R., BREEUWER, J.A.J., HURST, D.D. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annu Rev of Microbiol.** v. 53, p 71-102, 1999.

STÖVEN S., N. SILVERMAN, N., JUNELL, A., HEDENGREN-OLCOTT, M., ERTÜRK, D., ENGSTRÖM, Y., MANIATIS, T., HULTMARK, D. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. **Proc Natl Acad Sci.** v. 100, p. 5991–5996. 2003.

TAN, C.H., WONG, P.J., LL, M.I., YANG, H., NG. L.C., O'NEILL, S.L. wMel limits Zika and Chikungunya virus infection in a Singapore *Wolbachia*-introgressed *Ae. aegypti* strain, wMel-Sg. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 11, n. 5:e0005496, 2017.

TAYEH, A., JALOUK, L., AL-KHIAMI, A.M. A cutaneous leishmaniasis control trial using pyrethroid-impregnated bednets in villages near Aleppo, Syria. **WHO.** (who/leish/97.41.), 1997.

TELLERIA, E.L., SANT'ANNA, M.R.V., ORTIGÃO-FARIAS, J.R., PITALUGA, A.N., DILLON, V.M., et al. Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. **J Biol Chemistry.** v. 287, n. 16, p. 12985-12993, 2012.

TELLERIA EL, SANT'ANNA MR, ALKURBI MO, PITALUGA AN, DILLON RJ, TRAUB-CSEKÖ YM. Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit Vectors.** 2013;6(12).

TESH, R. B.; MODI, G. B. Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses. **J Med Entomol**, v. 20, n. 2, p. 199–202, 1983.

TINOCO-NUNES, B.;;TELLERIA, E.L.;; SILVA-NEVES, M.; MARQUES, C.; et al. 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.** v. 9:222, 2016.

TURLEY, A.P., MOREIRA, L.A., O'NEILL, S.L., MCGRAW, E.A. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the Dengue Fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Plos Negl Trop Dis.** v. 3 (9): e516, 2009.

VALANNE, S., WANG, J.H., RÄMET, M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. **J Immunol.** n. 186, v. 2, p. 649-656. 2011.

VIVERO, R. J.; CADAVID-RESTREPO, G., HERRERA, C. X. M., SOTO, S. I. U. Molecular detection and identification of *Wolbachia* in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. **Parasit & Vectors**, n. 10:110, 2017.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol.* v.36, Suppl 1:S1-9, 2011.

VON ZUBEN, A.P., DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad Saúde Pública.** v. 32, n. 6 :e00087415, 2016.

VORONIN, D., TRAN-VAN, V., POTIER, P., MAVINGUI, P. Transinfection and growth discrepancy of *Drosophila* *Wolbachia* strain wMel in cell lines of the mosquito *Aedes albopictus*. **J Appl Microbiol.** v. 108 (6), p 2133-2141, 2009.

WALKER, T.; JOHNSON, P. H.; MOREIRA, L. A.; et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n.7361, p. 450–453, 2011.

WALKER, T.; MOREIRA, L. A. Can *Wolbachia* be used to control malaria? **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 212–217, 2011.

WARD, R.D., RIBEIRO, A.L., READY, P.D., MURTAGH, A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani* chagasi Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 269–280, 1983.

WERREN, J.H., BALDO, L., CLARK, M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Rev Microbiol.** v. 6, p. 741-751, 2008.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis.** 2014.

WONG, Z.S., HEDGES, L.M., BROWNLIE, J.C., JOHNSON, K.N. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. **PLoS One.** v. 9, n. 6:e25430, 2011

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem Amer Entomol Inst**, n. 54, 1994.

XU, Z-B. Present situation of visceral leishmaniasis in China. **Parasitol Today.** v. 5, p. 224-228, 1989.

ZEIDLER, M.P., BACH, E.A., PERRIMON, N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. **Oncogene.** n. 19, p. 2598-2606. 2000.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia* : Analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected. **PLoS One**, v. 7 (6): e38544, 2012.

**9 ANEXOS**

RESEARCH

Open Access

# *Wolbachia* introduction into *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) cell lines and its effects on immune-related gene expression and interaction with *Leishmania infantum*

Daniela da Silva Gonçalves<sup>1</sup>, Iñaki Iturbe-Ormaetxe<sup>2</sup>, Andrea Martins-da-Silva<sup>3</sup>, Erich Loza Telleria<sup>3</sup>,  
Marcele Neves Rocha<sup>1</sup>, Yara M. Traub-Csekö<sup>3</sup>, Scott L. O'Neill<sup>2</sup>, Maurício Roberto Viana Sant'Anna<sup>4</sup> and  
Luciano Andrade Moreira<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The leishmaniasis are important neglected diseases caused by *Leishmania* spp. which are transmitted by sand flies, *Lutzomyia longipalpis* being the main vector of visceral leishmaniasis in the Americas. The methodologies for leishmaniasis control are not efficient, causing 1.5 million reported cases annually worldwide, therefore showing the need for development of novel strategies and interventions to control transmission of the disease. The bacterium *Wolbachia pipiensis* is being used to control viruses transmitted by mosquitoes, such as dengue and Zika, and its introduction in disease vectors has been effective against parasites such as *Plasmodium*. Here we show the first successful establishment of *Wolbachia* into two different embryonic cell lines from *L. longipalpis*, LL-5 and Lulo, and analysed its effects on the sand fly innate immune system, followed by *in vitro* *Leishmania infantum* interaction.

**Results:** Our results show that LL-5 cells respond to *wMel* and *wMelPop-CLA* strains within the first 72 h post-infection, through the expression of antimicrobial peptides and inducible nitric oxide synthase resulting in a decrease of *Wolbachia* detection in the early stages of infection. In subsequent passages, the *wMel* strain was not able to infect any of the sand fly cell lines while the *wMelPop-CLA* strain was able to stably infect Lulo cells and LL-5 at lower levels. In *Wolbachia* stably infected cells, the expression of immune-related genes involved with downregulation of the IMD, Toll and Jak-Stat innate immune pathways was significantly decreased, in comparison with the uninfected control, suggesting immune activation upon *Wolbachia* transinfection. Furthermore, *Wolbachia* transinfection did not promote a negative effect on parasite load in those cells.

**Conclusions:** Initial strong immune responses of LL5 cells might explain the inefficiency of stable infections in these cells while we found that Lulo cells are more permissive to infection with *Wolbachia* causing an effect on the cell immune system, but not against *in vitro* *L. infantum* interaction. This establishes Lulo cells as a good system for the adaptation of *Wolbachia* in *L. longipalpis*.

**Keywords:** *Wolbachia*, *Lutzomyia longipalpis*, Lulo cell, LL-5 cell, *Leishmania infantum*

\* Correspondence: [luciano@minas.fiocruz.br](mailto:luciano@minas.fiocruz.br)

<sup>1</sup>Grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002, Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article





## 37 Background

38 Leishmaniasis is a spectrum of important epidemiological diseases, endemic in 98 countries with over 1.5 million cases reported annually worldwide. About one billion people live in areas of high transmission risk [1, 2]. Visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania donovani* in the Old World and *L. infantum* in parts of the Old World and New World [3], reaching up to 400,000 cases and around 40,000 deaths every year [2, 4, 5]. Currently, there is no vaccine for humans, so prevention and control of leishmaniasis are based on early diagnosis, effective drug administration [6] and protecting humans against the insect bite by using, for example, bednets, repellents and insecticide treatment [2, 7, 8].

51 Recently, the endosymbiont bacterium *Wolbachia* has been used as an alternative strategy to control vector-borne diseases, through the reduction or blocking of pathogen infections. This bacterium naturally infects around 40 to 70% of arthropods and some nematodes, being maternally transmitted through the eggs to subsequent generations [9–11]. The broad natural prevalence of *Wolbachia* in invertebrates has prompted studies on its potential to protect the host against pathogens. Previous studies have shown that the presence of *Wolbachia* can protect *Drosophila* against RNA viruses [12, 13] and its presence can induce the upregulation of immune genes, such as Relish and Dorsal, and also antimicrobial peptides (AMPs), i.e. attacin and dipterin [14]. Later, different strains of this bacterium were introduced into mosquitoes, upregulating immune related genes, such as TEPI, Myd88, SOCS36E, Cactus and the AMPs Defensin and Cepropin. This led to the reduction of infection by pathogens that cause different diseases such as dengue, chikungunya, malaria and Zika [15–22].

71 *Wolbachia* has been detected in sand flies of the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia*, but the impact of *Wolbachia* on the *Leishmania* infection load has not been reported. *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus perniciosus* are naturally infected with strains *wPap* and *wPrn*, respectively, whereas both *Lutzomyia shannoni* and *Lutzomyia whitmani* are infected with the strain *wWhi* [11, 23, 24]. *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *L. infantum* in the Americas [26], was not found to be naturally infected with *Wolbachia* in some studies [11, 23, 26]. However, more recently, *Wolbachia* was detected with a low infection rate in *L. longipalpis* in a small population in Brazil, which suggests either a rare event of horizontal transmission by the feeding habits of larvae, with the possible acquisition of *Wolbachia* from decomposing bodies of arthropods, or a localised infection, considering that *L. longipalpis* is a species complex [27].

88 In order to successfully transfect *Wolbachia* into a new host, previous studies have suggested culturing *Wolbachia* from the original host in cell lines belonging

to the target species, in order to facilitate the bacteria adaptation to this new organism [21, 28]. After numerous unsuccessful attempts, the *Wolbachia* strain *wMelPop-CLA* from *Drosophila melanogaster* was introduced into *Aedes aegypti* mosquito embryos through microinjections, following its adaptation to *Aedes* cell lines for several months. *Wolbachia* was able to be established and spread into numerous tissues of the adult mosquitoes, to be vertically transmitted to their offspring and to transfer some of its *Drosophila* phenotypes (reduction in longevity and cytoplasmic incompatibility) into the mosquito host [29, 30]. Furthermore, the same *Wolbachia* strain caused the upregulation of a range of immune-related genes, such as TEPs, prophenoloxidase and AMPs, whereas some genes from the Toll and IMD pathways were downregulated [31, 32].

Most of the studies involving *Wolbachia* are focused on transinfection into mosquitoes and the effects of the infection on the new host. Considering the importance of leishmaniasis on human health, it is crucial to investigate novel control strategies, mainly because sand fly control through insecticides may be hindered by insecticide resistance [33]. Other potential drawbacks for successful insect control include vector urbanisation [34] and difficulties finding immature stages in nature [35]. Here we tested the possibility of *Wolbachia* infection into *L. longipalpis* sand fly cell lines as a first step towards using this bacterium to control leishmaniasis.

In our experiments, we used two embryonic *L. longipalpis* cell lines: the LL-5 cell line, which consists of at least two cell types, epithelioid and fibroblastoid [36], and the Lulo cells, which are composed of epithelioid cells and previously described as a possible model for *Leishmania* metabolism and anti-parasitic drug evaluation [37]. Both cells have been reported to be susceptible to *Leishmania* and used as model for vector-parasite interaction, even though the parasite cycle in the insect is extracellular [36–42].

We performed *in vitro* infections of *Wolbachia* using Lulo and LL-5 cell lines, with the aim of obtaining a stable infection. We analysed the expression of immune-related genes upon cell infection. We placed these *Wolbachia* infected cells in contact with *L. infantum* as a first attempt to verify the response against the parasite, which could lead to the possible use of *Wolbachia* against *Leishmania* and a means to control transmission.

