

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

Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com diferentes espécies de  
*Leishmania*

**por**

**Ana Clara Araújo Machado Pires**

**Belo Horizonte**

**Janeiro/2014**

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

Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com diferentes espécies de  
*Leishmania*

**por**

**Ana Clara Araújo Machado Pires**

**Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
na área de concentração Biologia Celular e  
Molecular.**

**Orientação: Nágila Francinete Costa  
Secundino**

**Belo Horizonte**  
**Janeiro/2014**

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

P667e Pires, Ana Clara Araújo Machado.  
2014

Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com diferentes espécies de *Leishmania* / Ana Clara Araújo Machado Pires. – Belo Horizonte, 2014.

XIV, 52 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 57 - 66

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

1. Leishmaniose/transmissão 2. *Leishmania* /patogenicidade 3. Interações Hospedeiro-Parasita/genética  
I. Título. II. Secundino, Nágila Francinete Costa (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com diferentes espécies de  
*Leishmania*

**por**

**Ana Clara Araújo Machado Pires**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (Presidente)**

**Dr. Gustavo Fontes Paz**

**Dr. Felipe Arley Costa Pessoa**

**Suplente: Dr. Fabrício Freire de Melo**

Dissertação defendida e aprovada em: 23/01/2014.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Maurício e Meire, pelo carinho, apoio incondicional e pela ajuda em todas as etapas e decisões tomadas em minha vida. Obrigada por tudo. Amo vocês!

À minha orientadora, Dra. Nágila Francinete Costa Secundino, pela oportunidade que me proporcionou um crescimento profissional e pessoal, me abriu caminhos e me trouxeram para esse momento. Obrigada pela atenção, dedicação e incentivos.

Ao Dr. Paulo Pimenta pela ajuda e incentivo profissional.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG pela convivência e ajuda científica. Agradeço, principalmente, a Bárbara, Thaís, Carol Cunha e Izabela por me ajudarem sempre que precisei. Amigas que tenho muito carinho. Obrigada por tornar o trabalho mais alegre!

Ao Lucas pelo companheirismo, segurança, amizade e carinho. Obrigada, meu amor, pelos incentivos, pelo jeito otimista de enfrentar as situações e por estar sempre ao meu lado. Sem você eu não conseguiria passar por tantas dificuldades como passei e superá-las da melhor forma possível! Muito obrigada.

Aos meus queridos amigos Déborah, Flávia, Melissa, Rita, Samira, Soraya e Pedro Ivo. Obrigada pela amizade sincera e fiel de vocês. Fico feliz em saber que sempre posso contar com vocês.

À Aline, Karen, Luiz, Mariana, Nathália e Rafael, amigos que fiz na faculdade e que estão comigo até hoje, me proporcionando momentos de risadas e diversão.

À toda a equipe do CPqRR/Fiocruz pelo apoio estrutural e financeiro, permitindo o desenvolvimento do trabalho com qualidade.

Ao programa de Pós-graduação do CPqRR/Fiocruz pela ajuda e apoio sempre que precisei.

Aos órgãos de financiamento CAPES, CNPq, FAPEMIG e CPqRR/Fiocruz.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO.....	XII
ABSTRACT .....	XIV
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.1 Objetivos Específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
3.1 Os Flebotomíneos.....	18
3.2 Os protozoários do gênero <i>Leishmania</i> .....	19
3.3 Interação <i>Leishmania</i> -vetor.....	21
3.4 Moléculas de adesão.....	23
3.5 Transmissão do parasito pelo vetor.....	25
4 MÉTODOS.....	28
4.1 Captura e acondicionamento de flebotomíneos.....	28
4.2 Parasitos e manutenção das cepas.....	29
4.3 A Infecção experimental dos flebotomíneos.....	29
4.3.1 Preparo do sangue.....	29
4.3.2 Preparo dos parasitos.....	30
4.3.3 Infecção experimental.....	30
4.3.4 Separação das fêmeas alimentadas .....	32
4.3.5 Manutenção dos flebotomíneos infectados.....	32
4.3.6 Dissecção do intestino médio.....	33
5 RESULTADOS .....	34
5.1 Infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> com dose de $4 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue.....	34
5.2 Infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> com dose de $2 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue.....	36
5.3 Infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> com dose de $1 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue.....	39

<b>5.4 Avaliação do índice de infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i>, utilizando diferentes concentrações de <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.1 Avaliação do índice de infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i>, utilizando diferentes concentrações de <i>Leishmania (L.) chagasi</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.2 Avaliação do índice de infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i>, utilizando diferentes concentrações de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4.3 Avaliação do índice de infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i>, utilizando diferentes concentrações de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>5.4.4 Avaliação do índice de infecção experimental de <i>Lu. (L.) longipalpis</i>, utilizando diferentes concentrações de <i>Leishmania (L.) major</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5 Avaliação da “permissibilidade” de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> a diferentes espécies de <i>Leishmania</i> em insetos colonizados.....</b>	<b>46</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>55</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenvolvimento dos flebotomíneos. Imagens do ovo, larva, pupa e adulto.....19
- Figura 2:** Desenho esquemático do tubo digestório dissecado de *Phlebotomus (P.) papatasi* (Jobling,1987).....20
- Figura 3:** Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor. (Modificado por Sacks & Kamhawi, 2010).....22
- Figura 4:** Corte sagital de uma fêmea de flebotomíneo infectado por *Leishmania*, (A) mostrando a posição do PSG (Promastigote Secretory Gel) dentro do intestino médio e anterior do vetor e (B) como o PSG força a válvula do estomodeu para abrir, estendendo-a para dentro da região da faringe. (Bates et al, 2007).....26
- Figura 5:** Local de coleta de *Lu. (L.) longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas.....28
- Figura 6:** Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral do processo de alimentação e dos potes contendo os flebotomíneos. (B) Detalhe do alimentador artificial revestido por pele de *Gallus gallus domesticus* jovem contendo sangue e promastigotas de *Leishmania*.....31
- Figura 7:** (A) Espécimes de *Lu. (L.) longipalpis* anestesiado em CO<sub>2</sub> e gelo. Detalhes da triagem de *Lu. (L.) longipalpis*. (B) Fêmea não ingurgitada e macho de *Lu.(L.) longipalpis* (da esquerda para a direita). (C) Fêmea de *Lu. (L.) longipalpis* ingurgitada com sangue contendo parasitos.....32
- Figura 8:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....34
- Figura 9:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....35
- Figura 10:** Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....36

<b>Figura 11:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de $2 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	37
<b>Figura 12:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de $2 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	38
<b>Figura 13:</b> Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de $2 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	39
<b>Figura 14:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de $1 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	40
<b>Figura 15:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de $1 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	41
<b>Figura 16:</b> Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) major</i> no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de $1 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	42
<b>Figura 17:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	43
<b>Figura 18:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	44
<b>Figura 19:</b> Densidade de parasitos no intestino médio de <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....	45

- Figura 20:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) major* em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....46
- Figura 21:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*, de colônia, infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....47
- Figura 22:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*, silvestres e de colônia, infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* (A) dois dias e (B) 6 dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**BOD** = Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

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

**CO<sub>2</sub>** = dióxido de carbono

**°C** = grau Celsius

**DNA** = Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)

**Fiocruz** = Fundação Oswaldo Cruz

**GalNAc** = N-acetilgalactosamina

**LEM** = Laboratório de Entomologia Médica

**LPG** = lipofosfoglicano

**MG** = Minas Gerais

**mL** = mililitro

**Mm** = milimolar

**M199** = meio 199

**µg** = micrograma

**µl** = microlitro

**PBS** = Phosphate Buffer Saline (tampão fosfato/salina)

**PSG** = Promastigote Secretory Gel

**pH** = potencial de hidrogênio iônico

**rpm** = rotações por minuto

**SFB** = Soro Fetal Bovino

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

**%** = porcentagem

## RESUMO

Estudos da interação *Leishmania*-flebotomíneo constituem um importante campo de pesquisa, já que podem contribuir com o conhecimento dos processos envolvidos na transmissão do parasito e na epidemiologia das Leishmanioses. Diante da não existência de uma vacina efetiva contra a doença e de uma variedade limitada de drogas para o tratamento, detalhes de todos os aspectos da interação parasito-vetor são desejáveis para a formulação de novas estratégias de controle contra o protozoário e o vetor. Algumas espécies de flebotomíneos mostram notável especificidade para os parasitos de *Leishmania* transmitidos na natureza, enquanto outras espécies podem se infectar, experimentalmente, por mais de uma espécie de parasito. À essas últimas têm sido sugerido o termo "Vetores Permissivos". Ainda não se sabe ao certo como funciona a interação Vetores Permissivos-*Leishmania*, mas acredita-se que o mecanismo de adesão do parasito ao intestino médio dos vetores permissivos seja diferente dos Vetores Naturais. O trabalho aqui apresentado descreve o desenvolvimento de quatro espécies distintas de *Leishmania* (*Leishmania* (*Leishmania*) *major*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*) em *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*, considerado um vetor permissivo. Esse desenvolvimento foi acompanhado utilizando a técnica de infecção experimental com três diferentes doses de parasitos ( $4 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ). Os intestinos médios dos flebotomíneos infectados foram analisados no 2º e 6º dias após a infecção experimental. O sangue ainda está presente no intestino do vetor no 2º dia após a infecção, mas se encontra totalmente digerido no 6º dia. Foi observado que após a digestão sanguínea, em todas as diferentes doses utilizadas, o inseto suporta a infecção por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, mas não por *L. (V.) braziliensis* que foi capaz de se desenvolver no vetor apenas na dose mais alta ( $4 \times 10^7$ ), mas com uma média de infecção baixa. *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* mostraram uma média de 7000 parasitos quando utilizamos a menor dose, porém não podemos afirmar que estas espécies são capazes de transmitir a doença.

## ABSTRACT

Studies of *Leishmania*-vector interaction are an important field of research, since they can contribute to the understanding of the processes involved in the transmission of the parasite and the epidemiology of leishmaniasis. Faced with no effective vaccine against the disease and a limited range of drugs for the treatment, details of all aspects of vector-parasite interaction are desirable for the formulation of new control strategies against the parasite and vector. Some sandfly species show remarkable specificity for *Leishmania* parasites transmitted in nature while other species can be infected experimentally by more than one parasite species. In the past these have been suggested the term "Permissive Vectors." Are you not sure how to Vectors Permissive-*Leishmania* interaction works, but it is believed that the mechanism of adhesion of the parasite midgut of permissive vectors is different Natural Vectors .It is believed that the mechanism of adhesion to the midgut of *Leishmania* permissive vectors is different, is not dependent on LPG. The work presented here describes the development of four distinct species of *Leishmania* (*Leishmania* (*L.*) *major*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*) in *Lutzomyia* (*L.*) *longipalpis*, a vector considered permissive. This development was accomplished using the technique of experimental infection with three different doses of parasites ( $4 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ). The blood is still present in the gut of the vector on day 2 after infection, but is completely digested in the 6 th day. It was observed that after digestion supports the insect blood infection by *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis*, but not for *L. (V.) braziliensis*. It was observed that after the blood digestion – in all doses tested - the insect was able to support the infection by *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis*, but not by *L. (V.) braziliensis* which was able to grow in vector only at the highest dose ( $4 \times 10^7$ ), but with a low average infection. *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* and *L. (L.) major* showed an average of 7000 parasites when we use the lowest dose, but we can not assert that these species are capable of transmitting the disease.

## 1 INTRODUÇÃO

A importância epidemiológica dos flebotomíneos deve-se ao fato de que espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* podem ser transmissoras dos protozoários do gênero *Leishmania*. Existem várias espécies de *Leishmania* que podem causar Leishmanioses nos mamíferos. A doença apresenta uma variedade de manifestações clínicas no homem com diferenças marcantes quanto à severidade, tendo grande impacto a saúde, principalmente nos países tropicais. Os reservatórios são uma gama variada de mamíferos, tanto domésticos quanto selvagens, que podem ou não apresentar sinais da doença (Laison & Shaw, 1979; Bofill et al, 1985; Young & Duncan, 1994).

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

A susceptibilidade ou resistência dos flebotomíneos à infecção por *Leishmania* parece ser controlada, entre outros, por fatores genéticos, os quais restringem para algumas espécies de insetos a capacidade específica de transmissão de certas espécies do parasito. Duas espécies de flebotomíneos, *Phlebotomus (P.) papatasi* e *Phlebotomus (P.) sergenti*, mostram notável especificidade para os parasitos *Leishmania* transmitidos na natureza, mas outras espécies são amplamente permissivas para o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania*.

O *Lutzomyia (L.) longipalpis* é considerado, segundo a literatura, como um inseto que alberga, experimentalmente, diferentes espécies de *Leishmania* (Myskova et al 2007, Svárovská et al 2010, Secundino et al 2010). Essa espécie de flebotomíneo tem sido utilizada em laboratório como modelo experimental, no qual é infectada com diferentes espécies de *Leishmania*. Este tipo de comportamento foi caracterizado como “Vetor Permissivo” e induz acreditar que *Lu. (L.) longipalpis* seja um exemplar desse grupo, porém na natureza o vetor é capaz de transmitir somente a *Leishmania (L.) chagasi*. Myskova e colaboradores, 2007 demonstraram que a permissividade desse vetor é devido à presença de lectinas em seu intestino médio que permite o desenvolvimento inespecífico de distintas espécies de *Leishmania*. Diferentemente da *Lu. (L.) longipalpis*, outros vetores, principalmente do Velho Mundo, não suportam mais do que uma espécie de *Leishmania* em infecções experimentais, a não ser as espécies que são encontradas infectando-os na natureza, tendo como exemplo o

*Phlebotomus (P.) papatasi* com *Leishmania (L.) major* e o *Phlebotomus (P.) sergenti* com *Leishmania (L.) tropica* (Pimenta *et al.* 1994a). Em 1992, Pimenta e colaboradores sugeriram que moléculas tipo lectinas poderiam servir como sítios de ligação para os parasitos. Posteriormente, diversas publicações relataram à presença de moléculas tipo lectinas capazes de aglutinar parasitos de *Leishmania* em intestinos lisados (Volf & Palánová, 1996; Svobodová *et al.*, 1997; Andrade & Saraiva, 1999).