## Results

### *Wolbachia* establishment into *L. longipalpis* cell lines

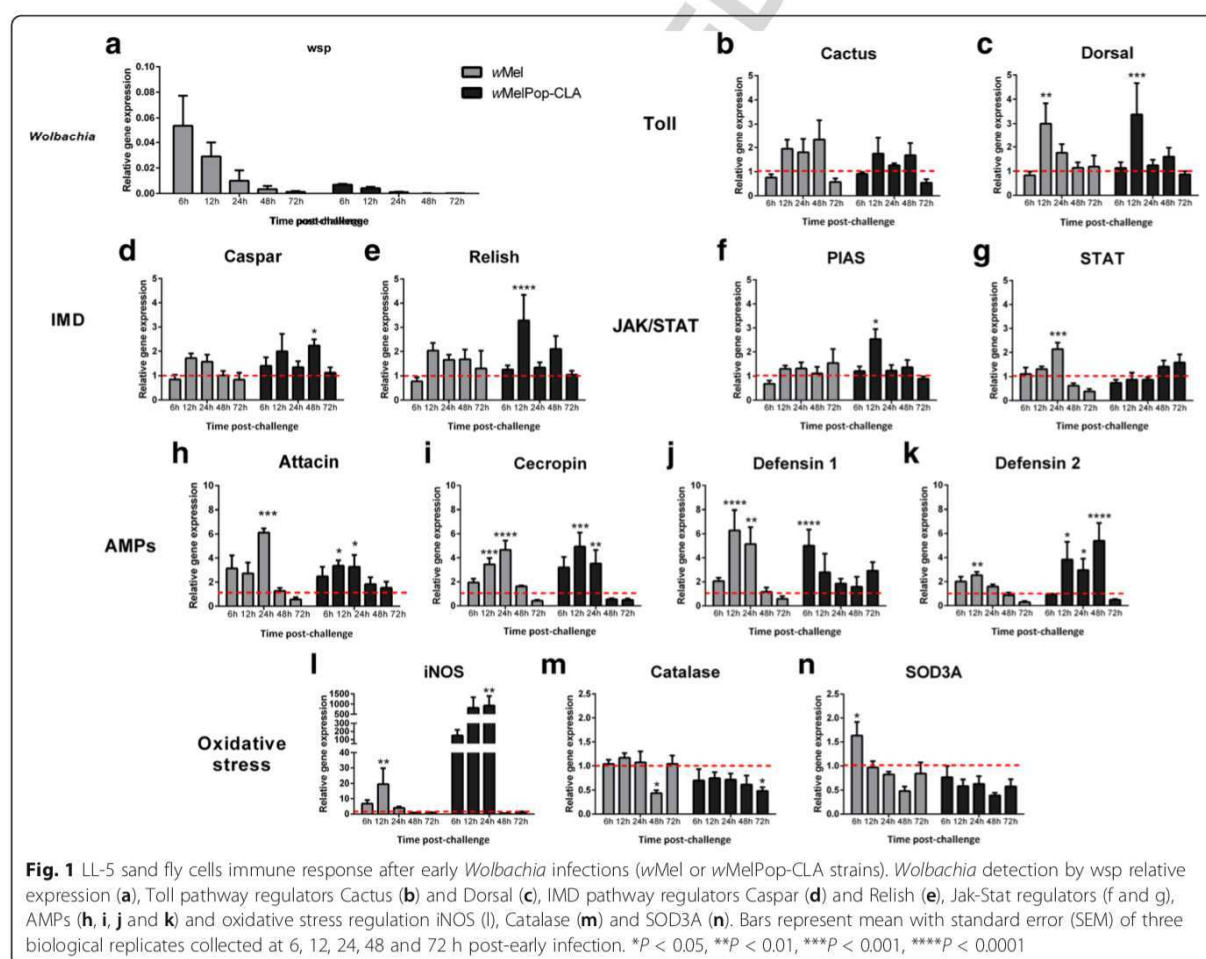
The response of *L. longipalpis* LL-5 cells against infection with *Wolbachia* strains *wMel* and *wMelPop-CLA* was analysed at early stages of interaction for the first 72 h post-infection with the bacteria. The detection of both

144 *Wolbachia* strains decreased gradually from early time-  
 F1 145 points until 72 h post-infection (Fig. 1a). The expression of  
 146 immune related genes was evaluated to understand these  
 147 cells response to early contact with these strains, from 6 to  
 148 72 h post-interaction. When compared to the non-infected  
 149 control group, LL-5 cells responded to *wMel* increasing the  
 150 expression of the transcription factors at 12 h  
 151 post-infection to Dorsal and at 24 h to STAT, while for  
 152 *wMelPop*, the cells also responded to Dorsal and Relish  
 153 both at 12 h post-infection (Fig. 1c, e, g). Cactus, which is  
 154 the repressor of the Toll pathway, did not present a significant  
 155 expression variation (Fig. 1b), while the expression of  
 156 Caspar and PIAS, repressors of the IMD and Jak-Stat path-  
 157 ways, increased at 48 and 12 h post-infection, respectively  
 158 (Fig. 1d, f), in response to *wMelPop*-CLA infection. For  
 159 *wMel*, the AMPs, which are effector molecules of innate  
 160 immune responses, Attacin at 12 h, Cecropin at 12 h  
 161 and 24 h, Defensin 1 at 12 h and 24 h and Defensin  
 162 2 at 6 h and 12 h, increased significantly your expres-  
 163 sion (Fig. 1h-k). Post-*wMelPop*-CLA infection, the

AMPs increased were Attacin at 12 h and 24 h, 164  
 Cecropin at 6 h, 12 h and 24 h, Defensin 1 at 6 h 165  
 and Defensin 2 at 12 h, 24 h and 48 h. In addition, LL-5 166  
 cells expressed high levels of iNOS at 12 h post-infection 167  
 with *wMel* and at 24 h to *wMelPop*-CLA (Fig. 1l), and low 168  
 levels of Catalase expression at 48 for *wMel* and 72 h for 169  
*wMelPop*-CLA post-challenges (Fig. 1m). SOD3A expres- 170  
 sion was not altered after the two *Wolbachia* strains chal- 171  
 lenges (Fig. 1n), except at 6 h when it was increased 172  
 post-*wMel* challenge (see Additional file 1: Table S1 for 173  
 detailed statistical results). 174

Later, in order to obtain stable infections of *Wolbachia* 175  
 in both *L. longipalpis* cells (Lulo and LL-5), experiments 176  
 were performed initially using only the *wMel* strain, due 177  
 to the lower fitness cost caused by this strain in compari- 178  
 son to the *wMelPop*-CLA [32]. In parallel, the mosquito 179  
 cell line RML-12 was infected with the same *Wolbachia* 180  
 strain as a control to validate the infection protocol. 181

Numerous attempts to establish the *wMel* strain in *L.* 182  
*longipalpis* cell lines were unsuccessful, mainly due to 183



f1.1  
 f1.2  
 f1.3  
 f1.4  
 f1.5



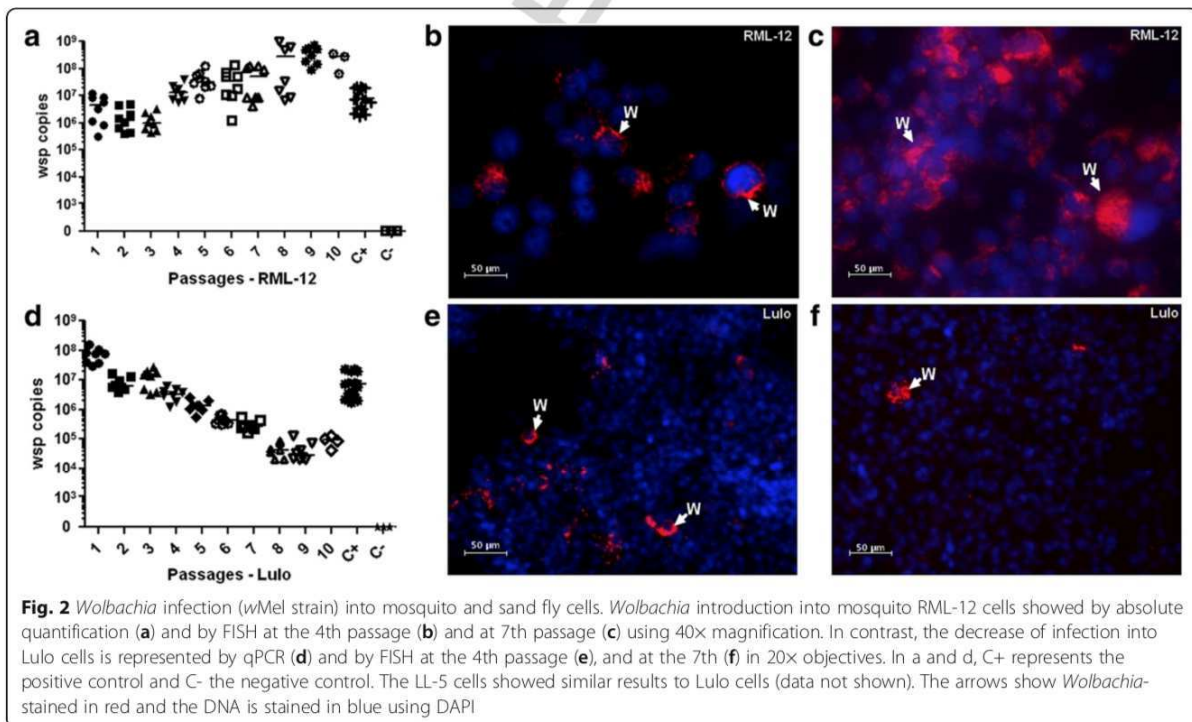
184 high cell mortality after *Wolbachia* infection and slow  
 185 cell growth. After approximately 62 independent at-  
 186 tempts in each cell line, we were able to maintain  
 187 both cells Lulo and LL-5 in culture after the infection  
 188 process, and the *Wolbachia* levels were monitored by  
 189 qPCR in every passage. In subsequent passages, the  
 190 *wMel* density gradually decreased, and was only de-  
 191 tectable by qPCR in both cell lines up to the 11th  
 192 passage after transinfection. Once the levels were  
 193 below detectable limits, the infected cell lines were  
 194 discarded. Complementing the qPCR results, analysis  
 195 using FISH to visualise *Wolbachia* confirmed the de-  
 F2 196 crease of *wMel* over time (Fig. 2d-f).  
 197 In contrast, RML-12 cells were able to establish and  
 198 maintain the *wMel* infection after a single round of  
 199 infection. We could detect *wMel* by qPCR and FISH  
 200 after the initial infection and could further detect the  
 201 increase of *Wolbachia* over subsequent cell passages  
 202 (Fig. 2a-c). These results confirmed the efficiency of  
 203 the *Wolbachia* extraction protocol and infection, sug-  
 204 gesting that the difficulty lies in the combination of  
 205 *wMel* and *L. longipalpis* cells rather than the infection  
 206 protocol or the quality of the *Wolbachia* isolation.  
 207 Furthermore, the *L. longipalpis* cell lines may be re-  
 208 sistant to *wMel* transinfection. Thereafter, we tried  
 209 transinfections using the *wMelPop-CLA* strain in both  
 210 *L. longipalpis* cell lines. It has been previously shown

211 that *wMelPop-CLA* has a higher density in cell lines  
 212 in comparison to *wMel* (unpublished data), which  
 213 could increase the chances of infection into sand fly  
 214 cells.

215 Around 15 attempts to infect each *L. longipalpis* cell  
 216 line with *wMelPop-CLA* were performed. In comparison  
 217 to LL-5 cells, Lulo cells were more susceptible to infec-  
 218 tion, and after maintaining *Wolbachia* in those cells for  
 219 over 35 passages, we considered *wMelPop-CLA* success-  
 220 fully established in these sand fly cells. To date, these  
 221 cells have been maintained for over 70 passages (*c.*1.5  
 222 years) with high levels of infection as monitored by rela-  
 223 tive qPCR and FISH (Fig. 3a, b). By using FISH, it was  
 224 possible to confirm that the proportion of Lulo-infected  
 225 cells was very high, around 80%. Although we could see  
 226 fluctuations of *Wolbachia* density by qPCR among the  
 227 passages, FISH analysis confirmed that the infection rate  
 228 remained similar.

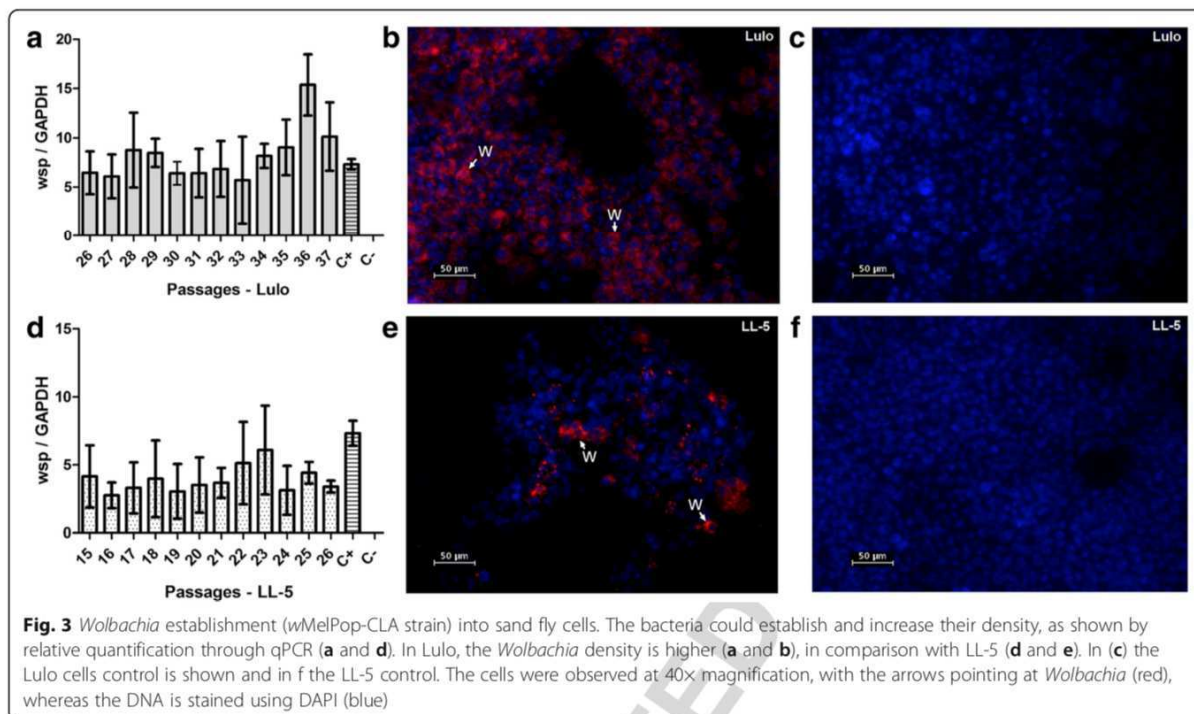
229 After establishment in Lulo, we performed *wMelPop-CLA*  
 230 infections into LL-5 cells. It was possible to obtain an in-  
 231 fection with this strain, as shown in Fig. 3d and e, but it was  
 232 more difficult to maintain the infection. In those cells, *Wol-*  
 233 *bachia* densities also showed large fluctuations and, in some  
 234 cases we lost the infection among the passages. However, the  
 235 average of *wMelPop-CLA* densities in LL-5 cells were con-  
 236 sistently lower in comparison with the same *Wolbachia*  
 237 strain infections in Lulo cells.

F3



f2.1 **Fig. 2** *Wolbachia* infection (*wMel* strain) into mosquito and sand fly cells. *Wolbachia* introduction into mosquito RML-12 cells showed by absolute  
 f2.2 quantification (a) and by FISH at the 4th passage (b) and at 7th passage (c) using 40x magnification. In contrast, the decrease of infection into  
 f2.3 Lulo cells is represented by qPCR (d) and by FISH at the 4th passage (e), and at the 7th (f) in 20x objectives. In a and d, C+ represents the  
 f2.4 positive control and C- the negative control. The LL-5 cells showed similar results to Lulo cells (data not shown). The arrows show *Wolbachia*-  
 f2.5 stained in red and the DNA is stained in blue using DAPI  
 f2.6





f3.1  
f3.2  
f3.3  
f3.4  
f3.5

238 After transinfection with *wMelPop*, we were able to  
239 maintain and revive Lulo cells that were frozen and  
240 cryogenically stored. After revival of samples which had  
241 been frozen for over 6 months, it was possible to  
242 re-establish the culture with similar *Wolbachia* densities  
243 as they had prior to the freezing process, suggesting that  
244 *wMelPop* infections in Lulo cell lines were successfully  
245 performed and can be stored for long term use. How-  
246 ever, after thawing aliquots stored in liquid nitrogen, it  
247 was difficult to maintain the *Wolbachia* density in simi-  
248 lar levels in LL-5 cells.

249 ***Wolbachia* effect in immune-related gene expression in  
250 stable infections of *L. longipalpis* cells**

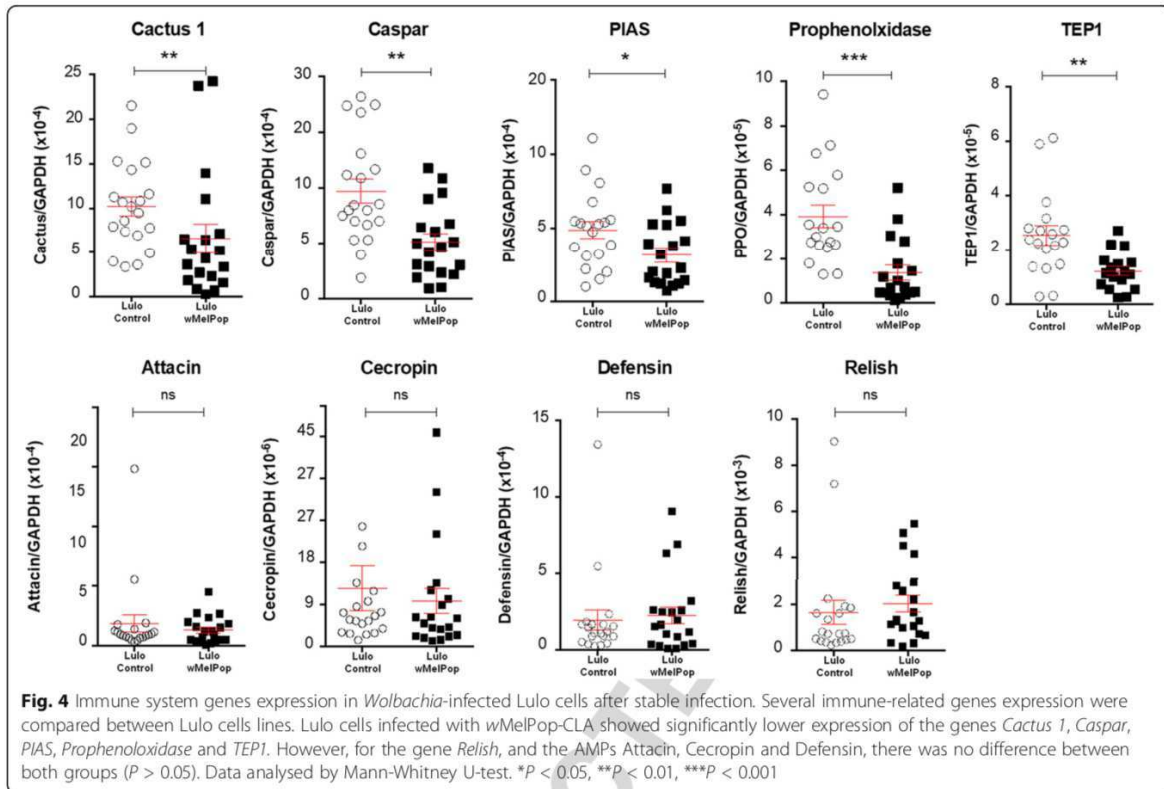
251 Once stable *Wolbachia* infections in sand fly cells had  
252 been obtained, we performed studies to determine  
253 whether the introduction of the bacterium could trigger  
254 cell immune responses. Once *wMelPop-CLA* was estab-  
255 lished in both LL-5 and Lulo cell lines, aliquots from  
256 each passage were collected for RNA extraction and  
257 gene expression analyses. We selected genes from the  
258 Toll, IMD and Jak-Stat pathways, and we also evaluated  
259 the expression of other immune-related genes including  
260 AMPs. For this experiment, all the biological replicates  
261 from each cell line had similar *Wolbachia* densities for  
262 better comparison among groups, with the average *Wol-*  
263 *bachia* density being higher in Lulo than in LL-5 cells  
264 (Fig 3a, d). The *wMelPop*-infected LL-5 line showed no

significant difference in any of the genes studied com- 265  
pared to their appropriate controls ( $P > 0.05$ ). 266

Surprisingly in Lulo cells, which had higher *Wolbachia* 267  
density than LL-5 cells, gene expression for *Cactus 1* 268  
(Mann-Whitney U-test;  $U = 94$ ,  $P = 0.0073$ ), *Caspar* 269  
(Mann-Whitney U-test;  $U = 78.5$ ,  $P = 0.0018$ ), *PIAS* 270  
(Mann-Whitney U-test;  $U = 109.5$ ,  $P = 0.0396$ ), *Prophe-* 271  
*noloxidase* (Mann-Whitney U-test;  $U = 46$ ,  $P = 0.0003$ ) 272  
and *TEP1* (Mann-Whitney U-test;  $U = 58$ ,  $P = 0.0018$ ) 273  
was significantly lower in comparison with the unin- 274  
fected Lulo counterparts (Fig. 4). For the genes studied 275 **F4**  
Myd88 (Mann-Whitney U-test;  $P = 0.8441$ ) and Relish 276  
(Mann-Whitney U-test;  $P = 0.1806$ ), including the AMPs 277  
Attacin (Mann-Whitney U-test;  $P = 0.8604$ ), Cecropin 278  
(Mann-Whitney U-test;  $P = 0.5428$ ) and Defensin (Man- 279  
n-Whitney U-test;  $P = 0.5979$ ), *wMelPop*-infected Lulo 280  
cells showed no significant differences compared to the 281  
control Lulo cells ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4). 282

283 ***Leishmania (L.) infantum* interaction in *Wolbachia*-  
284 infected *L. longipalpis* cells**

285 Experiments of *Leishmania* interactions into *Wolba-*  
286 *chia*-infected cells were performed with high density  
287 (10:1 *Wolbachia*:cell) and low density (5:1 *Wolbachia*-  
288 cell) *Wolbachia* infections, in comparison to uninfected  
289 Lulo cells (controls). We tested parasite load rates of  
290 10:1, 5:1, 1:1 and 0.1:1 parasites per cell. Forty-eight  
291 hours post-incubation with *Leishmania*, a large number



f4.1  
f4.2  
f4.3  
f4.4  
f4.5

292 of cells detached from the glass coverslip at the higher  
293 concentrations of parasites (10:1 and 5:1), making it dif-  
294 ficult to analyse the results. Due to the loss of cells after  
295 exposure to *Leishmania*, we determined that the best  
296 concentration for *Leishmania* interaction was the 1:1 ra-  
297 tio (parasite:cell). At two hours of interaction, the cells  
298 with high *Wolbachia* density (ratio 10:1) had fewer para-  
299 sites adhered to the cells in comparison with the other  
300 two groups, although with no significant difference  
301 (two-way ANOVA;  $F_{(6,27)} = 1.04$ ,  $P = 0.4232$ ). At the  
302 same time, the groups with low *Wolbachia* density (ratio  
303 5:1) and the control reached the highest percentage of  
304 cells with adhered parasite, in comparison with other  
305 time-points, but they were not statistically different  
306 (two-way ANOVA;  $F_{(2,9)} = 0.07$ ,  $P = 0.9335$ ). At 24, 48  
307 and 72 h post-incubation, all three groups showed a  
308 similar percentage of cells with attached *L. infantum*  
F5 309 (two-way ANOVA;  $F_{(3,27)} = 2.10$ ,  $P = 0.1233$ ) (Fig. 5).