A molécula de lipofosfoglicano (LPG) é responsável, nos vetores naturais, pela ligação, através do flagelo, às microvilosidades intestinais do inseto, garantindo a sua permanência e desenvolvimento naquele local (Pimenta *et al.*, 1992; Pimenta *et al.*, 1994a). Além disso, o LPG funciona como molécula protetora contra a ação de enzimas, durante a digestão alimentar no inseto vetor (Pimenta *et al.*, 1997; Schlein & Jacobson, 1998). Atualmente, acredita-se que o mecanismo de adesão da *Leishmania* ao intestino médio dos vetores naturais e permissivos é diferente, ou seja, os permissivos não são dependentes de LPG (Myskova *et al.*, 2007).

Proteínas glicosiladas com N-acetilgalactosamina (GalNAc) estão presentes nos insetos permissivos, mas não nos vetores específicos e tem sido considerada uma forte candidata para mediar o processo de adesão *Leishmania* - vetores permissivos. O grupo de flebotomíneos permissivos inclui *Lutzomyia (L.) longipalpis*, *Phlebotomus (P.) argentipes*, *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* e *Phlebotomus (Adlerius) arabicus*. Esta modalidade de ligação (GalNAc) tem implicações importantes para a transmissão e evolução do parasito, contribuindo para a disseminação bem sucedida da *Leishmania*, devido à sua adaptação nos vetores (Myskova *et al.*, 2007).

Considerando o conhecimento derivado da literatura, se faz necessário um estudo mais minucioso para entender o processo da biologia da interação de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com distintas espécies de *Leishmania*, inclusive para caracterizar aspectos importantes da competência vetorial e mesmo para validar ou não o uso deste vetor como modelo experimental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a interação de *Lu. (L.) longipalpis* com diferentes espécies de *Leishmania* durante o processo de infecção experimental.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Comparar o índice de infecção experimental do *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes espécies de *Leishmania*;

Avaliar o índice de infecção experimental do *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania*;

Comparar a “permissibilidade” de *Lu. (L.) longipalpis* a diferentes espécies de *Leishmania* em insetos silvestres e colonizados;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Os Flebotomíneos

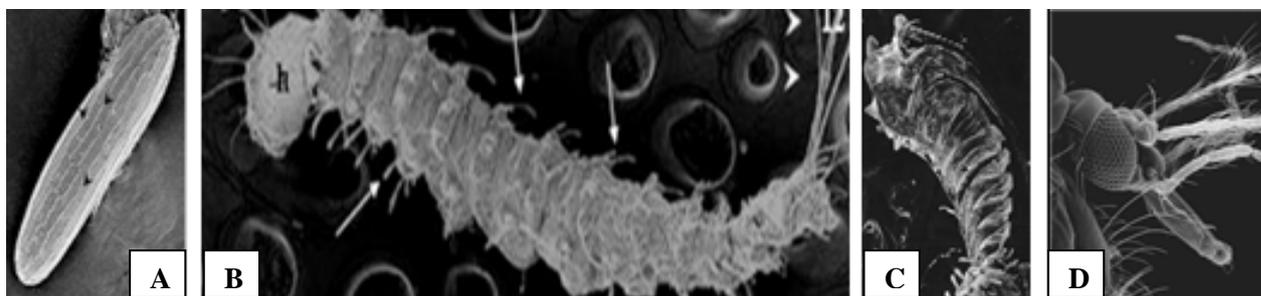
Os flebotomíneos são insetos dípteros da família Psychodidae classificados de acordo com sua distribuição geográfica e características morfológicas em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Ashford, 1991). Popularmente são chamados de “mosquito palha”, “birigui”, “asa branca”, “flebotomo”, “cangalhinha”, “anjinho”, entre outros. Aproximadamente 1000 espécies de flebotomíneos foram descritas até o momento, e dessas, cerca de 30 são vetores comprovados na transmissão de *Leishmania* (Desjeux, 2004).

Estes insetos são holometábolos e seu desenvolvimento, a partir do ovo, passa por quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). A eclosão do ovo ocorre de 7 a 17 dias após a postura, em condições ambientais favoráveis (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a), e o seu desenvolvimento completo pode variar de 30 a 100 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais, como por exemplo *Lutzomyia (L.) longipalpis*, que apresenta seu ciclo de desenvolvimento de 30 a 45 dias em condições de laboratório. As larvas se alimentam de matéria orgânica do solo (Ferro *et al.*, 1997) e se desenvolvem em locais úmidos onde haja substrato orgânico, porém seus criadouros são de difícil localização na natureza (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a). Os flebotomíneos adultos vivem em abrigos úmidos como fendas de árvores, tocas de animais e fendas de pedras e se alimentam, tanto fêmeas quanto machos, de fontes naturais de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar) (Rangel e Lainson 2003).

Além de açúcar, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação do folículo ovariano que ocorre após a digestão e absorção dos nutrientes do sangue (Killick-Kendrick, 1999), embora algumas espécies produzam ovos no seu primeiro ciclo gonotrófico sem a necessidade de sangue (Brazil & Oliveira, 1999). Os flebotomíneos possuem em sua maioria, hábitos crepusculares ou noturnos para realizarem a hematofagia.

Os flebotomíneos, assim como muitos outros insetos, digerem as proteínas do sangue com o auxílio de proteases, tais como tripsinas, que são secretadas pelas células do epitélio intestinal e responsáveis pela quebra do alimento. Os nutrientes provenientes da digestão são absorvidos no intestino médio, e os sais e água no intestino posterior (Richards & Davies 1977, Chapman 1982, 1985). Esses nutrientes são usados para a maturação dos óvulos. O comportamento pouco seletivo de algumas espécies faz com que esses insetos hematófagos se alimentem em diversas fontes de vertebrados, inclusive o homem, facilitando a transmissão de

doenças. Os flebotomíneos são capazes de transmitir bactérias patogênicas que causam a Bartonelose, vírus causadores da Febre Papatasi e protozoários, causando as Leishmanioses (Forattini, 1973, Pessoa & Martins, 1977).



Fonte: Nágila Secundino

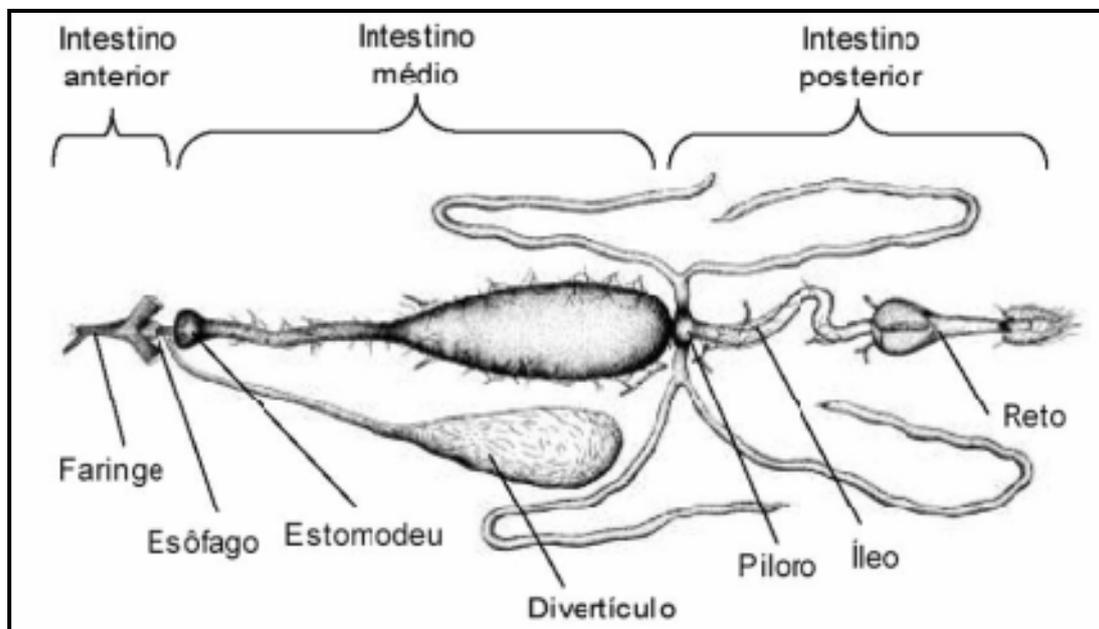
**Figura 1:** Desenvolvimento dos flebotomíneos. Imagens do ovo (A), larva (B), pupa (C) e adulto.

### 3.2 Os protozoários do gênero *Leishmania*

Protozoários parasitos do gênero *Leishmania* Ross, 1903, são membros da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo simples e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto. O ciclo de vida do parasito se distingue em dois estágios de desenvolvimento, um no hospedeiro vertebrado (forma intracelular amastigota) e o outro no hospedeiro invertebrado (forma extracelular promastigota), os flebotomíneos. Estes parasitos são encontrados em uma variedade de animais silvestres e domésticos em todos os continentes, exceto na Antártica, e são agentes etiológicos de doenças conhecidas como Leishmanioses. Aproximadamente 40 espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas, sendo cerca de 21 responsáveis por causar a doença (Killick-Kendrick, 1990)

O gênero *Leishmania* foi dividido em três subgêneros de acordo com as observações do tipo de desenvolvimento do parasito no intestino do vetor. O subgênero *Viannia* compreende os parasitos que se aderem ao intestino do vetor de forma peripilárica, estabelecendo uma infecção inicial no triângulo pilórico e no intestino posterior. Posteriormente, esses parasitos migram e se desenvolvem na região do intestino médio. Esse grupo inclui a *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* e são encontrados somente nas Américas. Na adesão suprapilárica, os parasitos têm o seu desenvolvimento restrito ao intestino médio do vetor e pertencem ao subgênero *Leishmania*, que inclui a maioria das espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, como por exemplo, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*L.*)

*chagasi* e *Leishmania (L.) major*. Já na adesão do tipo hipopilárica, os parasitos se desenvolvem no intestino posterior e pertencem ao subgênero *Sauroleishmania*, tendo como hospedeiros apenas os lagartos do Velho Mundo (Figura 2). A transmissão ocorre quando o inseto infectado é ingerido pelo lagarto (Lainson & Shaw, 1979).



**Figura 2:** Desenho esquemático do tubo digestório dissecado de *Phlebotomus (P.) papatasi* (Jobling, 1987)

As várias espécies do gênero *Leishmania* infectam pessoas no mundo todo, causando um amplo conjunto de doenças coletivamente denominadas Leishmanioses, as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomas, relacionados com as diferentes espécies do parasito (Herwaldt, 1999). A área de distribuição das Leishmanioses tem sido subdividida em “Novo Mundo” (Américas) e “Velho Mundo” (África, Ásia e Europa) (Bañuls *et al.*, 2007), atingindo cerca de 88 países (WHO, 2013). Essas doenças podem ocorrer sob a forma cutânea, a qual varia em localizada, difusa e muco-cutânea, e sob a forma visceral. O tratamento depende de uma variedade de drogas que são tóxicas e requerem atendimento ambulatorial (WHO, 2013).

A Leishmaniose Cutânea ocorre quando o parasito apresenta tropismo por células da pele e aparecem lesões que podem ser ulcerativas e de cura espontânea, mas que deixam fortes cicatrizes. Existem ainda formas recidivas da doença que aparecem após o tratamento. Os principais agentes etiológicos são *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.)*

*amazonensis*, *Leishmania (L.) venezuelensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) colombienseis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi* no Novo Mundo (revisado por Sacks *et al.*, 2008 e Sharma & Singh, 2008). A forma difusa da Leishmaniose Cutânea apresenta lesões não ulcerativas por todo o corpo e sem cura espontânea e é causada principalmente por *Leishmania (L.) amazonensis* no Novo Mundo, sendo de difícil tratamento. Já a forma muco-cutânea apresenta lesões nas mucosas, podendo ser desfigurante e é causada pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (Herwald, 1999).

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Kala azar, é a forma sistêmica da doença e pode ser fatal se não tratada. Apresenta como principais sintomas febre, perda de peso, hepato-esplenomegalia e pancitopenia (redução dos elementos do sangue: hemácias, leucócitos e plaquetas). Em alguns casos após o tratamento pode haver o aparecimento de uma forma cutânea pós-Kala azar. A Leishmaniose Visceral acomete principalmente crianças, indivíduos desnutridos e imunossuprimidos (Gramiccia & Grandoni, 2005; Chappuis *et al.*, 2007). Seus agentes etiológicos são *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) infantum chagasi* (revisado em Mauricio *et al.*, 2000 e Lukes *et al.*, 2007).

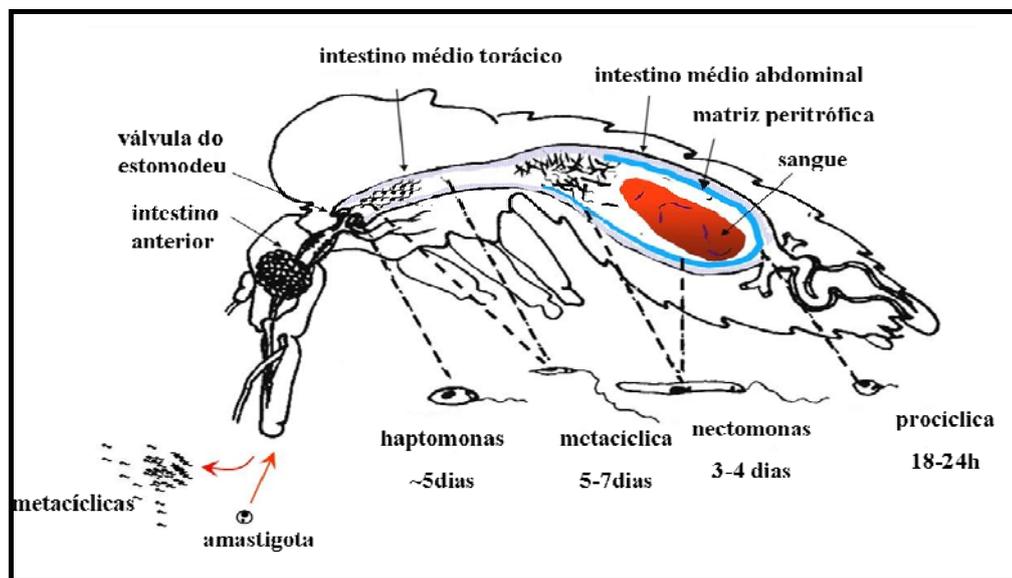
Estima-se que apareçam 1,8 milhões de novos casos por ano, sendo que apenas 600 mil são reportados, por ser uma doença de notificação compulsória somente em 33 desses países. 500 mil, desses novos casos, são de Leishmaniose Visceral, ocorrendo 90% deles em apenas 5 países (Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) e 1,3 milhões de Leishmaniose Cutânea, ocorrendo 90% dos casos em 8 países (Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão e Bolívia) (WHO, 2013).

### **3.3 Interação *Leishmania*-vetor**

O processo de interação do parasito com o hospedeiro vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo está apta a se alimentar de sangue para o desenvolvimento dos seus óvulos. Durante o repasto, a fêmea, eventualmente, pode ingerir o protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida da *Leishmania* nos insetos vetores é extracelular, ou seja, os parasitos se desenvolvem livres na luz do trato digestório (Nieves & Pimenta, 2000; Sacks, 2001).

As amastigotas, presentes no hospedeiro vertebrado, podem ser ingeridas livres ou dentro de macrófagos. Essas formas são rapidamente direcionadas ao intestino médio do inseto e envoltas pela matriz peritrófica, junto ao o bolo sanguíneo (Walters *et al.*, 1993; 1995; Pimenta *et al.*, 1997; Secundino *et al.*, 2005). Após um período de doze a vinte horas e

dentro do bolo alimentar, as amastigotas se diferenciam em promastigotas. As promastigotas são formas altamente multiplicativas, alongadas, flageladas e extremamente móveis. Posteriormente essas promastigotas iniciam o processo de metaciclogênese, transformando-se em formas promastigota procíclica para metacíclica, forma infectante ao vertebrado (Sacks & Perkins; 1985). Além dessas formas, dentro do vetor também são encontradas as formas nectomona, haptomona e paramastigota, conforme classificação de Lawyer *et al.*, 1990. (Sacks & Perkins, 1984; Lawyer *et al.*, 1990; Descoteaux, 1999). A localização e desenvolvimento das promastigotas no trato digestório do vetor é espécie específica (Walters *et al.*, 1989; Pimenta *et al* 1992 Rangel *et al.*, 1992; Gontijo *et al.*, 1998). (Figura 3)



**Figura 3:** Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor. (Sacks & Kamhawi, 2001)

Atualmente, sabe-se que existem várias barreiras naturais e estas são enfrentadas pelos parasitos durante o processo de interação com o vetor. Os principais eventos que ocorrem durante o processo de interação dos flebotomíneos com a *Leishmania* são: (a) a espécie susceptível de *Leishmania* deve estar presente no hospedeiro vertebrado; (b) a origem, a ingestão e a estocagem do sangue infectado no intestino médio; (c) a ação das enzimas digestivas; (d) a formação e a proteção do parasito pela matriz peritrófica; (e) a transformação da amastigota (forma multiplicativa dos vertebrados) para a promastigota procíclica (forma multiplicativa dos insetos vetores); (f) a ruptura da matriz peritrófica na região do intestino médio, devido à produção de quitinase pelos parasitos; (g) a adesão da promastigota pelo flagelo no epitélio do trato digestório dependente ou não da expressão de moléculas espécie -

específicas de lipofosfoglicano (LPG) na superfície dos parasitos; (h) a migração dos parasitos para a região da cárdia ou válvula do estomodeu (após a completa digestão do alimento sanguíneo); (i) a diferenciação dos parasitos em metacíclicos, a única forma infectiva apta a ser injetada e infectar o hospedeiro vertebrado no momento da picada; (j) sucesso na alimentação do flebotomíneo infectado sendo capaz de inocular os parasitos em um novo hospedeiro vertebrado durante a picada; e finalmente, (k) a ação da saliva do vetor, intensificando e modulando o estabelecimento da infecção no local da picada no hospedeiro vertebrado (Revisado por Sacks & Kamhawi 2001; Secundino *et al.*, 2011).

### 3.4 Moléculas de adesão

O LPG é o glicoconjugado majoritário na superfície de promastigotas de *Leishmania*, está localizado em todo o parasito, inclusive no flagelo, e é organizado como um glicocálix filamentososo (Turco & Descoteaux, 1992; Pimenta *et al.*, 1994a). Dentro do inseto a molécula de LPG parece tanto proteger a superfície celular das promastigotas de atividades líticas do intestino (Borovsky & Schlein, 1987; Schlein *et al.*, 1993), como também mediar a interação dos parasitos com o epitélio intestinal do vetor (Pimenta *et al.* 1992; Mahoney *et al.*, 1999). A diferença na capacidade vetorial dos flebotomíneos é controlada pela habilidade dos procíclicos de se ligarem às microvilosidades do intestino médio do inseto durante a excreção da digestão sanguínea. Essa adesão é determinada pelo polimorfismo espécie-específica do LPG do parasito. (Pimenta *et al.* 1994; Mahoney *et al.*, 1999; Sacks *et al.*, 2000).

Durante a diferenciação das promastigotas para o estágio infectivo (metaciclogênese), a molécula de LPG se modifica e aumenta de tamanho (Pimenta *et al.*, 1994a; Sacks *et al.*, 1995; Butcher *et al.*, 1996). Além disso, existe um polimorfismo da molécula, caracterizado pela presença de distintos carboidratos, que é extremamente importante para o estabelecimento e manutenção dos parasitos, sendo determinante de que espécies de *Leishmania* são específicas para determinado vetor (Pimenta *et al.* 1992; Sacks *et al.*, 1995; Mahoney *et al.*, 1999; Sacks *et al.*, 2000).

A habilidade de *P. (P.) papatasi* em transmitir somente *L. (L.) major* pode ser atribuída a natureza altamente substituída do seu LPG, com múltiplos resíduos de  $\beta$ -galactoses terminais para adesão (McConville *et al.*, 1990), já que outras cinco espécies de *Leishmania*, que não contêm os mesmos resíduos, falharam em aderir ao intestino de *P. (P.) papatasi* ou em persistir no intestino após a defecação (Pimenta *et al.*, 1994a). A ideia de que a adesão ao intestino é espécie-específica também é reforçada pelo trabalho de Kamhawi e colaboradores, 2000, que mostraram que intestinos de *P. (P.) sergenti* foram intensamente

marcados após incubação com LPG purificado de *L. (L.) tropica*, mas não com o LPG de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*.

O fato de diferenças na adesão mediada por LPG terem sido observadas quando diferentes espécies vetoras foram comparadas, sustenta a ideia de que moléculas que servem como sítios de ligação para os parasitos podem variar entre as diferentes espécies de flebotomíneos e que podem, por isso, proporcionar pressão evolutiva para o polimorfismo estrutural do LPG (Sacks & Kamhawi, 2001).

Em 1992, Pimenta e colaboradores sugeriram que moléculas tipo lectinas poderiam servir como sítios de ligação para os parasitos. Posteriormente, diversas publicações relataram à presença de moléculas tipo lectinas capazes de aglutinar parasitos de *Leishmania* em intestinos lisados. Em 2004 a natureza de receptores para o LPG de *L. (L.) major* foi caracterizada. PpGalec, uma galectina expressa pelo epitélio intestinal de *P.(P.) papatasi* e *P. (P.) duboscqi*, é utilizada como receptor específico para o LPG de procíclicos de *L. (L.) major* (Kamhawi et al., 2004), comprovando a especificidade deste vetor.

Estudos em laboratório que mostram o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes espécies de flebotomíneos sugerem que os vetores sejam divididos em dois grupos: a) “vetores naturais ou não permissivos” espécies de vetores específicos, ou seja, são refratários ao desenvolvimento da maioria das espécies de *Leishmania*, por exemplo, *P. (P.) papatasi*, o qual apenas suporta o desenvolvimento de *L. (L.) major* (Pimenta et al 1994b) e o *P. (P.) sergenti*, vetor de *L. (L.) tropica* (Kamhawi et al 2000); b) “vetores permissivos”, ou seja, suportam o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania*. Estes incluem *Lu. (L.) longipalpis* (Walters et al. 1993), *P. (P.) argentipes* (Pimenta et al. 1994a), *P. (A.) halepensis* e *P. (A.) arabicus* (Sadlova et al. 2003).

Embora os mecanismos que propiciem esta permissividade não tenham sido totalmente elucidados, existe uma variedade de moléculas candidatas para mediar este processo. Segundo Myskova e colaboradores em 2007, alguns flebotomíneos são facultativos para o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* e os fatores determinantes na interação com os parasitos não resultam de interações com lectinas e LPG (como proposto para o vetor natural). Desta forma o paradigma da "adesão" pode ser entendido de forma diferente. Alguns autores demonstraram que proteínas glicosiladas com N-acetilgalactosamina (GalNAc) estavam presentes nos insetos permissivos, mas não nos vetores específicos (Myskova et al. 2007, Svárovská et al. 2010, Secundino et al. 2010)

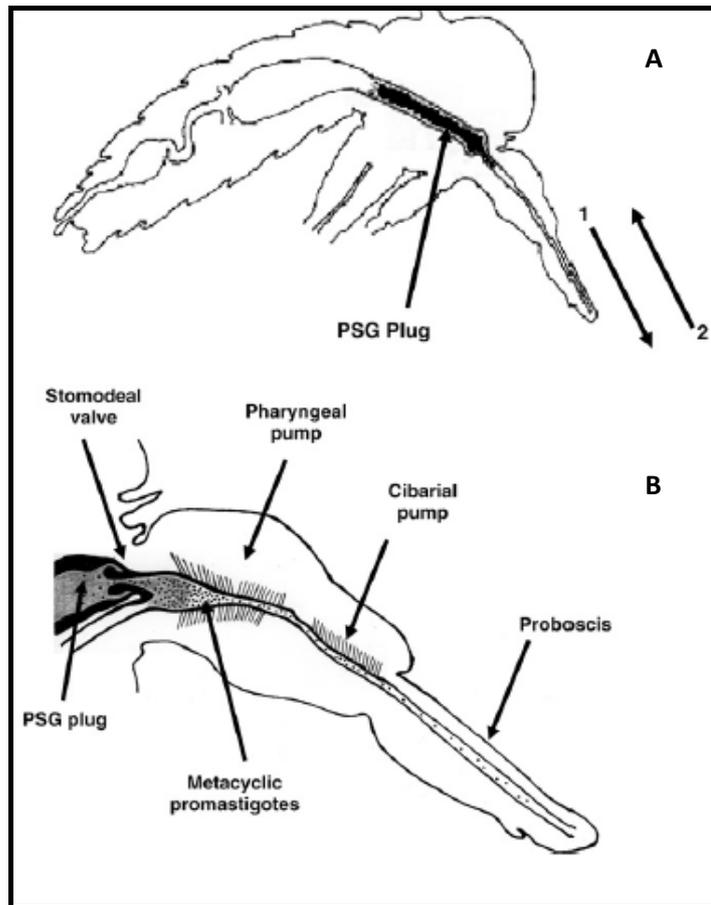
### 3.5 Transmissão do parasito pelo vetor

A transmissão, a partir de um inseto vetor para um hospedeiro vertebrado, é o momento-chave no ciclo de vida dos parasitos, incluindo os tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. O inseto encontra-se apto a transmitir o parasito ao hospedeiro vertebrado após a formação das promastigotas metacíclicas.

Alguns autores demonstraram que um dano físico causado à válvula do estomodeu, atribuído à ação de quitinasas produzidas pela *Leishmania*, dificultaria o repasto e favoreceria a regurgitação de promastigotas infectantes na pele do vertebrado (Schlein *et al* 1992; Volf *et al*, 2004). Em 1981, Killick-Kendrick e Molyneaux sugeriram um mecanismo de transmissão no qual formas metacíclicas interferiam diretamente nas sensilas das partes bucais. Estas sensilas, que controlam a sondagem e alimentação, influenciariam a taxa e o direcionamento do material no canal alimentar e promoveriam a liberação dos parasitos na pele do vertebrado.

Fêmeas de flebotomíneos infectadas com *Leishmania* têm dificuldade em engorgitar o sangue durante o segundo repasto sanguíneo e precisam, então, sondar várias vezes até conseguir picar. Esta dificuldade durante a alimentação se deve a um bloqueio biológico e físico causado por massas de parasitos embebidos em uma matriz tipo gel, na válvula do estomodeu do inseto (Bates, 2007). Parasitos que colonizam a parte anterior do intestino limitam o fluxo sanguíneo durante o repasto e provocam um refluxo que transporta esses parasitos, resultando na deposição dos mesmos na pele do hospedeiro (Killick-Kendrick *et al*, 1977). Esta substância tipo gel, secretada pelo parasito no intestino médio, é denominada PSG (*Promastigote Secretory Gel*) e seria responsável pela disfunção mecânica da válvula estomodeal causada pela pressão de uma massa de parasitos. O bloqueio causado pelo PSG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, aumentando o número de tentativas de picada e o tempo de repasto (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Rogers & Bates, 2007). (Figura 4).

Ações em conjunto como a lesão no tecido do vertebrado causado pela picada, o PSG, obstruindo a válvula e a saliva, auxiliariam o flebotomíneo a realizar o repasto, facilitando a entrada do parasito no vertebrado (Rogers & Bates, 2007; Peters *et al*, 2008). A ação da saliva é muito importante na manutenção do fluxo sanguíneo, durante o repasto, promovendo uma rápida alimentação do inseto. A saliva dos flebotomíneos contém substâncias com diferentes atividades, tais como: anti-hemostática, vasodilatadora, anti-inflamatória, imunossupressora, anti-coagulante, anti-agregação plaquetária, fator de modulação da patogenicidade e fator indutor de infectividade de *Leishmania* para o vertebrado (Titus e Ribeiro, 1990; Warburg *et al*, 1994).