### 310 Discussion

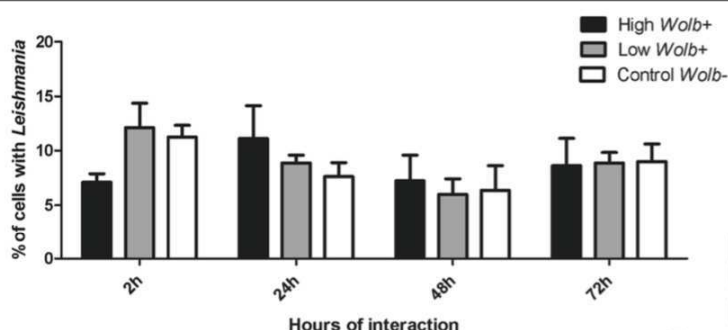
311 *Wolbachia* establishment in cell lines is the first step to-  
312 wards this endosymbiont establishment in novel hosts.  
313 This eliminates the need to rear insects through several  
314 generations, especially because sand fly rearing is a

laborious process and very few productive laboratory 315  
colonies are available worldwide. Here we show the 316  
first establishment of *Wolbachia* in phlebotomine cell 317  
lines. In this study, the introduction and establish- 318  
ment of the bacteria into sand fly cells was difficult, 319  
perhaps because the natural host, the brachyceran fly 320  
*Drosophila melanogaster*, is not closely related to the 321  
nematoceran *L. longipalpis* [43]. Furthermore, it was 322  
proposed in previous studies that not only the genetic 323  
background, but also the cytoplasmic components of 324  
the *Wolbachia*-free cell line are important factors for 325  
*Wolbachia* establishment [44]. 326

327 The first trials to infect LL-5 cells with wMel or wMel-  
328 Pop-CLA were not successful and our results indicate  
329 that early increased expression of AMPs and oxidative  
330 stress may be involved in reducing *Wolbachia* survival  
331 within these cells. Previous studies showed that LL-5  
332 cells presented increased immune responses after chal-  
333 lenges with heat-killed bacteria and yeast [40]. Together  
334 these results indicate that LL-5 cells immune response  
335 can have a significant impact on bacterial survival prior  
336 to reaching a stable infection.

337 Initial attempts to obtain a stable *Wolbachia* infection  
338 using the strain wMel in sand fly cells failed, probably





**Fig. 5** *Leishmania* (*L. infantum*) interaction with Lulo cell lines. *Leishmania* interaction with the sand fly cells at 2, 24, 48 and 72 h of co-incubation. The *Leishmania* interaction was performed in three different groups. In black, Lulo cells containing high *Wolbachia* density (ratio 10:1 *Wolbachia* per cell); in grey, Lulo with containing low *Wolbachia* density (ratio 5:1 *Wolbachia* per cell); in white, control Lulo cells (uninfected with *Wolbachia*). Data are expressed in percentile values (%) and represent the average and standard deviation of four independent experiments. Data analysed by Mann-Whitney U-test and no significant differences were observed between the groups ( $P > 0.05$ )

f5.1  
f5.2  
f5.3  
f5.4  
f5.5  
f5.6

339 due to the low density of this strain in mosquito cell  
340 lines. In contrast, we could introduce and maintain the  
341 strain *wMelPop* in Lulo and LL-5 cell lines, although the  
342 density was different in each line. The *Wolbachia* infec-  
343 tion was maintained at a lower density in LL-5 cells  
344 compared to Lulo cells, suggesting Lulo cells are a better  
345 model for *in vitro* studies involving *Wolbachia*.

346 Once established, experiments to determine the expres-  
347 sion of immune genes in the presence of *Wolbachia* were  
348 performed in both Lulo and LL-5 sand fly cells, which are  
349 important defence mechanism of insects against patho-  
350 gens. Due to a small number of studies involving the im-  
351 mune system activation in sand flies, genes from the in-  
352 nate immune system pathways were selected based on  
353 the annotated genome of *L. longipalpis* ([https://www.vec-](https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis)  
354 [torbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis](https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis)). The genes  
355 studied include Cactus and Caspar, which negatively con-  
356 trol the Toll and IMD pathways in insects [45, 46] and the  
357 gene PIAS which negatively controls the Jak-Stat pathway  
358 [47]. Additionally, we studied the prophenoloxidase genes,  
359 involved in pathogen melanisation, and TEPI, which  
360 codes for a complement-like protein similar to the verte-  
361 brate C3b involved in pathogen opsonisation [48].

362 For stable infections of LL-5 cells, we found that *Wol-*  
363 *bachia* had no effect on the expression levels of any of  
364 the genes tested in comparison with the uninfected cells,  
365 whereas for Lulo, which acquired higher *Wolbachia*  
366 density, the presence of the endosymbiont decreased the  
367 expression of some genes from the main immune system  
368 pathways, such as *Cactus*, *Caspar*, *PIAS*, *PPO* and *TEPI*.  
369 *Caspar* downregulation suggests that upon *Wolbachia*  
370 transinfection, this immune pathway may be activated in  
371 Lulo cells. After *wMelPop*-CLA introduction, both genes  
372 *Cactus* and *PIAS* were downregulated in infected cells in  
373 comparison to their respective controls, also suggesting  
374 Toll and Jak-Stat activation upon *Wolbachia* infection.  
375 These results were the first indication that *Wolbachia*

can affect the sand fly immune system pathways in dif- 376  
ferent cascades. 377

378 It was previously shown that a reduction of *Caspar*  
379 gene expression contributes to the protection of *L. longi-*  
380 *palpis* against *Leishmania* infections *in vivo* [49]. In  
381 mosquitoes, after knocking down the same gene, infec-  
382 tions with *Plasmodium* were decreased [50]. In the  
383 present study, *Wolbachia* in Lulo cells significantly re-  
384 duced the expression of *Caspar*; however, the *Leish-*  
385 *mania* load in cells with and without the bacteria  
386 remains similar in *in vitro* infection experiments.

387 *In vivo* studies have shown a high antiparasitic activity  
388 of the antimicrobial peptide Defensin against *Leishmania*  
389 in its natural host *Phlebotomus dubosqi* [51]. Similarly,  
390 Defensin and Cecropin, other antimicrobial peptides,  
391 have the same antiparasitic activity in different hosts in-  
392 fected with a range of parasites [52–54]. For both Lulo  
393 and LL-5, there was no difference between the levels of  
394 AMPs expressed from *Wolbachia* stably infected and  
395 control cells. This same result was previously observed  
396 in *Drosophila* and mosquitoes, suggesting that the pro-  
397 tection provided by *Wolbachia* is not only based on up-  
398 regulation of immune system genes from the main  
399 pathways and AMPs [55–57].

400 Experiments with *L. infantum* were performed to  
401 test whether the presence of *Wolbachia* in sand fly  
402 cells could confer some protection and decrease the  
403 number of adhered parasites. Previous studies have  
404 shown that Lulo cells are a good model to study  
405 *Leishmania* interaction and the parasite life-cycle [41,  
406 43]. As mentioned in previous studies, the nectomonad  
407 promastigotes act to establish infection in sand  
408 flies by attaching to the midgut wall and then by mi-  
409 grating to the anterior midgut [58, 59]. In 2003, Gos-  
410 sage et al. [60] showed that, in *in vitro* assays, it is  
411 possible to obtain the different forms of the parasite,  
412 such as procyclic, nectomonad, leptomonad and



413 metacyclic promastigotes. In the present study, we  
414 were able to confirm the parasite interaction in both  
415 cells with and without the presence of *Wolbachia*  
416 (*wMelPop-CLA*). The number of Lulo cells with  
417 *Leishmania* remains similar in all three groups in dif-  
418 ferent times post-co-interaction. Our results show  
419 that *Wolbachia* does not result in a detrimental effect  
420 against *L. infantum* adhesion in *in vitro* assays.

421 *Wolbachia* has been shown to inhibit the replication  
422 of dengue, Zika and chikungunya viruses in invertebrate  
423 hosts [17, 20, 61, 62] and this is the basis for biocontrol  
424 approaches to reduce the burden of these diseases  
Q3 425 ([www.worldmosquito.org](http://www.worldmosquito.org)). The same has been shown  
426 for the parasites *Plasmodium* spp., which need to get  
427 into the cells for multiplication and continuation of  
428 the life-cycle [19, 31]. It has been speculated that the  
429 blocking effect can be due to a number of mecha-  
430 nisms, such as competition between the bacteria and  
431 pathogen to invade the host cell and for cellular re-  
432 sources and/or the priming of host immune genes  
433 [17, 20, 63].

434 In contrast, in the sand fly host, the key for a success-  
435 ful transmission of the parasite to the vertebrate host  
436 consists in the adhesion of promastigotes to the midgut  
437 epithelium using membrane molecules, such as lipopho-  
438 sphoglycan (LPG) and glycosaminoglycan (GAG) [39,  
439 64–66]. In our results, the presence of *Wolbachia* in  
440 sand fly cells did not affect the number of *Leishmania*  
441 attached to Lulo cells. This was likely due to the lack of  
442 competition between *Wolbachia* and *Leishmania* to in-  
443 vade the host cells and for cellular resources, including  
444 the lack of upregulation of some immune system from  
445 the *L. longipalpis* cell lines.

446 The establishment and adaptation of *Wolbachia* into  
447 cell lines from *L. longipalpis* could potentially facilitate  
448 the generation of stably transinfected sand flies to be  
449 challenged with *Leishmania*. *In vivo* experiments involv-  
450 ing *Wolbachia* and *Leishmania* are important due to the  
451 complexity of this organism and the life-cycle of the  
452 parasite. To better understand the use of *Wolbachia*  
453 against *Leishmania* infection and its possible antipara-  
454 sitic effects, further experiments must be done with the  
455 sand fly invertebrate host to analyse the possibility of  
456 using *Wolbachia* as an additional tool to control  
457 leishmaniasis.

## 458 Conclusions

459 In this study, we were able to establish a stable infection  
460 of *Wolbachia* into *L. longipalpis* cells (Lulo cell line) and  
461 we showed that this model is more permissive to the  
462 *wMelPop-CLA* than the *wMel* *Wolbachia* strain. The  
463 presence of the bacterium appears to activate the main  
464 innate sand fly immune pathways but it does not appear  
465 to affect the parasite load of this specific strain of *L.*

*infantum* attached to the cells, in comparison with unin- 466  
467 fected Lulo cells.