**Figura 4:** Corte sagital de uma fêmea de flebotomíneo infectado por *Leishmania*, (A) mostrando a posição do PSG (Promastigote Secretory Gel) dentro do intestino médio e anterior do vetor e (B) como o PSG força a válvula do estomodeu para abrir, estendendo-a para dentro da região da faringe. (Bates et al, 2007)

Na literatura, a maioria do conhecimento gerado acerca do processo de infecção e do estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado tem sido através da inoculação intradérmica ou subcutânea de parasitas. Os experimentos tradicionais e rotineiros utilizam inóculo com quantidades variáveis de parasitos (Belkaid *et al.*, 1998 e 2000). A quantidade de parasitos a ser inoculada foi adequada devido à necessidade de se estabelecer a infecção no hospedeiro sem, contudo, levar em consideração o número de parasitos inoculados pelo inseto vetor na natureza. Warburg & Schlein, 1986 propuseram uma dose de *L. (L.) major* a ser transmitida por *P.(P.) papatasi*, entretanto essa dose foi estimada através da contagem do número de parasitos metacíclicos regurgitados em um micro capilar, obtendo uma estimativa de 0 a 1.000. Para espécies do Novo Mundo foi sugerido que a quantidade de *L.(L.) mexicana* regurgitada por *Lu.(L.) longipalpis* varia de 10 a 10.000 parasitos, porém esse estudo foi

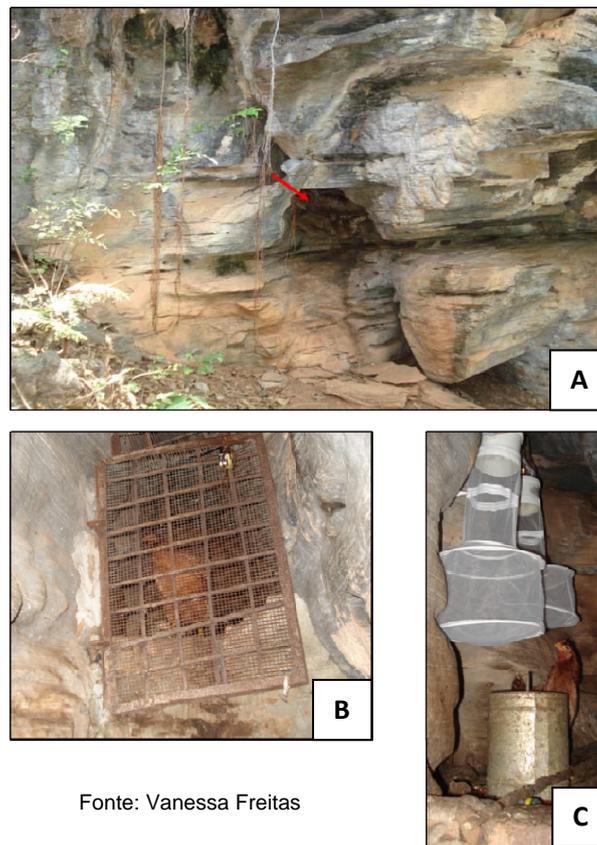
conduzido utilizado um modelo experimental e não pela picada no hospedeiro (Rogers *et al.*, 2004).

Recentemente, foi demonstrado por PCR em tempo real da orelha do hospedeiro vertebrado, que *P. (P.) papatasi* infectado com *L.(L.) major* pode inocular pela picada de 100 a 100.000 parasitos. Cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 600 ou menos promastigotas, enquanto os demais liberaram mais de 1.000 células. Altas doses de infecção foram associadas a intestinos fortemente infectados, com mais de 30000 parasitos (Kimblin *et al.*, 2008). Em 2012, Secundino e colaboradores demonstraram a transmissão bem sucedida em grupos de flebotomíneos com cargas parasitárias maior de 20000 e em 2013, Aslan *et al* mostraram que um modelo de transmissão de Leishmaniose Visceral iniciada pelo vetor é reprodutível, com sucesso, em laboratório.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Captura e acondicionamento de flebotomíneos

**Insetos Silvestres:** Os flebotomíneos da espécie *Lu. (L.) longipalpis* utilizados foram provenientes de coletas semanais na Gruta da Lapinha, localizada nas imediações da cidade de Lagoa Santa, a 60 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'W; latitude 19°03'S), estado de Minas Gerais, Brasil. Os insetos foram capturados com armadilha luminosa tipo CDC (Center for Disease Control light trap) (Sudia & Chamberlain, 1962). Estas armadilhas foram colocadas no início da tarde (por volta das 14 horas) e retiradas no início da manhã do dia seguinte (por volta das 9 horas). Um espécime de *Gallus gallus domesticus* foi colocado no interior da gruta, servindo como fonte de atração para os flebotomíneos (Figura 5).



Fonte: Vanessa Freitas

**Figura 5:** Local de coleta de *L. (L.) longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas.

As gaiolas contendo os flebotomíneos capturados foram envolvidas por um saco plástico preto contendo um chumaço de algodão embebido em água para manutenção da umidade relativa em torno de 80%. As gaiolas foram, então, acondicionadas em caixas de isopor, nas quais também havia chumaços úmidos de algodão, para o transporte até o Laboratório de Entomologia Médica (LEM) no Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz), Belo Horizonte, Minas Gerais.

**Insetos Colonizados:** Desde 1997, uma colônia de *Lu. (L.) longipalpis* proveniente da Gruta da Lapinha é mantida rotineiramente no Laboratório de Entomologia Médica, seguindo a metodologia de Killick-Kendrick e colaboradores (1977). A dieta larval é fornecida segundo Young e colaboradores (1981) e consiste de fezes, ração de coelho e ração comercial de peixe contendo camarão.

## 4.2 Parasitos e manutenção das cepas

Os parasitos utilizados pertencem à cepa *L. (L.) chagasi* (HMOM/BR/70/BH46), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (HMOM/BR/75/H2903) e *L. (L.) major* FV1 (MHOM/IL/80/FN). Tais parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma), acrescido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), penicilina (100U/mL), streptomicina (50 µg/mL), glutamina (12,5 mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) e 2,5 µg/mL hemina (Sigma). Os parasitos foram cultivados em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 26 °C no Laboratório. Para a realização de todos os experimentos descritos a seguir foram utilizados parasitos de até no máximo 10 passagens em cultura.

## 4.3 A Infecção experimental dos flebotomíneos

### 4.3.1 Preparo do sangue

O sangue foi coletado diretamente por punção cardíaca em camundongos (*Mus musculus*) Balb/c. Os camundongos foram previamente anestesiados com Tiopental (Tiopental Sódico via intramuscular). Com o camundongo completamente anestesiado, foi realizada a assepsia (álcool 70%) da parte ventral do animal. As patas anteriores do camundongo foram presas em um suporte para expor o osso esterno. A agulha, de uma seringa previamente heparinizada, foi introduzida logo abaixo do esterno em uma posição horizontal, um pouco inclinada. O ângulo da inclinação da seringa foi diminuído, ficando

quase que totalmente horizontal, e o êmbolo foi puxado para retirar o sangue do coração. Após a retirada do sangue, o camundongo foi submetido à eutanásia por deslocamento cervical. O sangue foi transferido para um tubo falcon de 15 mL estéril e centrifugado a 2000 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos a 4°C. O plasma foi retirado e colocado em um novo tubo, que em seguida, foi colocado em banho maria a 57 °C por uma hora, para inativação do sistema complemento. As hemácias foram lavadas em PBS estéril por três vezes.

#### **4.3.2 Preparo dos parasitos**

Cinco mililitros da cultura de cada cepa de *Leishmania* foram centrifugados por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi resuspenso em meio M199 (não suplementado com soro) e/ou em PBS estéril. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições anteriores. Ao novo “pellet” foi adicionado cerca de 100µl de meio M199 e ou PBS estéril. Os parasitos foram contados em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

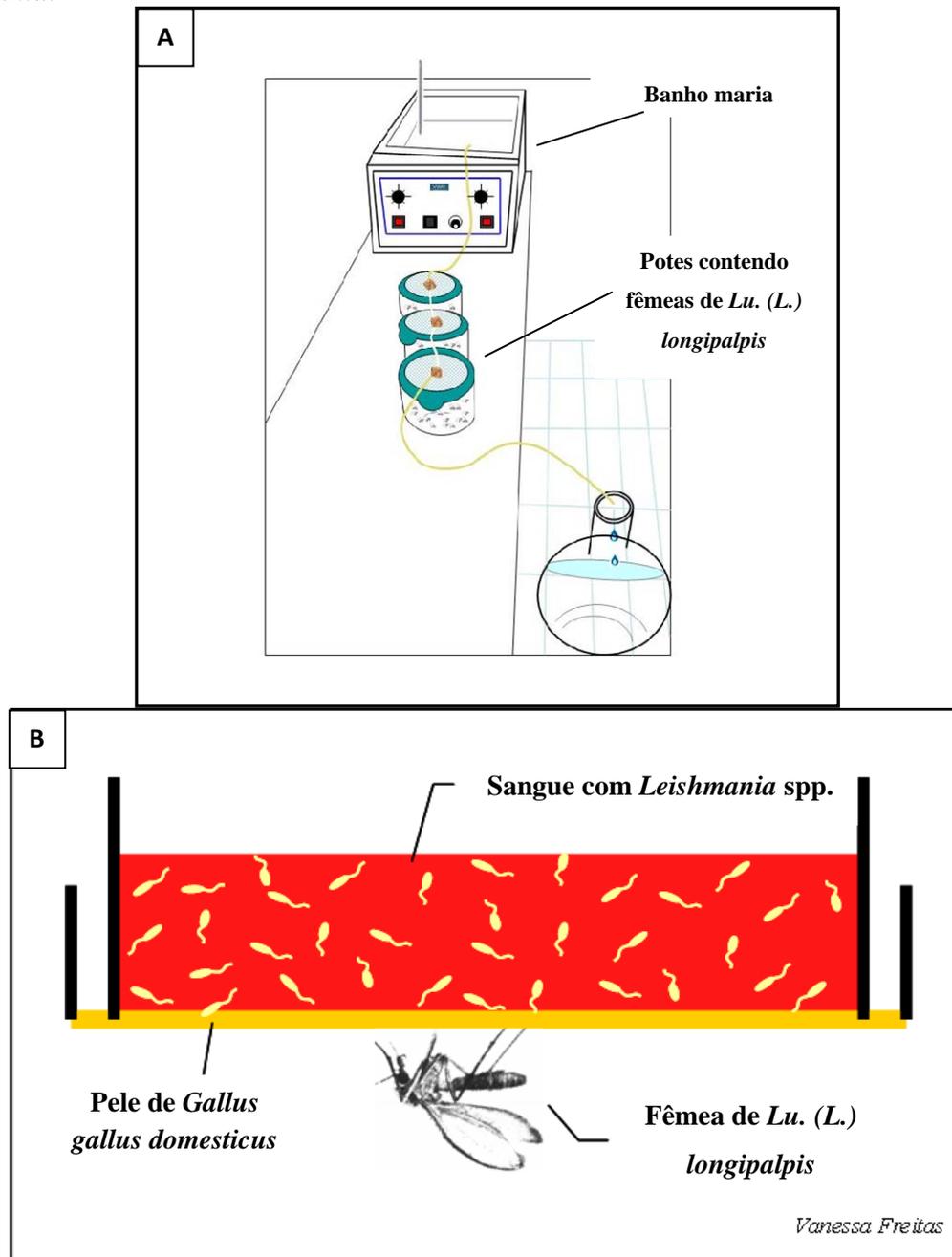
O sangue foi reconstituído (hemácias e plasma) e os parasitos foram adicionados nas concentrações de  $4 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$  por mL de sangue, respectivamente. Também foram adicionados 30 µl de antibiótico, Penicilina-Streptomicina, por mL de sangue.

#### **4.3.3 Infecção experimental**

O processo de infecção experimental dos insetos foi realizado por meio de um sistema artificial que simula a temperatura de um hospedeiro vertebrado, no qual pequenos recipientes de vidro, semelhantes a funis invertidos com capacidade de 300-500 µl, foram conectados através de mangueiras finas (do tipo usado em aquário). Cada recipiente de vidro (alimentador) foi revestido, na parte inferior, com pele recém dissecada de *Gallus gallus domesticus* jovem e preenchido com sangue de camundongo (*Mus musculus*) Balb/c heparinizado nas concentrações de parasitos já descritas. O sistema descrito pode ser observado na figura 6.

O sangue foi mantido entre 38-40 °C e o sistema foi conectado a um banho maria, no qual a água era bombeada através dos recipientes ligados às finas mangueiras, utilizando-se uma bomba do tipo aquário. A parte inferior do recipiente, revestida com a pele de *G. (g.) domesticus* jovem, foi colocada no orifício no tecido do tipo filó (localizada na parte superior da gaiola contendo os insetos), permitindo dessa forma, que os flebotomíneos fossem atraídos pelo calor e se alimentassem com sucesso. O tempo de repasto geralmente foi de 2-3 horas.

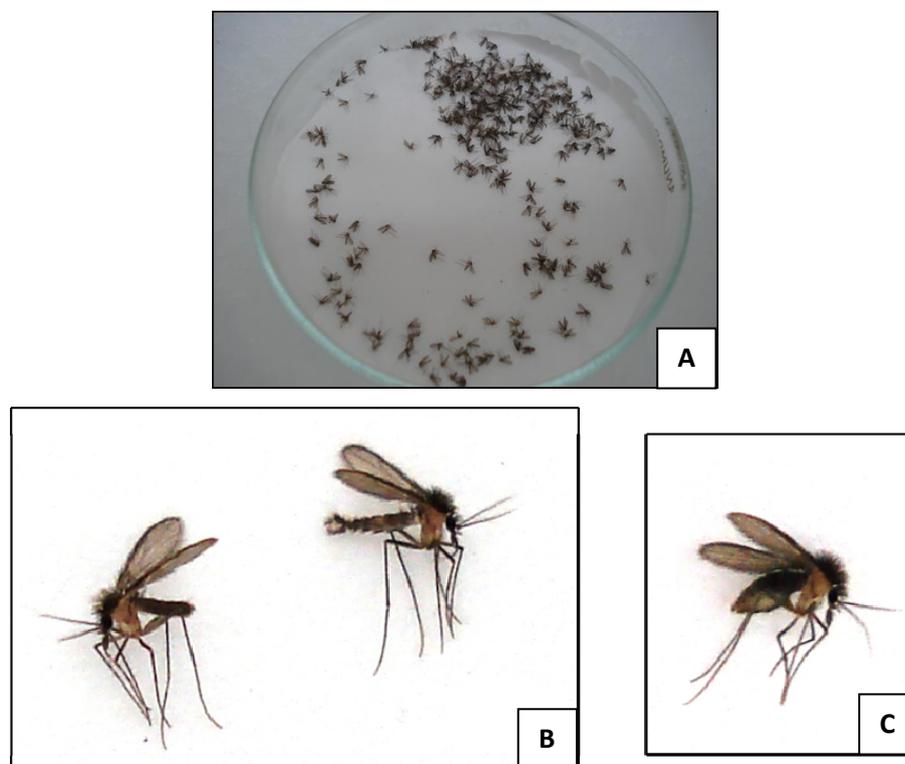
A infecção experimental foi iniciada com uma alta dose de parasitos ( $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue). O uso desta alta dosagem se justifica devido ao fato de propiciar um maior desenvolvimento do parasito no vetor. Nos experimentos subsequentes, foram utilizadas doses menores de parasito ( $2 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue), afim de uma melhor compreensão da interação do vetor *Lu. (L.) longipalpis* com as demais espécies de *Leishmania*.



**Figura 6:** Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral do processo de alimentação e dos potes contendo os flebotomíneos. (B) Detalhe do alimentador artificial revestido por pele de *Gallus gallus domesticus* jovem contendo sangue e promastigotas de *Leishmania*.

#### 4.3.4 Separação das fêmeas alimentadas

As fêmeas alimentadas foram anestesiadas em gás carbônico e separadas das fêmeas que não se alimentaram, como mostrado na figura 7, por meio de aspiração utilizando-se um aspirador manual (capturador de castro).



Fonte: Vanessa Freitas

**Figura 7:** (A) Espécimes de *Lu. (L.) longipalpis* anestesiado em CO<sub>2</sub> e gelo. Detalhes da triagem de *Lu. (L.) longipalpis*. (B) Fêmea não ingurgitada e macho de *Lu. (L.) longipalpis* (da esquerda para a direita). (C) Fêmea de *Lu. (L.) longipalpis* ingurgitada com sangue.

#### 4.3.5 Manutenção dos flebotomíneos infectados

Após a infecção experimental os flebotomíneos foram mantidos em potes contendo um fundo de gesso dentro do infectório do LEM, se alimentando de solução de sacarose 30%. Diariamente os flebotomíneos mortos foram retirados dos potes. Grupos de flebotomíneos foram dissecados no segundo e sexto dias consecutivos à alimentação sanguínea, a fim de se determinar a carga parasitária.

#### **4.3.6 Dissecção do intestino médio**

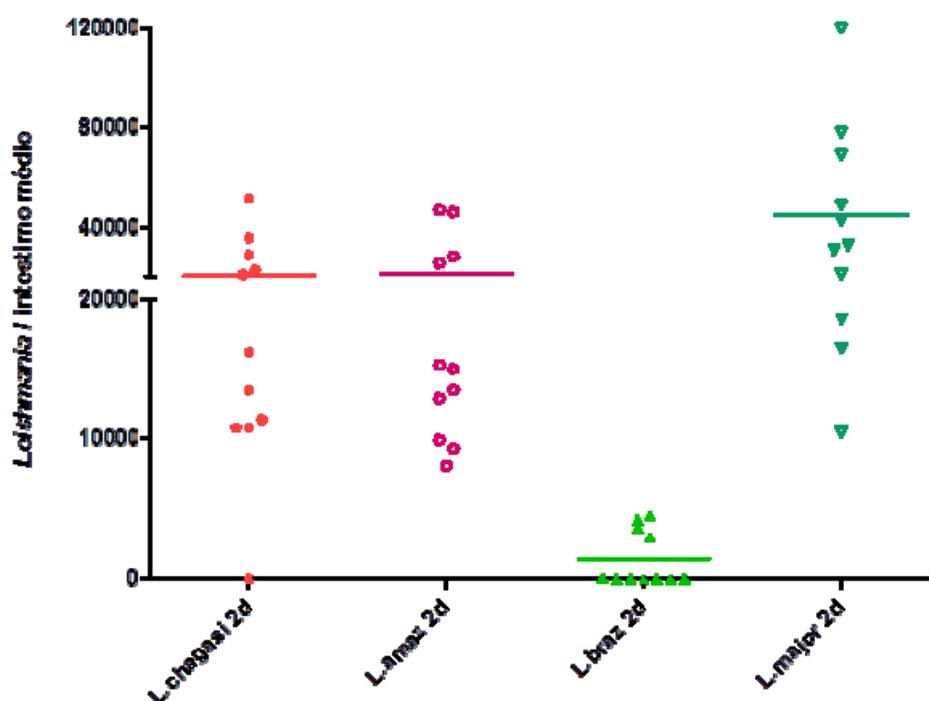
Fêmeas alimentadas foram anestesiadas no freezer (-20° C) por 5 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo PBS (pH 7,2) sobre gelo, de forma que os insetos ficassem imobilizados. As fêmeas foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de PBS (cerca de 30-40 microlitros) e com a ajuda de microscópio estereoscópio e estiletes, foram dissecadas. Primeiramente a cabeça foi decepada, depois as asas foram retiradas e apoiando-se um estilete no tórax e outro na região abdominal os últimos tergitos foram puxados com movimentos leves, trazendo o intestino para fora do corpo do flebotomíneo. Cada intestino foi colocado em um tubo de 1,5 mL contendo 30 µl de PBS, em seguida foram macerados e o número de promastigotas em cada intestino foi quantificado através de contagem em câmara de Neubauer.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis* com dose de $4 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue

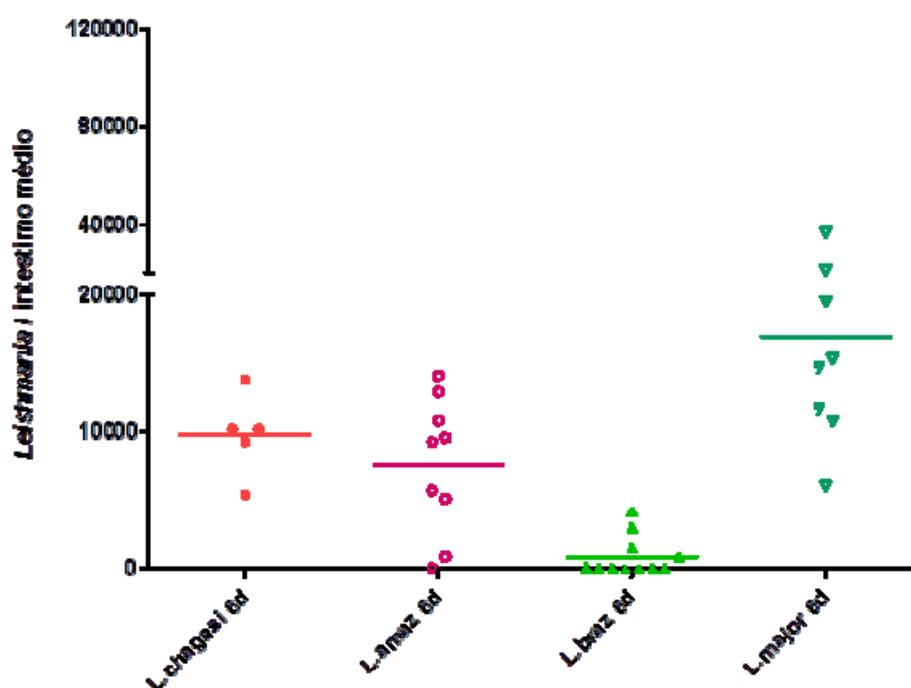
Os experimentos foram realizados em duplicata e uma média de 150 flebotomíneos, por espécie de parasito, foi utilizada em cada infecção experimental. Em média, 60% das fêmeas se alimentaram durante a infecção experimental.

No segundo dia após o repasto infectante, as espécies estudadas desenvolveram-se bem no *Lu. (L.) longipalpis*, com exceção de *L. (V.) braziliensis*. As espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma média de infecção de 20.000 parasitos por inseto, enquanto a *L. (L.) major* apresentou o maior média de infecção (média de 40.000 parasitos por inseto) e *L. (V.) braziliensis* apresentou a menor média, aproximadamente 1.000 parasitos por inseto, como mostra a figura abaixo. (Figura 8)



**Figura 8:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

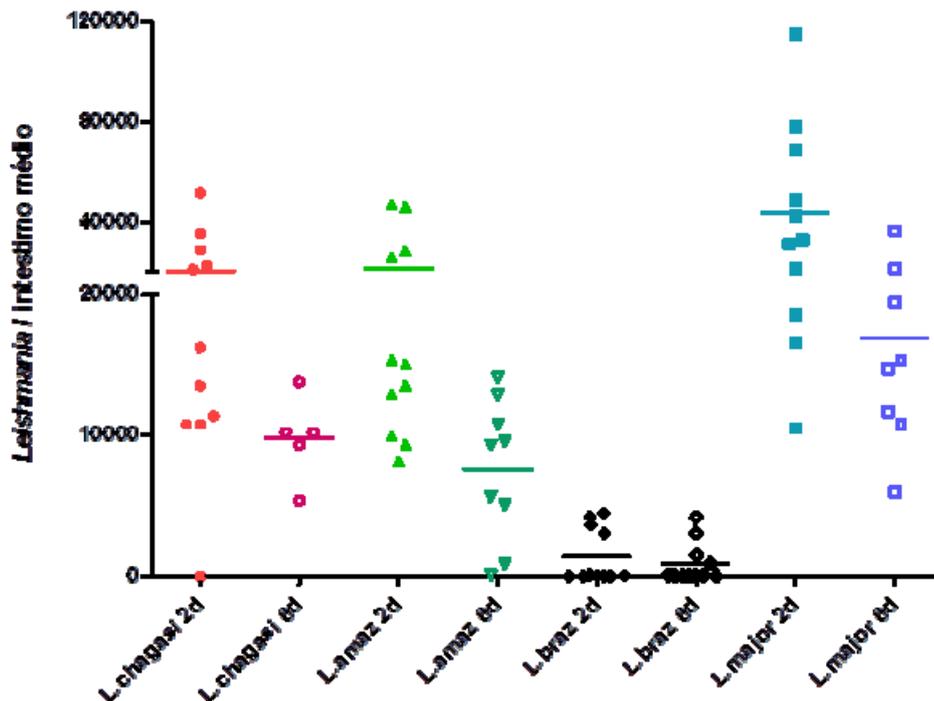
Seis dias após o repasto infectante, ou seja, após a completa digestão sanguínea, *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de desenvolver e/ou suportar a infecção apenas por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Assim como no segundo dia após a infecção, as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram um média de infecção similar (10.000 parasitos por inseto), enquanto a *L. (L.) major* apresentou o maior índice de infecção (média de 18.000 parasitos por inseto). O vetor não foi capaz de suportar a infecção por *L. (V.) braziliensis*, que apresentou média de 1.000 *Leishmania* / flebotomíneo. (Figura 9)



**Figura 9:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

Quando comparamos os dias de análise (segundo e sexto dias), podemos observar que todas as espécies analisadas apresentaram um decréscimo na média de infecção, sendo a diferença significativa somente nas infecções com *L. (L.) amazonensis* ( $P = 0,0072$ ) e *L. (V.) braziliensis* ( $P = 0,0025$ ). A espécie *L. (L.) major* apresentou o maior índice de infecção em ambos os dias, enquanto a *L. (V.) braziliensis* apresentou o menor índice. (Figura 10)

Foram dissecados 77 flebotomíneos nos dois dias da análise da infecção experimental e apenas 22% apresentaram-se negativos, 78% dos insetos dissecados estavam positivos.