## 468 Methods

### 469 Cell lines maintenance

470 Previously established embryonic cell lines from *L.* 470  
471 *longipalpis*, LL-5 [53] and Lulo [39] were cultured in 471  
472 25 cm<sup>2</sup> flasks containing L15 medium (Leibovitz 472  
473 1963) enriched with 10% tryptose phosphate broth 473  
474 and supplemented with 10% heat inactivated fetal bo- 474  
475 vine serum (FBS; Gibco, Scoresby, Australia), penicil- 475  
476 lin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells 476  
477 were incubated at 28 °C without CO<sub>2</sub>. Confluent cell 477  
478 monolayers from both cell lines were mechanically re- 478  
479 moved using scrapers and passaged at least once per 479  
480 week. In between the passages, the old medium was 480  
481 discarded and fresh medium was added every 3–4 481  
482 days to avoid the cells being kept for long periods in 482  
483 acidic medium. 483

484 The *wMel*- and *wMelPop-CLA*-infected RML-12, in- 484  
485 cluding the uninfected RML-12 cell lines from the mos- 485  
486 quito species *Aedes albopictus* [46, 68] were obtained 486  
487 from The World Mosquito Program at Monash Univer- 487  
488 sity (Melbourne, Australia). Both *Wolbachia* strains used 488  
489 to infect these lines were derived from *Drosophila mela-* 489  
490 *nogaster*, established in 2008 by McMeniman et al., and 490  
491 were cultured as previously described [31, 46]. 491

### 492 *Wolbachia* purification and introduction into *L. longipalpis* 492 493 cell lines

494 The process of infection of *L. longipalpis* cells with *Wol-* 494  
495 *bachia wMel* and *wMelPop-CLA* was carried out using a 495  
496 modified *Wolbachia* extraction protocol [69]. Briefly, 496  
497 RML-12 cells infected with *wMel* and *wMelPop-CLA* 497  
498 were first cultured in six 175 cm<sup>2</sup> flasks containing 20 498  
499 ml of medium. Cells were grown up to 90% confluence 499  
500 and 70 ml of medium containing cells ( $\approx 2.5 \times 10^8$  cells) 500  
501 was collected and transferred to Falcon tubes for centri- 501  
502 fugation at 1000× *g* for 10 min at 4 °C. Pelleted cells 502  
503 were then resuspended in 10 ml of SPG buffer (218 mM 503  
504 sucrose, 3.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.9 mM 504  
505 L-glutamate, pH 7.2) and sonicated twice for 10 s at 20– 505  
506 25 V on ice. Homogenates were centrifuged at 1000× *g* 506  
507 for 10 min at 4 °C. The supernatant was first filtered 507  
508 through a 2.7 µm Millex syringe filter and then through 508  
509 a 1.2 µm filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The fil- 509  
510 trate was centrifuged at 14,000× *g* for 15 min at 4 °C to 510  
511 obtain the *Wolbachia* pellet. The bacteria pellet was re- 511  
512 suspended in SPG buffer and laid on a monolayer of 512  
513 80% confluent, uninfected Lulo, LL-5, or RML-12 cells 513  
514 in a 24-well plate. The plate with cells and *Wolbachia* 514  
515 was sealed with parafilm and centrifuged for 60 min at 515  
516 1500× *g* to increase the contact between the bacteria 516  
517 and the cells and finally incubated at 26 °C. Three days 517



518 after infection, cells were transferred into a 25 cm<sup>2</sup> flask  
 519 containing 4 ml of fresh medium and passaged as de-  
 520 scribed above. Additionally, multiple infections were  
 521 tested following the same protocol of *Wolbachia* ex-  
 522 traction for both *L. longipalpis* cell lines to boost  
 523 *Wolbachia* infection rates. After the first infection in  
 524 a 24-well plate, the cells were transferred to 12-well  
 525 plate to grow until they were 90% confluent and then  
 526 they were transferred back to 24-well plates for  
 527 re-infection with *Wolbachia*. Three independent  
 528 rounds of infection were performed as an attempt to  
 529 get higher infection levels.

### 530 *Wolbachia* purification and immune gene expression in 531 early stage of infection into LL-5 cell lines

532 The same protocol of *Wolbachia* extraction was per-  
 533 formed for the study of early stage of infections in LL-5  
 534 cells with both strains. One day before the *Wolbachia*  
 535 extraction from RML-12 cells, 200 µl of LL-5 cells (≈ 2  
 536 ×10<sup>6</sup> cells) were seeded in a 24-well plate containing 800  
 537 µl of fresh medium. After performing the same protocol  
 538 described above, 100 µl of the extracted *Wolbachia*  
 539 (*wMel* and *wMelPop-CLA*) were added to each well and,  
 540 for control, the same volume of SPG buffer was added,  
 541 the plate sealed and centrifuged for 60 min at 1500× *g* to  
 542 increase the contact between the bacteria and the cells,  
 543 and finally incubated at 26 °C. After infection, the cells  
 544 were monitored for 6, 12, 24, 48 and 72 h. At each  
 545 time-point, the cells attached to the 24-well plate were  
 546 resuspended, centrifuged at 4000× *g* for 5 min, the pellet  
 547 resuspended in 50 µl of TRIzol reagent (Invitrogen,  
 548 Carlsbad, USA) and all samples were kept at -80 °C until  
 549 further experiments. Those samples were thawed at  
 550 room temperature and homogenized using a 2 mm glass  
 551 bead on a Mini-Beadbeater-96 (Biospec, Bartlesville,  
 552 USA) for 30 s. Total RNA was isolated following the  
 553 manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 1 µg of  
 554 RNA was first treated with *DNase I* (Invitrogen) and the  
 555 first strand cDNA synthesis was performed by Super-  
 556 script Reverse Transcriptase III (Invitrogen), both fol-  
 557 lowing the manufacturer's protocol. This assay was  
 558 performed in three independent experiments. *Wolbachia*  
 559 relative quantification was performed by qPCR using  
 560 *wsp* [70] gene expression relative to *L. longipalpis*  
 561 *GAPDH* reference gene (ID: LLOJ001891) with primers  
 562 listed in Table 1. Expression of immune related genes  
 563 was also performed by qPCR relative to *GAPDH* gene.  
 564 Primers used for immunity gene expression such as *Cac-*  
 565 *tus* and *Dorsal* (Toll pathway); *Caspar* and *Relish* (IMD  
 566 pathway); *PIAS* and *STAT* (Jak-Stat pathway); *Attacin*,  
 567 *Cecropin*, *Defensin 2* [71] and *Defensin 1* [71] (AMPs);  
 568 and reactive oxygen species mediated immunity genes  
 569 *Catalase* (ID: LLOJ007605), *Superoxide Dismutase*  
 570 (*SOD3A*) (ID: LLOJ008594) and inducible Nitric Oxide

**Table 1** Primers used in LL-5 cells early infections with *wMel*  
 and *wMelPop-CLA* strains

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference sequence ID	
LLiNOS-F	TGGCTGTCGCAATTTGTGTG	LLOJ005465	t1.4
LLiNOS-R	CCGCAATGTTACCTCAACC	(VectorBase)	t1.5
LLCatalase-F	CGACCGTGGTATCCCTGATG	LLOJ007605	t1.6
LLCatalase-R	AGAAGGCCTCCCTTTGTTG	(VectorBase)	t1.7
LLSOD3A-F	CCGATAGCGCTGTGAGACAC	LLOJ008594	t1.8
LLSOD3A-R	ATCGGAAATTGCGACCTTGC	(VectorBase)	t1.9
GAPDH-F	TTCGAGAAGACAGTGATGG	LLOJ001891	t1.10
GAPDH-R	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	(VectorBase)	t1.11
<i>wsp</i> -F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	AF020070.1	t1.12
<i>wsp</i> -R	AAAAATTAACGCTACTCCA	(GenBank)	t1.13

Synthase (iNOS) (ID: LLOJ005465) were obtained from  
 referred publications or listed in Table 1. The reactions  
 were performed on a 7500 Real Time PCR System (Ap-  
 plied Biosystems, Foster City, USA) using Power SYBR  
 Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according  
 to the manufacturer's standard protocol. Each sample, in  
 duplicate, was analysed through the 2-ΔΔCt method.  
 The relative gene expression was expressed as fold  
 change calculated relative to uninfected LL-5 control  
 group. Two-way ANOVA test was used to verify signifi-  
 cant differences of relative gene expression in relation to  
*Wolbachia* infection and time post-infection.

### *Wolbachia* detection and quantification through PCR amplification in stable infections

On every passage, 200 µl of cells and media were har-  
 vested from the flasks to confirm and estimate *Wolba-*  
*chia* infection rates. Briefly, the cells were centrifuged at  
 4000× *g* for 5 min, and the pellet resuspended in 50 µl  
 of extraction buffer containing 4 mM EDTA, 20 mM  
 Tris base, 0.4 mM NaCl and 0.25 µg/ml Proteinase K  
 (Bioline, Eveleigh, Australia). The cells were homoge-  
 nised using a 2 mm glass bead and Mini-Beadbeater-96  
 (Biospec) for 30 s, and the lysate then incubated at 56 °C  
 for 5 min, followed by a second incubation at 98 °C for  
 5 min for DNA extraction. Relative quantitative PCR  
 was performed using the primers *wsp*TM\_F (5'-CAT  
 TGG TGT TGG TGT TGG TG-3') and *wsp*TM\_R  
 (5'-ACA CCA GCT TTT ACT TGA CCA G-3') [72] for  
*Wolbachia* and *GAPDH\_F* (5'-TTC GCA GAA GAC  
 AGT GAT GG-3') and *GAPDH\_R* (5'-CCC TTC ATC  
 GGT CTG GAC TA-3') for *L. longipalpis*. The reactions  
 were performed on a LightCycler 480 SYBR Green I  
 Master (Roche, North Ryde, Australia) at 95 °C for 5  
 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30  
 s and 72 °C for 2 s, with an extra 72 °C for 5 min. Each



606 sample, in duplicate, was analysed through the 2- $\Delta\Delta$ Ct  
607 method by the LightCycler 480 software (Roche).

#### 608 *Wolbachia* visualisation by fluorescence *in situ* 609 hybridization (FISH)

610 Every 3rd or 4th passage after *Wolbachia* infection, 100  
611  $\mu$ l of the sand fly cells at 90% confluence was transferred  
612 to an 8-well chamber slide (Thermo Fisher, Riverstone,  
613 Australia) containing 400  $\mu$ l of media and incubated at  
614 26 °C for at least 3 h, to allow cell adhesion prior to the  
615 FISH assay. After incubation, cells were processed by  
616 FISH as previously described [46]. Briefly, cells were fixed  
617 for 10 min in freshly prepared 4% formaldehyde in 1 $\times$  PBS  
618 buffer with 0.5 % Triton X-100, washed 3 times in 1 $\times$  PBS  
619 for 5 min each and incubated in absolute ethanol for 5  
620 min. This was followed by the hybridization process con-  
621 ducted overnight at 37 °C with a hybridization buffer [50%  
622 formamide, 5 $\times$  saline-sodium citrate (SSC), 200 g/l dex-  
623 tran sulfate, 250 mg/l poly(A), 250 mg/l salmon sperm  
624 DNA, 250 mg/l tRNA, 0.1 M of DTT (1,4-dithiothreitol),  
625 0.5 $\times$  Denhardt's solution] containing 200 ng of each of  
626 the specific *Wolbachia* probes for 16S rRNA (W2: 5'-CTT  
627 CTG TGA GTA CCG TCA TTA TC-3' and W3: 5'-AAC  
628 CGA CCC TAT CCC TTC GAA TA-3'), labelled by  
629 Rhodamine at the 5' end [73]. After hybridization, samples  
630 were washed twice in 10 mM DTT in 1 $\times$  SSC and then  
631 twice in 10 mM DTT in 0.5 $\times$  SSC at 55 °C and for 15 min  
632 each, followed by a wash with 10 mM DTT in 0.5 $\times$  SSC,  
633 at room temperature. To observe DNA, cells were washed  
634 in 10 mM DTT in 0.5 $\times$  SSC supplemented with 10 mg/ml  
635 DAPI (4,6- diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)  
636 for 10 min at room temperature, rinsed three times in  
637 Mili-Q water, and mounted on a glass slide with Prolong  
638 Gold (Life Technologies, Scoresby, Australia). Samples  
639 were viewed under an epifluorescence microscope (AXIO  
640 Imager II, Zeiss, Le Pecq, France) equipped with AxioCam,  
641 using 20 $\times$  and 40 $\times$  objectives.