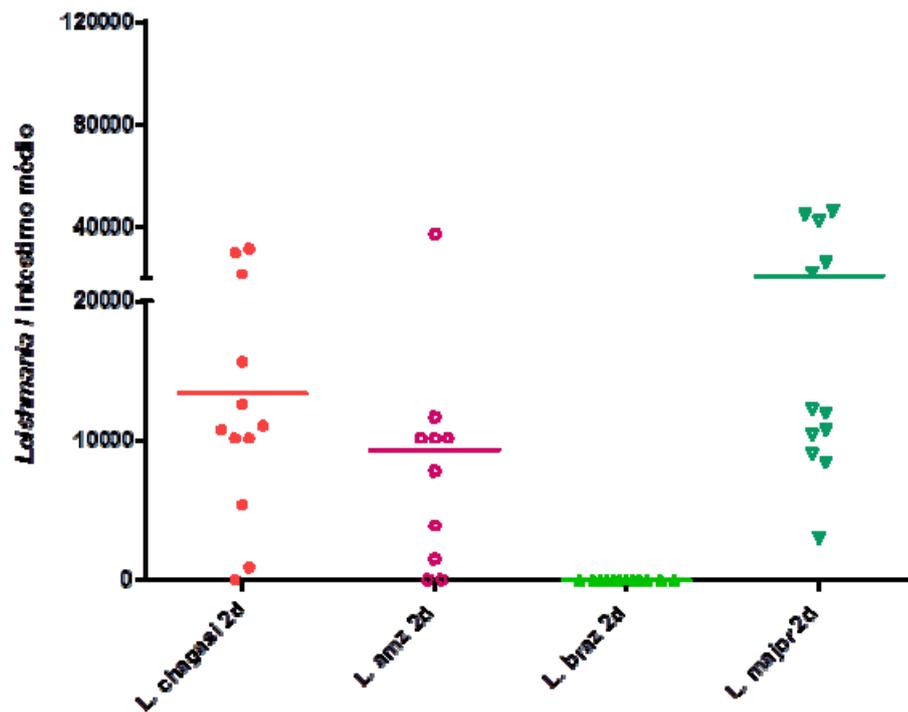


**Figura 10:** Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

## 5.2 Infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis* com dose de $2 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue

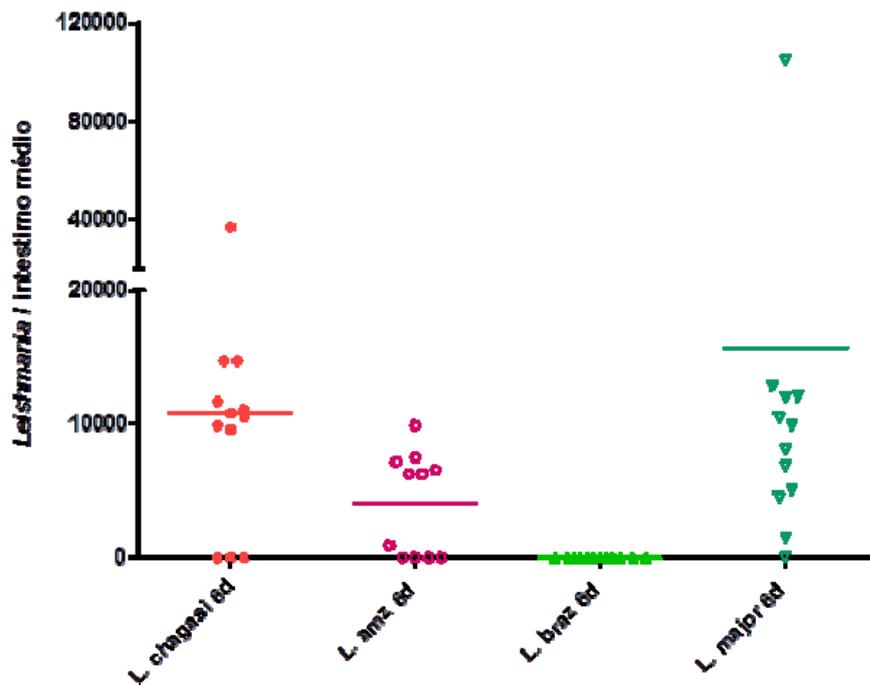
Os experimentos foram realizados em duplicata e uma média de 150 flebotomíneos (por espécie de parasito) foi utilizada em cada infecção experimental. Em média, 60% das fêmeas se alimentaram durante a infecção experimental.

No segundo dia após o repasto infectante, as espécies estudadas desenvolveram-se bem no *Lu. (L.) longipalpis*, com exceção da espécie *L. (V.) braziliensis*. *L. (L.) chagasi* apresentou uma média de infecção de 12.000 parasitos por inseto, *L. (L.) amazonensis* apresentou uma média de infecção de 10.000 parasitos por inseto e *L. (L.) major* apresentou o maior índice de infecção (média de 22.000 parasitos por inseto). A espécie *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver no vetor, como mostra a figura abaixo. (Figura 11)



**Figura 11:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $2 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

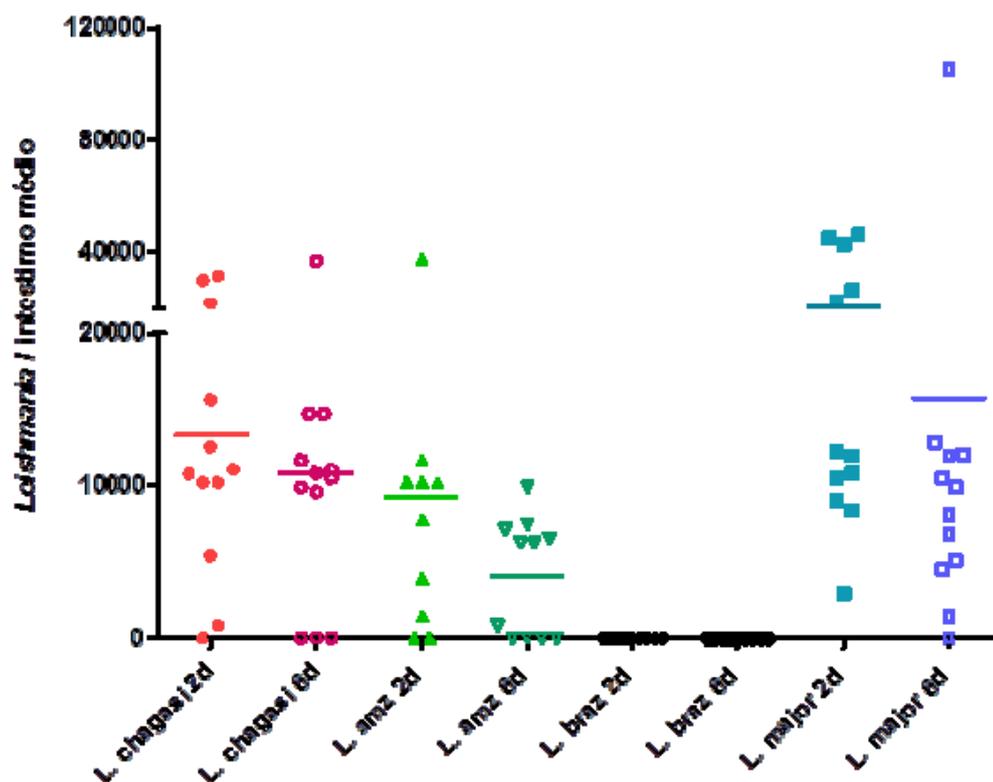
Seis dias após o repasto infectante, ou seja, após a completa digestão sanguínea, *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de desenvolver e/ou suportar a infecção por *L. (L.) chagasi* (média de 10.000 parasitos por inseto), *L. (L.) amazonensis* (média de 4.000 parasitos por inseto) e *L. (L.) major*, que apresentou o maior índice de infecção (média de 15.000 parasitos por inseto). O vetor não foi capaz de suportar a infecção por *L. (V.) braziliensis*. (Figura 12)



**Figura 12:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $2 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

Quando comparamos os dias de análise (segundo e sexto dias), podemos observar que todas as espécies analisadas apresentaram um decréscimo na média de infecção, porém nada significativo. A espécie *L. (L.) major* apresentou o maior índice de infecção em ambos os dias, enquanto a *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver no vetor em ambos os dias. (Figura 13)

Foram dissecados 94 flebotomíneos nos dois dias da análise da infecção experimental, 38% apresentaram-se negativos e 62% dos insetos dissecados estavam positivos.

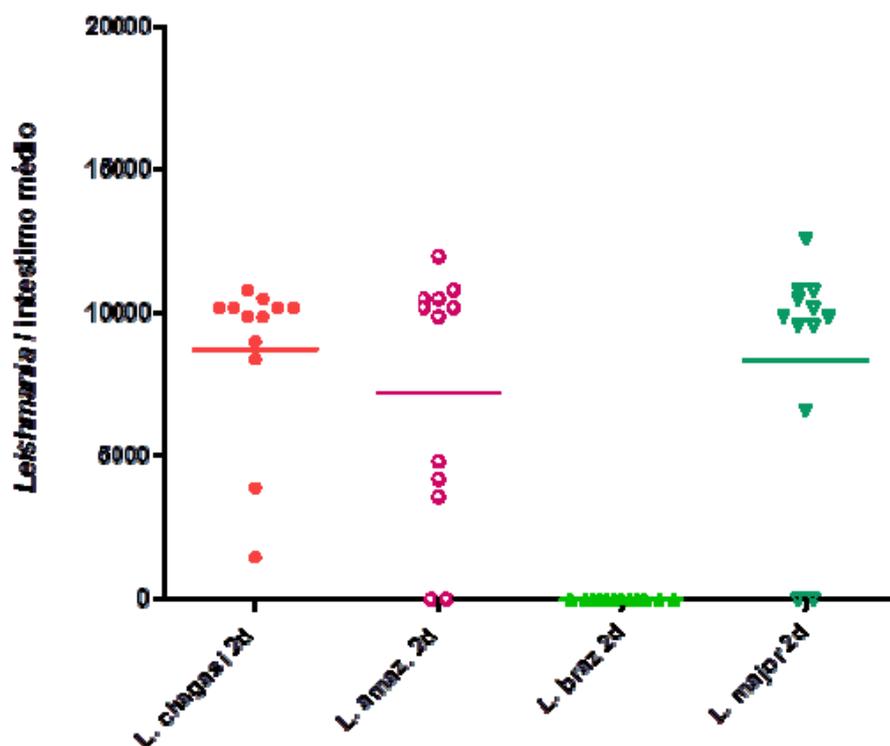


**Figura 13:** Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de  $2 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

### 5.3 Infecção experimental de *L. (L.) longipalpis* com dose de $1 \times 10^7$ parasitos por mL de sangue

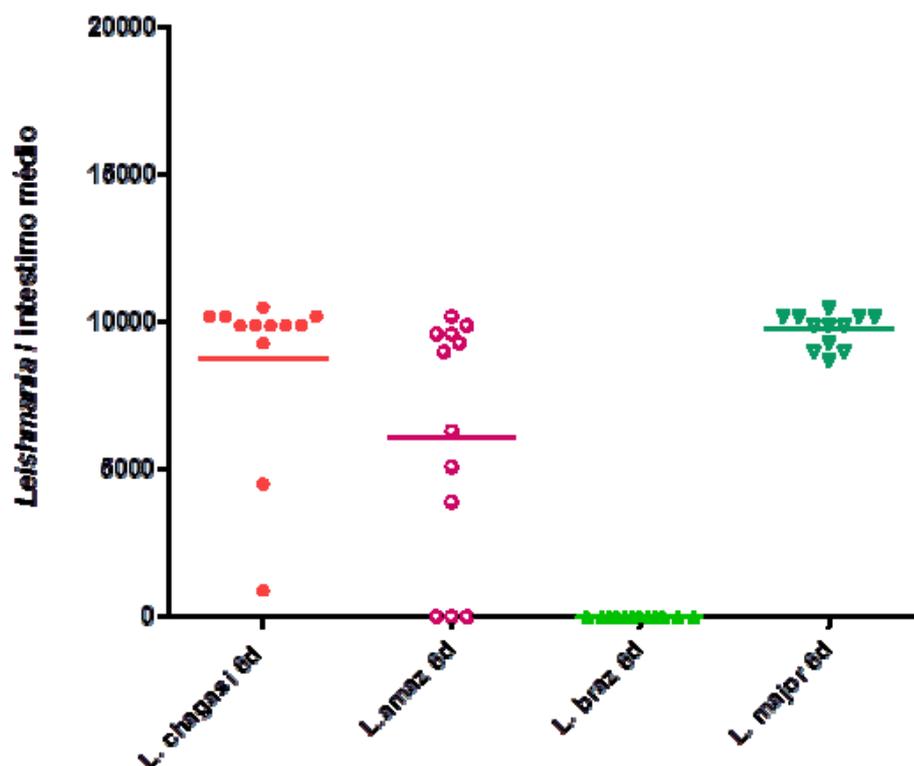
Os experimentos foram realizados em duplicata e uma média de 150 flebotomíneos (por espécie de parasito) foi utilizada em cada infecção experimental. Em média, 60% das fêmeas se alimentaram durante a infecção experimental.

No segundo dia após o repasto infectante, as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major* apresentaram uma média de 9.000 parasitos por inseto. *L. (L.) amazonensis* apresentou uma média de 8.000 parasitos por inseto e a *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver, como mostra a figura abaixo. (Figura 14)



**Figura 14:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

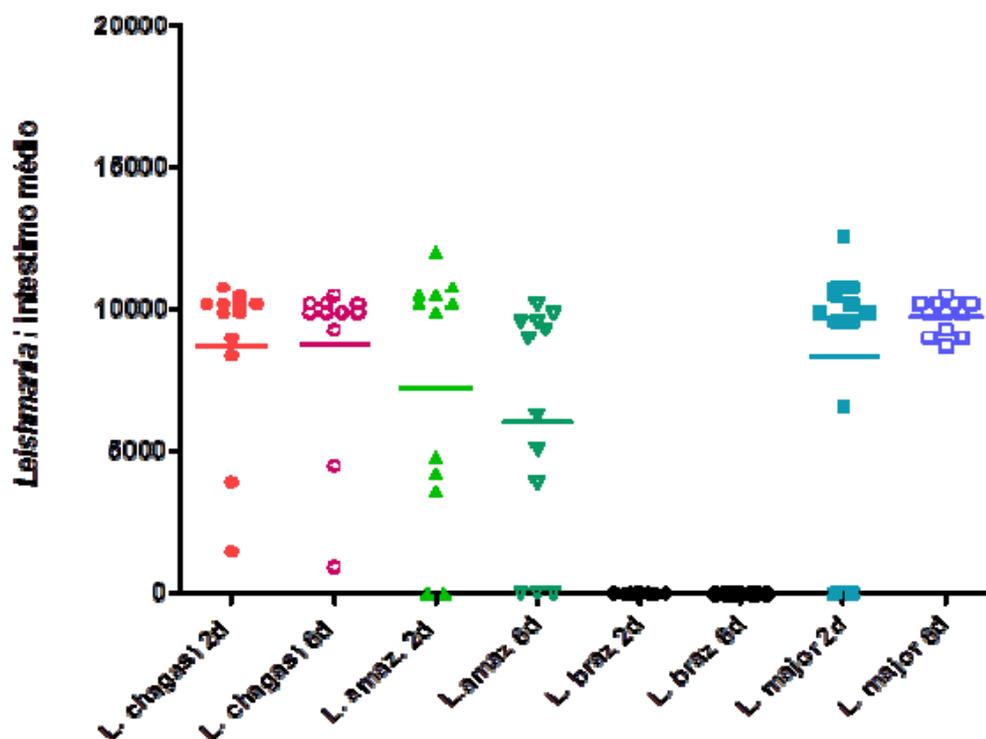
Seis dias após o repasto infectante, ou seja, após a completa digestão sanguínea, *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de desenvolver e/ou suportar a infecção por *L. (L.) chagasi* (média de 9.000 parasitos por inseto), *L. (L.) amazonensis* (média de 7.000 parasitos por inseto) e *L. (L.) major*, que apresentou o maior índice de infecção (média de 10.000 parasitos por inseto). O vetor não foi capaz de suportar a infecção por *L. (V.) braziliensis*. (Figura 15)



**Figura 15:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* seis dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

Quando comparamos os dias de análise (segundo e sexto dias), podemos observar que todas as espécies analisadas apresentaram um índice de infecção bastante similar em ambos os dias. *L. (L.) amazonensis* apresentou um pequeno decréscimo, enquanto *L. (L.) major* apresentou um pequeno aumento no sexto dia após a infecção, porém estas diferenças não foram significativas. A espécie *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver no vetor em ambos os dias. (Figura 16)

Foram dissecados 77 flebotomíneos nos dois dias da análise da infecção experimental, 32% apresentaram-se negativos e 68% dos insetos dissecados estavam positivos.