#### 642 Immune gene expression in stable infections in sand fly 643 cells

644 From passage 18th onwards (approximately 18 weeks after  
645 infection), in each passage 200  $\mu$ l of cells and media at  
646 90% confluence were harvested ( $\approx 4 \times 10^6$  cells), centri-  
647 fuge at 4000 $\times g$  for 5 min, the pellet resuspended in TRI-  
648 zol reagent (Invitrogen) and all samples kept at -80 °C  
649 until further experiments. Samples with similar *Wolbachia*  
650 density were selected for immune system gene expression  
651 experiments. Those samples were thawed at room  
652 temperature and homogenized using a 2 mm glass bead  
653 on a Mini-Beadbeater-96 (Biospec) for 30 s. Total RNA  
654 was isolated following the manufacturer's instructions. For  
655 cDNA synthesis, 2  $\mu$ g of RNA was first treated with  
656 DNase I (Invitrogen) and the first strand cDNA synthesis  
657 was performed by the Superscript Reverse Transcriptase

III (Invitrogen), both following the manufacturer's proto- 658  
col. For immune system expression, primers for genes 659  
from different immune pathways were designed using the 660  
Primer-BLAST tool (NCBI, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) 661  
[tools/primer-blast/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). The sequences were based on the *L.* 662  
*longipalpis* annotated genome available at VectorBase. 663  
Gene IDs used for primer design are as follows: Cactus1 664  
(ID: LLOJ004612), Caspar (ID: LLOJ002950), PIAS (ID: 665  
LLOJ002593-RA), Prophenoloxidase (ID: LLOJ001742) 666  
and TEPI (ID: LLOJ007923). Furthermore, primers de- 667  
signed for the genes *Relish*, the antimicrobial peptide 668  
genes (AMPs) Attacin, Cecropin and Defensin previously 669  
described [42] were also included in this study. The same 670  
conditions for quantitative PCR were applied, as previ- 671  
ously described in this study for *Wolbachia* density, and 672  
each sample was performed in duplicate. Expression ana- 673  
lysis was performed through the relative quantification 674  
using qGENE and normalized to GAPDH. Statistical sig- 675  
nificance between all data sets was determined using the 676  
Mann-Whitney U-test (Graph Pad Prism, version 5.03). 677

#### 678 *Leishmania* interaction with Lulo cells

679 To test the effect of *Wolbachia* on *Leishmania* adhesion, we  
680 used Lulo cells with and without *Wolbachia*, and promasti-  
681 gotes of *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). We tested  
682 two different densities of *Wolbachia*-infected cells to investi-  
683 gate whether the amount of bacteria in those cells could  
684 interfere with the parasite adhesion and interaction with the  
685 sand fly cell lines. The parasites were grown in Schneider's  
686 media (Gibco) supplemented with 10% v/v heat-inactivated  
687 FBS (Gibco), 1% v/v GlutaMAX (Gibco), 1% v/v BME Vita-  
688 mins solution 100 $\times$  (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia),  
689 2% sterile male urine and penicillin (100 U/ml) and strepto-  
690 mycin (100  $\mu$ g/ml) (Gibco), maintained at 28 °C without  
691 CO<sub>2</sub>. The assay was performed as previously described with  
692 some modifications [43, 44]. Briefly, Lulo cells infected and  
693 uninfected with *Wolbachia* were seeded on glass coverslips  
694 in a 24-well plate, to a final number of  $2 \times 10^6$  cells per well,  
695 one day before the interaction with parasites. For the cell/  
696 promastigote interaction assay, different concentrations of *L.*  
697 *infantum* and cells were tested (10:1, 5:1, 1:1 and 0.1:1) for  
698 standardisation and a ratio of about 1:1 parasite/cell was  
699 used. After 2 h of co-incubation and interaction, the  
700 non-adhered promastigotes were washed off with phosphate  
701 buffered saline (PBS) pH 7.2 and the cells were monitored  
702 for 2, 24, 48 and 72 h. At each time-point, the cells attached  
703 to the coverslip were fixed with methanol and stained with  
704 Quick Dip Field Staining (Thermo Fisher, Riverstone,  
705 Australia) and mounted with Canada Balsam (Sigma-Al-  
706 drich) in slides for further analysis. Three independent exper-  
707 iments were performed.

708 After conducting all the time-point collections, the  
709 number of promastigotes attached per cell in both *Wol-*  
710 *bachia*-infected and uninfected lines was determined by



711 counting 200 cells per coverslip under a light micro-  
 712 scope (AXIO Imager II, Zeiss) equipped with Axiocam,  
 713 using 100× objectives. This assay was performed in four  
 714 independent experiments and the results were expressed  
 715 as the percentage of cells with the parasite at different  
 716 times post-exposure to the parasite. The statistical ana-  
 717 lysis was performed using two-way ANOVA test to ver-  
 718 ify significant differences of the *L. infantum* adhesion in  
 719 relation to *Wolbachia* infection and time post-infection,  
 720 and also Bonferroni *post-hoc* tests, both using GraphPR-  
 721 ISM software (version 5.03).

## 722 Additional file

723  
 724 **Additional file 1: Table S1.** Statistical analysis of LL-5 sand fly cells  
 725 immune response after early *Wolbachia* infections (wMel or wMelPop-CLA  
 726 strains). (DOCX 20 kb)  
 727  
 728

## 729 Abbreviations

730 AMPs: Antimicrobial peptides; cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid;  
 731 CHIKV: Chikungunya virus; DENV: Dengue virus; DNA: Deoxyribonucleic acid;  
 732 FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; GAG: Glycosaminoglycan;  
 733 LPG: Lipophosphoglycan; PBS: Phosphate-buffered saline; qPCR: Quantitative  
 734 polymerase chain reaction; RNA: Ribonucleic acid; rRNA: Ribosomal  
 735 ribonucleic acid; VL: Visceral leishmaniasis

## 736 Acknowledgements

737 We wish to thank Adalberto Santos Dias for providing the parasites for the  
 738 experiments and Saijo Thomas for all helpful science discussions. We also  
 739 thank Heather Flores and David Claude Hack for critical reading. Finally, we  
 740 want to thank Dr Scott O'Neill who provided all the infrastructure in his  
 741 laboratory for this study.

## 742 Funding

743 DSG, MRVS and LAM were funded by CNPq and CAPES grants. Also, the  
 744 Brazilian Ministry of Health and a grant to Monash University from the Bill  
 745 and Melinda Gates Foundation. YMTC was funded by the Instituto Oswaldo  
 746 Cruz, Fiocruz, Brazil.

## 747 Availability of data and materials

748 All data generated or analysed during this study are included in this  
 749 published article.

## 750 Authors' contributions

751 DSG participated in the design of the study, carried out most experiments  
 752 and drafted the manuscript. LAM, MRVS and YMTC participated in the study  
 753 design and reviewing the manuscript. MNR helped with the *Leishmania*  
 754 interaction experiments. LAM and MRVS coordinated the work, critically  
 755 reviewed the manuscript and contributed to achieving the results. IIO, AMS  
 756 and ELT participated in the experiment design and execution, and SLO  
 757 provided critical comments to the protocol and experiments. All authors  
 758 read and approved the final manuscript.

## 759 Ethics approval and consent to participate

760 Not applicable.

## 761 Consent for publication

762 Not applicable.

## 763 Competing interests

764 The authors declare that they have no competing interests.

## 765 Publisher's Note

766 Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in  
 767 published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, 768  
 Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de 769  
 Lima 1715, 30190-002. Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>2</sup>World 771  
 Mosquito Program, Institute of Vector-Borne Disease, Monash University, 12 772  
 Innovation Walk, Clayton, VIC 3800, Australia. <sup>3</sup>Laboratório de Biologia 773  
 Molecular de Parasitos e Vetores, Instituto Oswaldo Cruz - Fundação 774  
 Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil. 775  
<sup>4</sup>Laboratório de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, 776  
 Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901. 777  
 Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil. 778

Received: 10 May 2018 Accepted: 21 November 2018

779  
 780

## References

- Alvar J, Vélez ID, Bern D, Herrero M, Desjeux P, Can J, et al. Leishmaniasis 781 **Q5**  
 worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7:e35671. 782
- WHO. Leishmaniasis. 2016. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Accessed 783  
 25 Sept 2017. 784 **Q6**
- McCall LJ, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development 785  
 of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Path*. 2013;9:e1003053. 787
- Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 788  
 1996;14:417–23. 789
- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, et al. Global distribution maps of the 790  
 leishmaniasis. *eLife*. 2014;3:e02851. 791
- Gavgni ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide- 792  
 impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in 793  
 Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*. 2002;360:374–9. 794
- Bern C, Joshi AB, Jha SN, Das ML, Hightower A, Thakur GD, Bista MB. Factors 795  
 associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly 796  
 protective. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;63:184–8. 797
- DPDx - Center for Disease Control and Prevention Leishmaniasis. 2017. 798  
<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Accessed 30 Sept 2017. 799 **Q7**
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. 800  
 How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of 801  
 current data. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;281:215–20. 802
- Zug R, Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent 803  
 data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS* 804  
*One*. 2012;7:e38544. 805
- De Oliveira CD, Gonçalves DS, Baton LA, Shimabukuro PHF, Carvalho FD, 806  
 Moreira LA. Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential 807  
 human disease vectors. *Bull Entomol Res*. 2015;105:305–15. 808
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* 809  
 induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS* 810  
*Biol*. 2008;23(6):e2. 811
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. *Wolbachia* and virus 812  
 protection in insects. *Science*. 2002;322:702. 813
- Xi Z, Gavotte L, Xie Y, Dobson SL. Genome-wide analysis of the interaction 814  
 between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. 815  
*BMC Genom*. 2008;9:1. 816
- Pan X, Pike A, Joshi D, Bian G, McFadden MJ, et al. The bacterium *Wolbachia* 817  
 exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the 818  
 dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *ISME J*. 2018;12:277–88. 819
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* 820  
 induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*. 2010;6:  
 e1000833. 821  
 822
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A 823  
*Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, 824  
 chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009;139:1268–78. 825
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, 826  
 Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations 827  
 to suppress Dengue transmission. *Nature*. 2011;476:454–7. 828
- Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, et al. *Wolbachia* invades 829  
*Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* 830  
 infection. *Science*. 2013;340:748–51. 831
- Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. 832  
*Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes* 833  
*aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016;19:771–4. 834
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. *Wolbachia* and the biological control 835  
 of mosquito-borne disease. *EMBO Rep*. 2011;12:508–18. 836