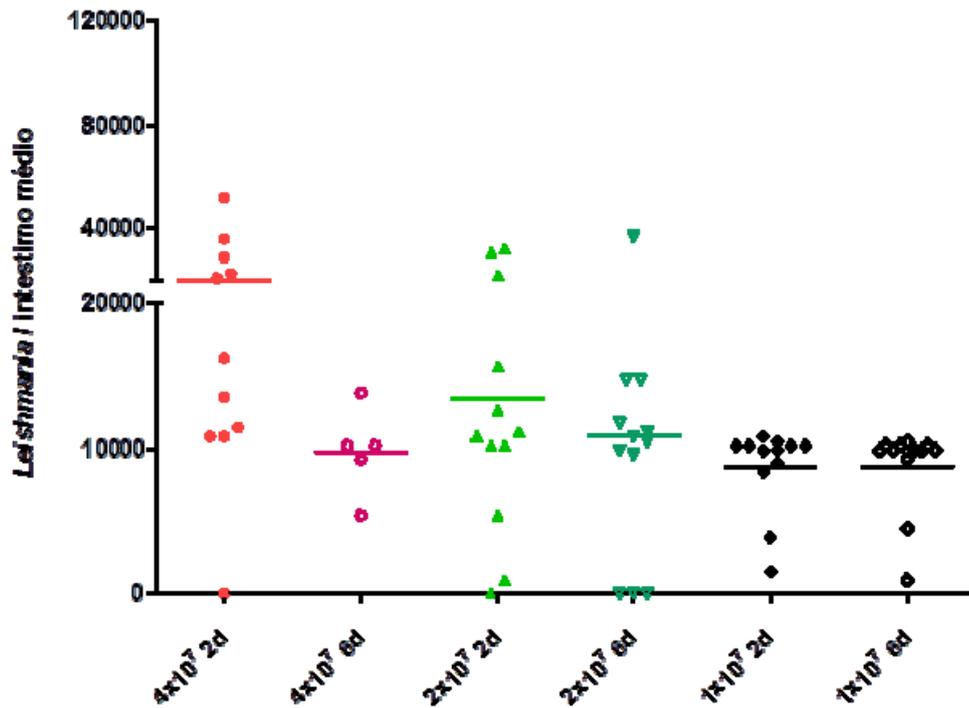


**Figura 16:** Gráfico comparativo da densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* no período de dois e seis dias após infecção artificial, utilizando uma concentração de  $2 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

#### 5.4 Avaliação do índice de infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania*

##### 5.4.1 Avaliação do índice de infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania (L.) chagasi*

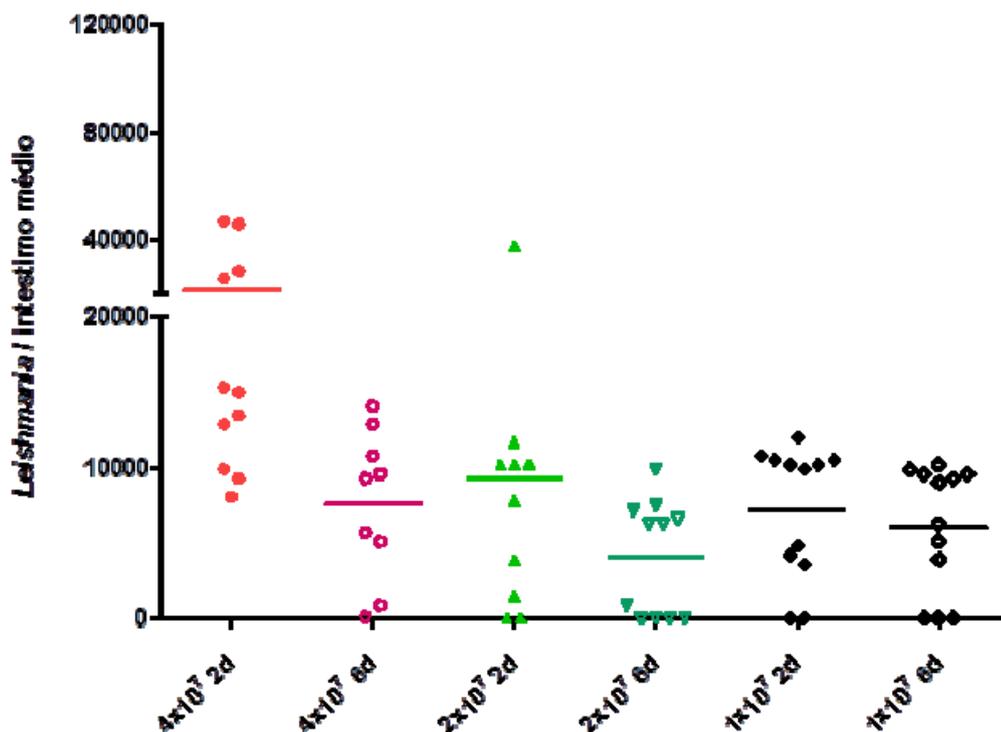
Quando comparamos todas as doses utilizadas, em ambos os dias de análise, podemos observar que a infecção com *L. (L.) chagasi* apresentou o maior índice de parasitos quando a maior dose foi usada, porém no sexto dia esse número teve um decréscimo. Em relação à dose intermediária a taxa de infecção se manteve relativamente constante entre os dias analisados, com uma média de 11000 parasitos por intestino médio. A menor dose manteve uma taxa também muito parecida, quando comparados o segundo e sexto dia, apresentando pouca ou nenhuma variação. Todas as variações na média de parasitos não apresentaram diferença significativa. (Figura 17)



**Figura 17:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) chagasi* em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

#### 5.4.2 Avaliação do índice de infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania (L.) amazonensis*

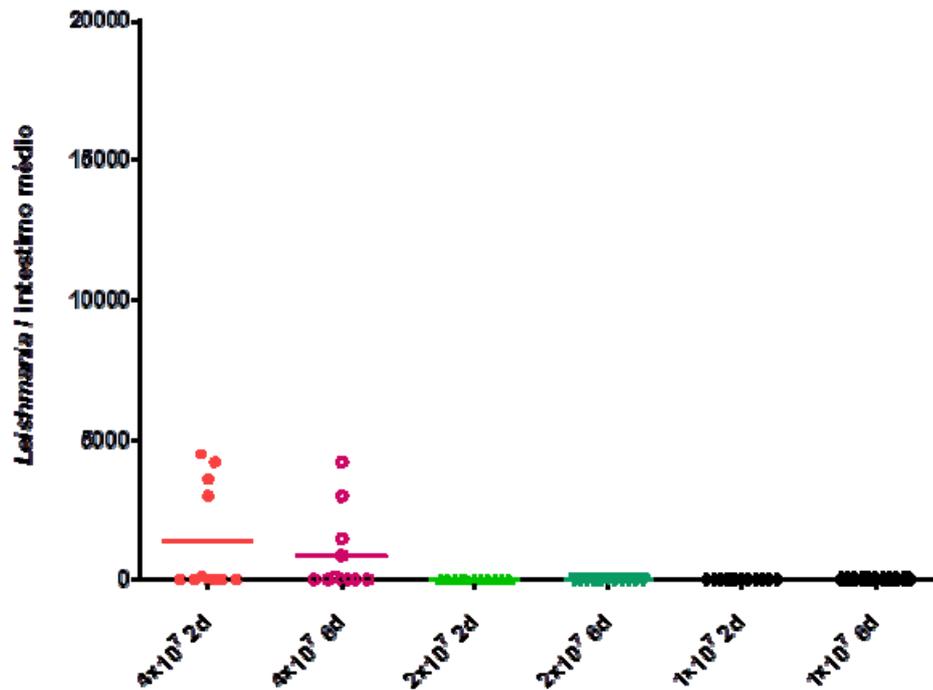
Quando comparamos todas as doses utilizadas, em ambos os dias de análise, podemos observar que a infecção com *L. (L.) amazonensis* apresentou o maior índice de parasitos quando a maior dose foi usada, porém no sexto dia esse número caiu drasticamente, com uma diferença significativa ( $P = 0,0146$ ). Em relação à dose intermediária a taxa de infecção apresentou um pequeno decréscimo do segundo para o sexto dia, mas sem diferença significativa. A menor dose manteve uma taxa também muito parecida, quando comparados o segundo e sexto dia, apresentando pouca ou nenhuma variação. (Figura 18)



**Figura 18:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) amazonensis* em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

#### 5.4.3 Avaliação do índice de infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania (V.) braziliensis*

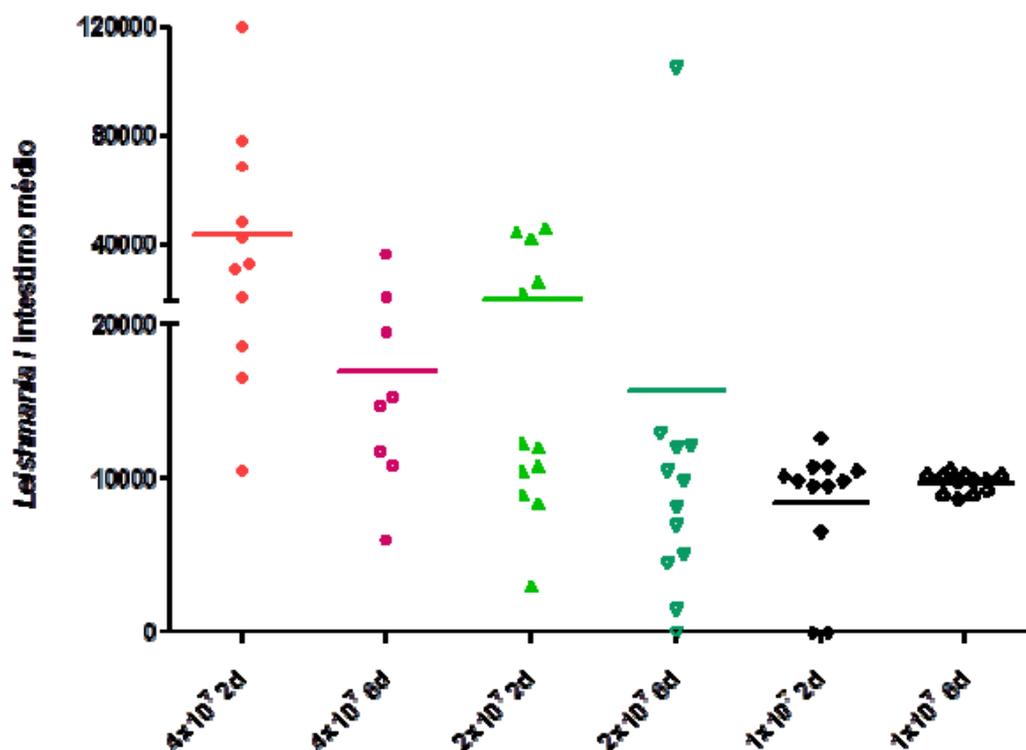
Quando comparamos todas as doses utilizadas, em ambos os dias de análise, podemos observar que a infecção com *L. (V.) braziliensis* não foi bem sucedida em nenhuma dose utilizada. Apenas na dose mais alta o parasito foi capaz de infectar o *Lu. (L.) longipalpis*, porém com um índice de infecção muito baixo. Nas demais doses, *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver no vetor. (Figura 19)



**Figura 19:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (V.) braziliensis* em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

#### 5.4.4 Avaliação do índice de infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis*, utilizando diferentes concentrações de *Leishmania (L.) major*

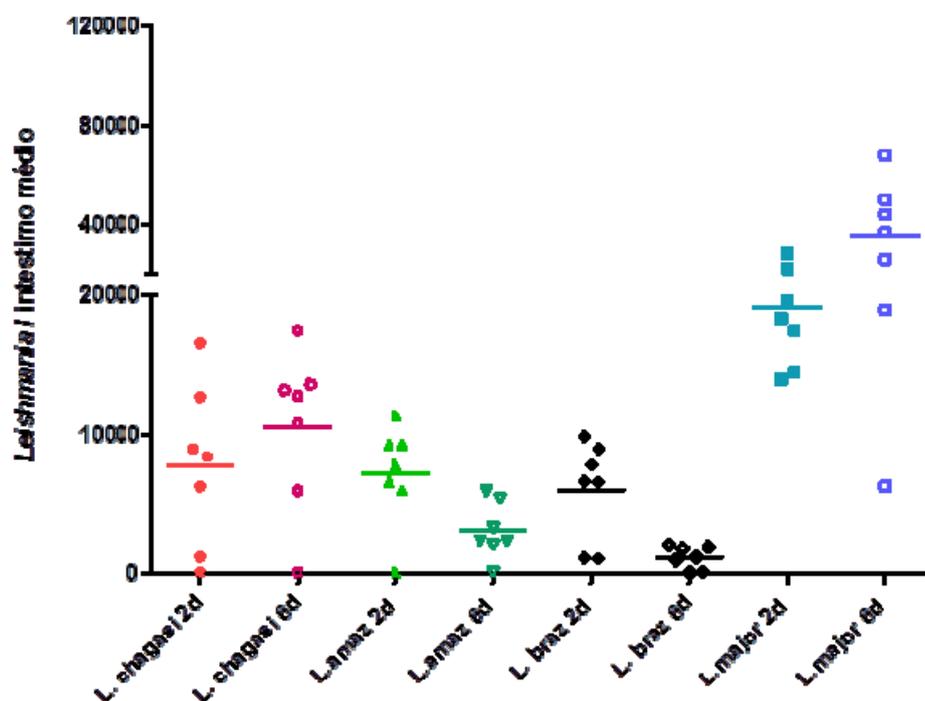
Quando comparamos todas as doses utilizadas, em ambos os dias de análise, podemos observar que a infecção com *L. (L.) major* apresentou o maior índice de parasitos quando a maior dose foi usada, porém no sexto dia esse número caiu drasticamente. Em relação à dose intermediária a taxa de infecção foi maior no segundo dia, apresentando uma queda no sexto dia. A menor dose manteve uma taxa de infecção relativamente parecida, quando comparados o segundo e sexto dia, apresentando pouca variação. Todas as variações na média de parasitos não apresentaram diferença significativa. (Figura 19)