- 837 22. Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MSC, Godfray HC, Sinden  
838 RE, Sinkins SP. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits  
839 *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog. 2010;6:  
840 e1001143.
- 841 23. Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C, O'Neill SL. *Wolbachia* infections  
842 of phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae). J Med Entomol. 2001;38:  
843 237–41.
- 844 24. Parvizi P, Fardid F, Soleimani S. Detection of a new strain of *Wolbachia*  
845 *pipientis* in *Phlebotomus perfliewi transcaucasicus*, a potential vector of  
846 visceral leishmaniasis in North West of Iran, by targeting the major surface  
847 protein gene. J Arthropod Borne Dis. 2013;7:46–55.
- 848 25. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents.  
849 Annu Rev Entomol. 2013;58:227–50.
- 850 26. Sant'Anna MR, Darby AC, Brazil RP, Montoya-Lerma J, Dillon VM, Bates PA,  
851 Dillon RJ. Investigation of the bacterial communities associated with  
852 females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. PLoS One. 2012;  
853 7:e42531.
- 854 27. Da Rocha NO, Lambert SM, Dias-Lima AG, Julião FS, Souza BMPS. Molecular  
855 detection of *Wolbachia pipientis* in natural populations of sandfly vectors of  
856 *Leishmania infantum* in endemic areas: first detection in *Lutzomyia*  
857 *longipalpis*. Med Vet Entomol. 2017;32:111–4.
- 858 28. Walker T, Moreira LA. Can *Wolbachia* be used to control Malaria? Mem Inst  
859 Oswaldo Cruz. 2011;106:212–7.
- 860 29. McMeniman CJ, Lane AM, Fong AWC, Voronin DA, Iturbe-Ormaetxe I,  
861 Yamada R, et al. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial  
862 passage in mosquito cell lines. Appl Environ Microbiol. 2008;74:6963–9.
- 863 30. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL.  
864 Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the  
865 mosquito *Aedes aegypti*. Science. 2009;323:141–4.
- 866 31. Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE,  
867 Sinkins SP. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits  
868 *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog. 2010;6:  
869 e1001143.
- 870 32. Zug R, Hammerstein P. *Wolbachia* and the insect immune system: what  
871 reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-  
872 host interactions. Front Microbiol. 2015;6:1201.
- 873 33. Gomes B, Purkait B, Deb RM, Rama A, Singh RP, Foster GM, et al.  
874 Knockdown resistance mutations predict DDT resistance and pyrethroid  
875 tolerance in the visceral leishmaniasis vector *Phlebotomus argentipes*. PLoS  
876 Negl Trop Dis. 2017;11:e0005504.
- 877 34. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF.  
878 *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem Inst Oswaldo Cruz.  
879 2015;110:831–46.
- 880 35. Warburg A, Faiman R. Research priorities for the control of phlebotomine  
881 sand flies. J Vector Ecol. 2011;36:510–6.
- 882 36. Tesh R, Modi G. Development of a continuous cell line from the sand-fly  
883 *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to  
884 infection with arboviruses. J Med Entomol. 1983;20:199–202.
- 885 37. Rey GJ, Ferro C, Bello FJ. Establishment and characterization of a New  
886 Continuous Cell Line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and  
887 its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. Mem  
888 Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:103–10.
- 889 38. Soares RP, Altoé EC, Ennes-Vidal V, da Costa SM, Rangel EF, Souza N, et al. *In*  
890 *vitro* inhibition of *Leishmania* attachment to sand fly midguts and LL-5 cells  
891 by divalent metal chelators, anti-gp63 and phosphoglycans. Protist. 2017;  
892 168:326–34.
- 893 39. Côrtes LMC, Pereira MCS, Silva FS, Pereira BAS, Junior FOO, Soares ROA,  
894 et al. Participation of heparin binding proteins from the surface of  
895 *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites  
896 of *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) *in vitro*. Parasit Vectors. 2012;5:142.
- 897 40. Tinoco-Nunes B, Telleria EL, da Silva-Neves M, Marques C, Azevedo-Brito  
898 DA, Pitaluga AN, Traub-Csekö YM. The sand fly *Lutzomyia longipalpis*  
899 LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows  
900 immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*. Parasit Vectors.  
901 2016;9:222.
- 902 41. Bello FJ, Mejia AJ, Corena MDP, Ayala M, Sarmiento L, Zuñiga C, Palau MT.  
903 Experimental infection of *Leishmania (L.) chagasi* in a cell line derived from  
904 *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;  
905 100:519–25.
- 906 42. Côrtes LM, Silva RM, Pereira BA, Guerra C, Zapata AC, Bello FJ, et al. Lulo cell  
907 line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel  
model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. Parasit Vectors.  
2011;4:216.
- 908 43. Rafiqi AM, Park CH, Kwan CW, Lemke S, Schmidt-Ott U. BMP-dependent  
909 serosa and amnion specification in the scuttle fly *Megaselia abdita*. Develop.  
2012;139:3373–82.
- 910 44. Voronin D, Tran-Van V, Potier P, Mavingui P. Transinfection and growth  
911 discrepancy of *Drosophila Wolbachia* strain wMel in cell lines of the  
912 mosquito *Aedes albopictus*. J Appl Microbiol. 2010;108:2133–41.
- 913 45. Kim M, Lee JH, Lee SY, Kim E, Cuhng J, Caspar, a suppressor of antibacterial  
914 immunity in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:16358–63.
- 915 46. Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity:  
916 pathways, effectors, and connections. J Mol Biol. 2013;425:4921–36.
- 917 47. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the Jak/Stat signalling  
918 pathways. Growth Factors. 2012;30:88–106.
- 919 48. Povelones M, Waterhouse RM, Kafatos FC, Christophides GK. Leucine-rich  
920 repeat protein complex activates mosquito complement in defense against  
921 *Plasmodium* parasites. Science. 2009;324:258–61.
- 922 49. Telleria EL, Sant'Anna MRV, Ortigão-Farias JR, Pitaluga AN, Dillon VM, et al.  
923 Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host  
924 *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem. 2012;287:12985–93.
- 925 50. Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. Caspar controls resistance to *Plasmodium*  
926 *falciparum* in diverse Anopheline species. PLoS Path. 2009;5:e1000335.
- 927 51. Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, et al.  
928 Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*  
929 induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania*  
930 *major*. Infect Immun. 2004;72(12):7140–6.
- 931 52. Akuffo H, Hultmark D, Engstöm A, Frohlich D, Kimbrell D. *Drosophila*  
932 antibacterial protein, Cecropin A, differentially affects non-bacterial  
933 organisms such as *Leishmania* in a manner different from other  
934 amphiphilic peptides. Int J Mol Med. 1998;1:77–82.
- 935 53. Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, et al.  
936 Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic  
937 bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:3274–8.
- 938 54. Hao Z, Kasumba I, Lehane MJ, Gibson WC, Kwon J, Aksoy S. Tsetse immune  
939 responses and trypanosome transmission: implications for the development  
940 of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. Proc Natl Acad Sci  
941 USA. 2001;98:12648–53.
- 942 55. Bourtzis K, Pettigrew MM, O'Neill SL. *Wolbachia* neither induces nor  
943 suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. Insect Mol Biol.  
2000;9:635–9.
- 944 56. Wong ZS, Hedges LM, Brownlie JC, Johnson KN. *Wolbachia*-mediated  
945 antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. PLoS  
946 One. 2011;9:e25430.
- 947 57. Rancés E, Johnso TK, Popovic J, Iturbe-Ormaetxe I, Zakir T, Warr CG, O'Neill  
948 SL. The Toll and Imd pathways are not required for *Wolbachia*-mediated  
949 dengue virus interference. J Virol. 2013;87:11945–9.
- 950 58. Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host  
951 interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453–83.
- 952 59. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in  
953 the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana*  
954 by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol. 2002;124:495–507.
- 955 60. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the  
956 development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the  
957 life cycle. Int J Parasitol. 2003;33:1027–34.
- 958 61. Tan CH, Wong PJ, Li MI, Yang H, Ng LC, O'Neill SL. wMel limits Zika and  
959 chikungunya virus infection in a Singapore *Wolbachia*-introgressed *Ae.*  
960 *aegypti* strain, wMel-Sg. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005496.
- 961 62. Aliota MT, Walker EC, Yepes AU, Velez ID, Christensen M, Osorio JE. The  
962 wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of chikungunya virus in  
963 *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004677.
- 964 63. Joubert DA, Walker T, Carrington LB, et al. Establishment of a  
965 *Wolbachia* superinfection in *Aedes aegypti* mosquitoes as a potential  
966 approach for future resistance management. PLoS Pathog. 2016;12:  
967 e1005434.
- 968 64. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by  
969 phlebotomine sand flies. Int J Parasitol. 2007;37:1097–106.
- 970 65. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector  
971 interactions overview. Parasit Vectors. 2012;5:276.
- 972 66. Frentiu FD, Robinsion J, Young PR, McGraw EA, O'Neill SL. *Wolbachia*-  
973 mediated resistance to Dengue virus infection and death at the cellular  
974 level. PLoS One. 2010;15(5):e13398.



- 979 67. Iturbe-Ormaetxe I, Woolfit M, Rancès E, Duploux A, O'Neill SL. A simple  
980 protocol to obtain highly pure *Wolbachia* endosymbiont DNA for genome  
981 sequencing. *J Microbiol Methods*. 2011;84:134–6.
- 982 68. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. Cloning and characterization of a  
983 gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont  
984 *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol*. 1998;180:2373–8.
- 985 69. Telleria EL, Sant'Anna MR, Alkurbi MO, Pitaluga AN, Dillon RJ, Traub-Csekö  
986 YM. Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes  
987 induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit*  
988 *Vectors*. 2013;6:12.
- 989 70. Frentiu FD, Tasnim Z, Walker T, et al. Limited dengue virus replication in  
990 field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. *PLoS*  
991 *Negl Trop Dis*. 2014;8:e2688.
- 992 71. Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an  
993 *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*. 2005;310:326–8.

UNCORRECTED PROOF

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## ANEXO 2 – Projeto paralelo

### **Deteccção da cepa de Wolbachia wMel em mosquitos *Aedes aegypti* coletados no campo através da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)**

No mesmo período do doutorado sanduíche realizado na Universidade de Monash na Austrália, foi realizado um outro projeto com o objetivo de se padronizar a técnica LAMP para deteção de diferentes cepas de *Wolbachia pipientis* utilizadas no projeto World Mosquito Program (antigo Eliminate Dengue), e também das cepas mantidas em laboratório, como forma de reduzir os custos nos locais onde o projeto está sendo aplicado.

Esta técnica foi criada por Notomi e colaboradores em 2000 e tem sido aplicada para diagnósticos de diversas doenças e microorganismos, como dengue, chikungunya, Zika e *Plasmodium* sp. (HU et al., 2015; LOPEZ-JIMENA et al., 2018; LAU et al., 2016, SABALZA et al., 2018). Como foi observado na minha dissertação de mestrado, a técnica LAMP tem um custo quase que 50% menor em relação ao PCR quantitativo em tempo real, além de não precisar de equipamentos onerosos como a máquina de qPCR, já que a reação de LAMP pode ser feita em banho seco ou termociclador (GONÇALVES et al., 2014).

Inicialmente foi proposta a utilização da técnica LAMP para deteção das cepas wMel, wMelPop e para o mosquito *Aedes aegypti*. Para isto, foram desenhados iniciadores utilizando o software LAMP Designer 1.14, sendo que estes foram desenhados baseados nas sequencias WD0550 de *W. pipientis* e Rps6 de *A. aegypti*. Como controle da reação, foram utilizados os iniciadores previamente publicados para *W. pipientis* baseados na sequência 16S (GONÇALVES et al., 2014).

Durante a padronização, foram utilizadas diferentes concentrações de DNA (figura A1) e no período de 90 minutos de incubação à 63°C para confirmação da especificidade dos iniciadores desenhados, sendo os resultados analisados em gel de agarose.

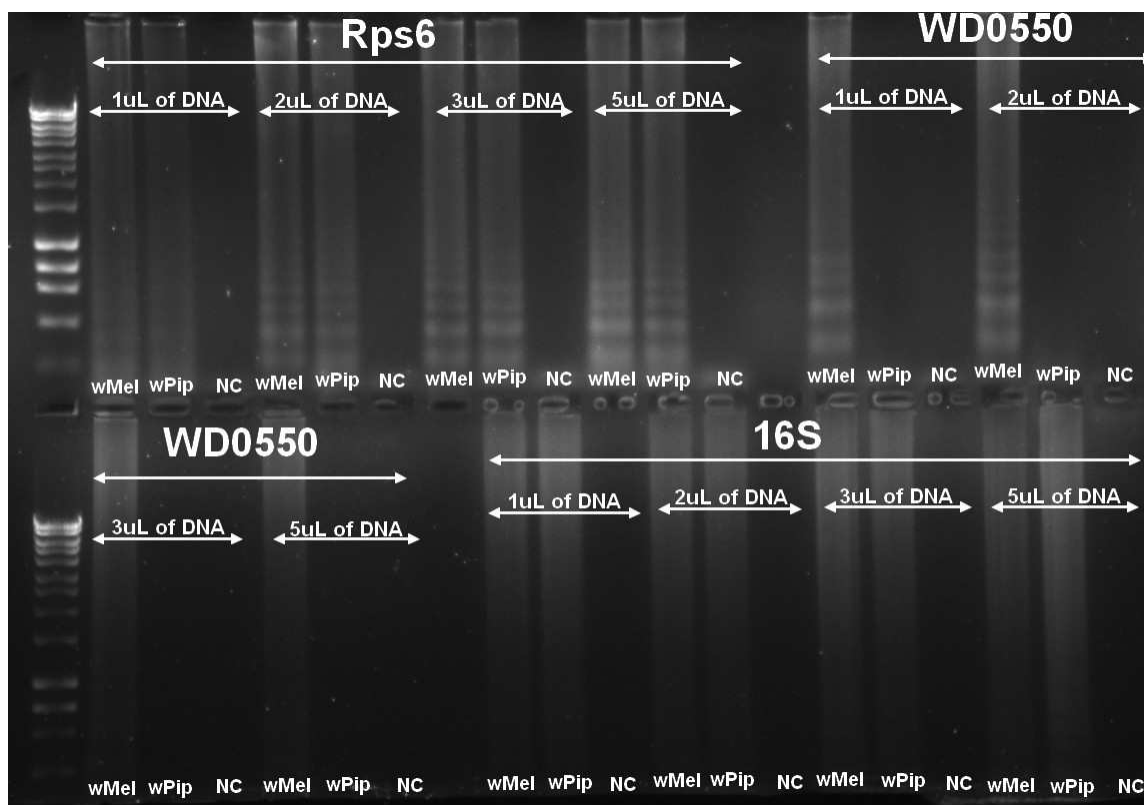


Figura A1: Diferentes concentrações de DNA para padronização da técnica LAMP. Foram utilizados iniciadores baseados no gene *Rps6* para *A. aegypti*, WD0550 para as cepas wMel e wMelPop de *W. pipiens* e 16S como controle da reação. Utilizando 1, 2, 3 e 5uL de DNA foi possível obter amplificação de todos os iniciadores. Resultados em gel de agarose 1.5% corado com RedSafe.

Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações dos iniciadores na reação para que fosse possível a visualização dos resultados através da mudança de coloração das amostras, sendo positivas em azul, e negativas em roxo, através da utilização do corante Azul de Hidroxinaftol (figura A2) Devido ao longo período de incubação de três horas, foram feitos ajustes na concentração de iniciadores e dNTPs e, após duas horas de incubação, foi possível observar a olho nu a mudança de cor tanto com os iniciadores para *Wolbachia*, como com os iniciadores para a espécie de mosquito *Aedes aegypti* (figura A2).

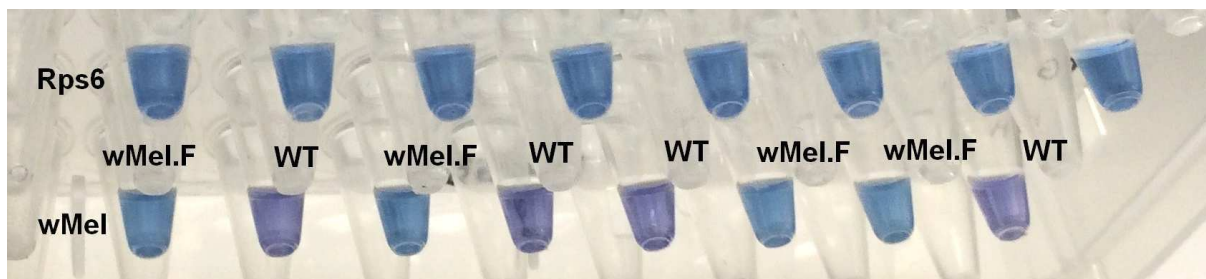


Figura A2: LAMP com amostras de ovos de mosquitos *A. aegypti* selvagem e infectados com a cepa wMel. As reações específicas para *W. pipientis* (wMel.F) e mosquitos selvagens não infectados (WT) foram analisadas após duas horas de incubação. É possível ver as amostras positivas em azul e negativas em roxo para o gene Rps6 de *A. aegypti* e WD0550 de *W. pipientis*.

Após observarmos a reação cruzada entre wMel e wMelPop, concluímos que, devido à grande semelhança de ambas as cepas, seria difícil achar uma região que pudéssemos desenhar os iniciadores específicos para cada uma destas cepas. Diante desta limitação, mantivemos os iniciadores desenhados e, devido ao longo período de incubação, desenhamos novos iniciadores, utilizando o mesmo software, utilizando a sequência do gene *wsp* de *W. pipientis*.

Foram feitos testes com amostras de campo de mosquitos, larvas e ovos com os iniciadores para wMel/wMelPop, no total de 3.405 amostra de mosquito de campo soltos em Cairns e Townsville, bem como para os iniciadores específicos para *A. aegypti*, sendo importante o uso destes iniciadores em amostras de ovos, já que a identificação da espécie neste tipo de amostra é difícil de ser realizada.

Além disso, foram padronizados dois tipos de corantes diferentes para visualização, sendo o HNB descrito anteriormente, e o Master Mix colorimétrico da companhia New England Biolabs, o qual é possível observar a mudança da coloração mais facilmente, sendo as amostras positivas em amarelo e as negativas em rosa (figura A3). Através do uso deste novo corante, o período de incubação diminuiu para 30 minutos à 65°C.

Foram utilizadas diferentes amostras de mosquito *A. aegypti* infectadas com diferentes cepas de *W. pipientis* para confirmar a especificidade da reação para as cepas wMel/wMelPop, bem como diferentes espécies de mosquitos para confirmar a especificidade dos iniciadores para *A. aegypti* (figura A3).

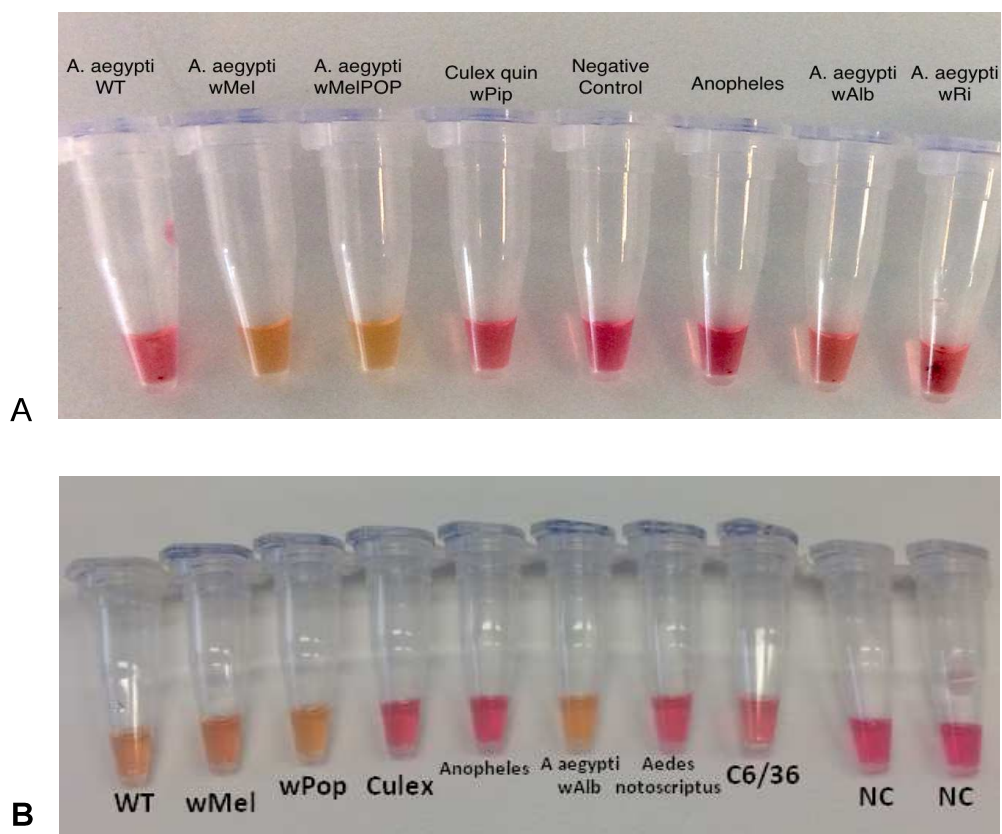


Figura A3: LAMP com o novo corante para as cepas wMel/wMelPop e para o mosquito *A. aegypti*. Confirmação da especificidade para as cepas wMel/wMelPop, em relação à diferentes cepas de *W. pipientis* (A) e para *Aedes aegypti* (B). Em amarelo as amostras positivas e em rosa as amostras negativas.

Após confirmação da especificidade dos iniciadores para *W. pipientis* com o novo Master Mix, foram feitos testes com amostras de campo de *A. aegypti* coletados em áreas onde a bactéria já foi estabelecida no Norte de Queensland, na Austrália no período de junho de 2017 à fevereiro de 2018, em um total de 3585 amostras (figura A4).

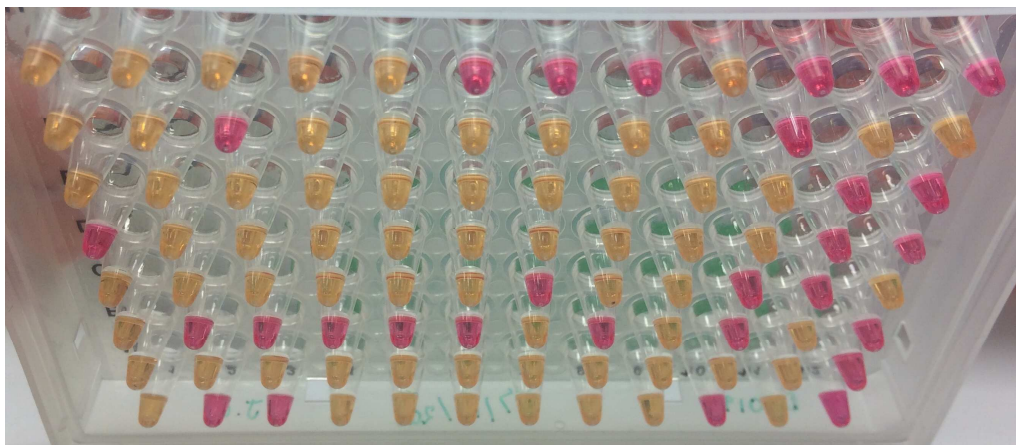


Figura A4: LAMP com o Master Mix colorimétrico em amostras de campo. Placa representando amostras de mosquitos *A. aegypti* coletadas no norte da Austrália e detecção da cepa wMel. Em amarelo as amostras positivas e em rosa as amostras negativas.

Além disto, em comparação com o diagnóstico atual utilizado no laboratório na Austrália (PCR em tempo real), os parâmetros de especificidade, sensibilidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo foram calculados e os mesmos demonstraram a eficiência da técnica (tabela A1).

**Tabela A1: Parâmetros calculados para a técnica LAMP em comparação com o diagnóstico de PCR em tempo real**

Parâmetro	Valor	Sequência
Especificidade	94.16 %	92.67% to 95.42%
Sensibilidade	99.66 %	99.33% to 99.85%
Acurácia	97.79 %	97.25% to 98.25%
Valor Preditivo Positivo	97.08 %	96.36% to 97.66%
Valor Preditivo Negativo	99.30 %	98.60% to 99.65%

Através destes resultados, confirmamos a alta eficácia da técnica LAMP para detecção das cepas wMel/wMelPop em mosquitos de campo, além da sua simples execução e análise dos resultados, sendo fatores importantes para a sua utilização em locais onde não há alta infraestrutura. A padronização foi finalizada e o artigo está nos estágios finais de elaboração para ser submetido à revista de publicação científica.

### Referências bibliográficas:

GONÇALVES, D.S.; CASSIMIRO, A.P.; DE OLIVEIRA, C.D.; RORIGUES, N.B.; MOREIRA, L.A. Wolbachia detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification. **Parasit & Vector**, 7:228

HU, S.; LI, M.; ZHONG, L.; LU, S.; LIU, Z.; WEN, J.; HUANG, X. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 265, 2015.

LAU, Y.; LAI, M.; FONG, M.; JELIP, J.; MAHMUD, R. Loop-Mediated Isothermal Amplification assay for identification of five human Plasmodium species in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 2, p. 336-339, 2016.

LOPEZ-JIMENA, B.; WEHNER, S.; HAROLD, G.; BAKHEIT, M.; FRISCHMANN, S.; BEKAERT, M.; FAYE, O.; SALL, A.A.; WEIDMANN, M. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12 (5): e0006448.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucl Acids Research**, 28(12), 2000.

SABALZA, M.; YASMIN, R.; BARBER, C.A.; CASTRO, T.; MALAMUD, D.; et al. Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. **PLoS One**, v. 13 (2): e0192398, 2018.