**Figura 20:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) major* em diferentes doses de parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

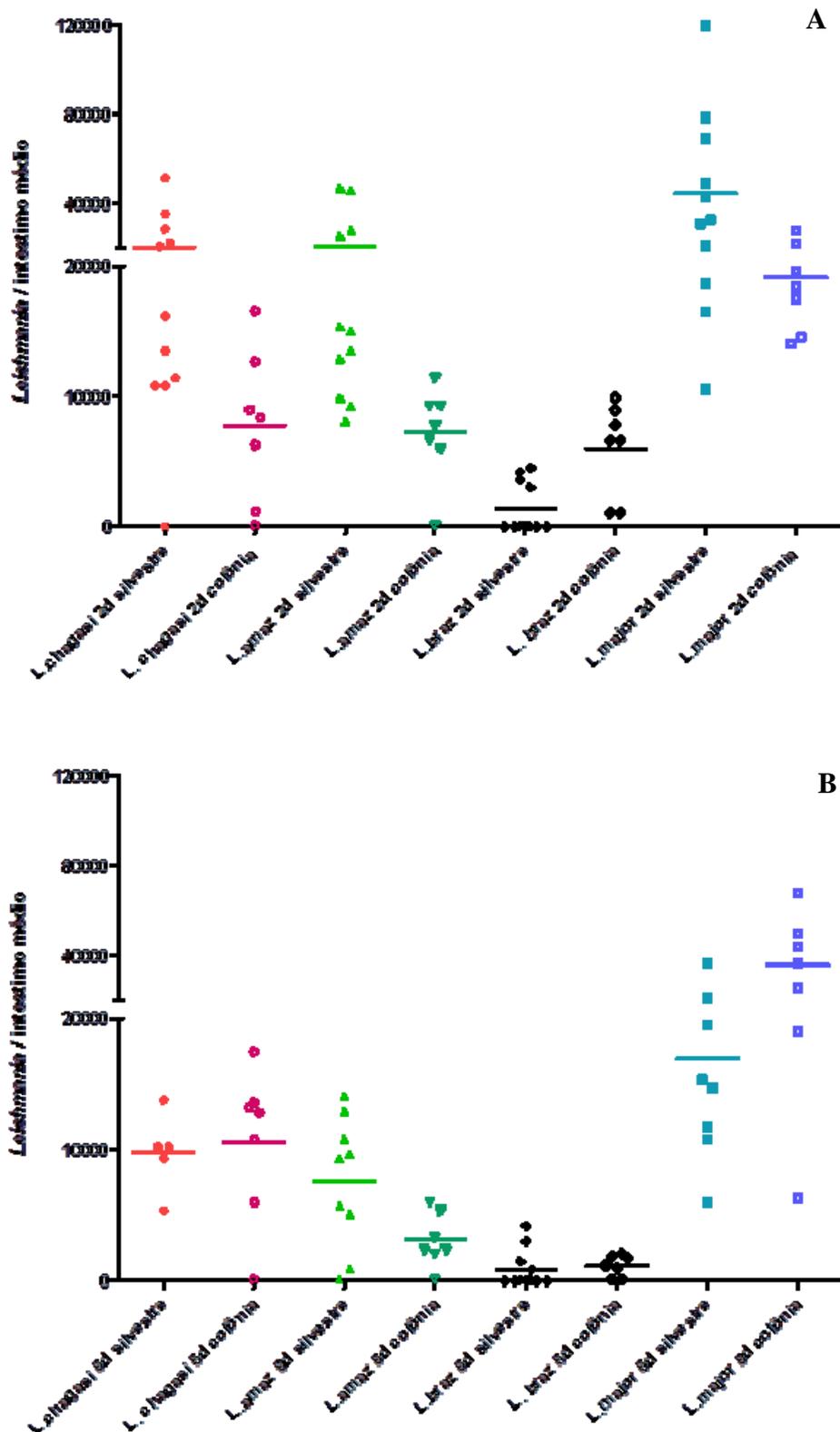
### 5.5 Avaliação da “permissibilidade” de *Lu. (L.) longipalpis* a diferentes espécies de *Leishmania* em insetos colonizados

Foram utilizados cerca de 100 insetos por cepa em cada experimento e o mesmo foi repetido três vezes. Todas as infecções foram feitas ao mesmo tempo e utilizando uma dose de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Analisando os resultados foi possível observar que todas as espécies de *Leishmania* desenvolveram-se bem no *Lu. (L.) longipalpis*, ou seja, mesmo no sexto dia quando o processo de digestão foi finalizado, observamos a re-colonização do intestino. No segundo dia após a infecção experimental, todas as espécies estudadas apresentaram uma média de 9000 parasitas, com exceção de *L. (V.) braziliensis* que apresentou uma média de 6000 parasitas. Entretanto no sexto dia foi possível observar que *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* diminuíram significativamente a média de infecção para 3000 parasitos ( $p = 0,0072$ ) e 1000 ( $p = 0,0011$ ), respectivamente. (Figura 21)



**Figura 21:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*, de colônia, infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* dois dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

Quando comparamos os dados obtidos nas infecções de *Lu. (L.) longipalpis* silvestres e de colônias podemos observar que no segundo dia após o repasto infectivo, os insetos silvestres apresentaram o maior índice de infecção, com exceção de *L. (V.) braziliensis*. A diferença na média do índice de parasitos foi significativa nas infecções com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 22A). Já no sexto dia, os insetos de colônia apresentaram maior índice de parasitos nas infecções com *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*. A diferença na média do índice de parasitos foi significativa nas infecções com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (Figura 22B).



**Figura 22:** Densidade de parasitos no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*, silvestres e de colônia, infectados com *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* (A) dois dias e (B) 6 dias após a infecção experimental, utilizando uma concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos por mL de sangue. Cada ponto representa um inseto.

## 6 DISCUSSÃO

Os estudos em laboratório que examinam o desenvolvimento de diferentes *Leishmania* em uma variedade de espécies de flebotomíneos sugerem que os flebotomíneos se dividem em dois grupos. Certas espécies são vetores específicos e refratários ao desenvolvimento da maioria das espécies de *Leishmania*, enquanto outras espécies são permissivas ao desenvolvimento de uma ampla gama de espécies de *Leishmania*. (Myskova *et al* 2007) Acreditamos que as condições experimentais, principalmente aquelas utilizando um número excessivo de parasitos na infecção experimental, é o que permite um desenvolvimento “artificial” dos parasitos. Até o momento, de acordo com a literatura e o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo focalizando a competência vetorial do *Lu. (L.) longipalpis* utilizando diferentes concentrações de parasito. A maioria dos estudos visando caracterizar o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes espécies de flebotomíneos foi desenvolvida com espécies do Velho Mundo e com altas doses parasitárias. (Walters *et al.* 1993; Pimenta *et al.* 1994a, 1994b; Kamhawi *et al* 2000; Sacks & Kamhawi, 2001; Sadlova *et al.* 2003; Myskova *et al* 2007; Volf & Myskova, 2007; Svárovská *et al.* 2010, Secundino *et al.* 2010).

A história da epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Brasil tem mostrado um papel constante para *Lu. (L.) longipalpis* como um elo essencial na cadeia de transmissão. A sua capacidade de se alimentar com frequência em animais domésticos e sinantrópicos, bem como sua antropofilia notável, favorecem o *Lu. (L.) longipalpis* em sua adaptação a ambientes modificados, permitindo a manutenção do ciclo de transmissão da Leishmaniose Visceral no meio rural e sua disseminação para áreas urbanizadas, levando assim a transmissão de perfis diferenciados. É importante ressaltar que há uma necessidade de acrescentar novos conhecimentos sobre a biologia de *Lu. (L.) longipalpis*, especialmente considerando os indicadores entomológicos, como a taxa de infecção e uma pesquisa sobre medidas de vigilância (Rangel & Vilela, 2008).

Durante nossas observações foi possível avaliar que quando usamos a maior dose ( $4 \times 10^7$ ), dose similar a usadas na maioria dos estudos, todas as espécies de *Leishmania* foram capazes de se desenvolverem no *Lu. (L.) longipalpis*. Porém, a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou um índice baixo de infecção. Utilizamos as demais doses ( $2 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$ ), observamos que o índice de infecção foi diminuindo para a maioria das espécies e *L. (V.) braziliensis* não foi capaz de infectar o vetor. Quando comparamos a capacidade do *Lu. (L.) longipalpis* de sustentar a infecção, utilizando  $4 \times 10^7$  e  $2 \times 10^7$ , foi possível observar que *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonenses* e *L. (L.) major* tiveram médias de aproximadamente 10000

parasitos no sexto dia, comportamento similar ao observado em outros flebotomíneos quando infectados experimentalmente com essas diferentes concentrações de parasitos, ou seja, a dose média é capaz de re-colonizar o intestino semelhante a dose maior (Sacks et al, 2000). Esses dados podem sugerir que em altas cargas parasitárias o *Lu. (L.) longipalpis* pode desenvolver um comportamento permissivo, mas que vai se perdendo à medida que essas doses vão simulando o número de parasitos que um flebotomíneo ingere na natureza durante um repasto sanguíneo.

Na natureza, os flebotomíneos tornam-se infectados com doses diferentes de parasitos dependendo de seu comportamento alimentar, concentração de parasitos na lesão ou sobre a qual fonte eles se alimentam. Em 2011, Stamper e colaboradores observaram que os grupos de flebotomíneos infectados com doses iniciais maiores de parasitos, tinham infecções mais pesadas e maior probabilidade de transmiti-los durante uma segunda tentativa de alimentação, causando uma doença mais grave quando a transmissão era bem sucedida. Este aumento da gravidade da doença é, provavelmente, devido a um maior inóculo transmitido pelo flebotomíneo mais fortemente infectado. Nas transmissões de flebotomíneos individuais analisados por Kimblin *et al.* 2008, houve uma correlação direta entre a intensidade das infecções intestinais e da dose transmitida.

A competência vetorial de *Lu. (L.) longipalpis* e *P. (P.) duboscqi* foi testada com *L. major* mutantes knockout deficientes em fosfoglicanos totais, juntamente com seus respectivos controles gene add-back. Os resultados confirmam que o LPG, a grande molécula de superfície celular de promastigotas de *Leishmania* conhecida por mediar a adesão no intestino médio do vetor, é necessária para evitar a perda da infecção durante a excreção do bolo fecal em *P. (P.) duboscqi*, vetor natural de *L. (L.) major*, mas não por *Lu. (L.) longipalpis*, vetor não natural (Secundino et al, 2010). Ainda não se sabe as moléculas responsáveis pela interação do “vetor permissivo” com o parasito, mas é importante destacar que a adesão do parasito ao epitélio intestinal do vetor é o ponto crucial para a progressão da infecção e se essa etapa falhar, o ciclo de vida do parasito fica comprometido. Nossos dados demonstraram que seis dias após a infecção experimental, quando o sangue já foi totalmente digerido, parasitos ainda estavam presentes no intestino médio do vetor. Isso sugere que as espécies de *Leishmania* foram capazes de se aderirem ao epitélio intestinal do *Lu. (L.) longipalpis* e não serem eliminados após a digestão do bolo alimentar. Porém, alguns decréscimos no número de parasitos foram observados, devido à eliminação daqueles parasitos que não conseguiram sobreviver a essa etapa do ciclo de vida. Esse decréscimo no índice da infecção é normal durante o processo de colonização do trato digestório do flebotomíneo, demonstrado também por Nieves & Pimenta, 2000 e Secundino et. al; 2005. O

alto índice de parasitos encontrados no segundo dia após a infecção experimental pode ser atribuído, principalmente, pela presença de sangue no intestino médio do vetor. O sangue, que não foi totalmente digerido, funciona como um meio de cultura e favorece o desenvolvimento dos parasitos.

Em 2011, Darwish e colaboradores estudaram a competência vetorial de *Phlebotomus (P.) papatasi* por duas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*. Os autores observaram que a taxa de infecção com *L. (L.) major*, par natural, foi significativamente mais elevada do que com *L. (L.) tropica*. Nossos resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa entre o par natural de *L. (L.) longipalpis* e as demais espécies de *Leishmania*, porém, assim como os nossos resultados não mostrados, o vetor não foi capaz de transmitir através da picada a espécie não natural ao vertebrado mamífero.

*Leishmania (V.) braziliensis* não foi capaz de se desenvolver no vetor, principalmente quando utilizamos as menores doses de parasitos. Acreditamos que esse fato pode estar atribuído ao diferente comportamento de colonização do trato digestório do flebotomíneo que o subgênero *Viannia* apresenta. Promastigotas de espécies com desenvolvimento suprapilárico (subgênero *Leishmania*) se aderem ao epitélio do intestino médio através da inserção do flagelo entre as microvilosidades. Já as promastigotas de espécies com desenvolvimento peripilárico (subgênero *Viannia*) inicialmente ficam restritas ao intestino posterior, principalmente o triângulo pilórico, e depois migram para a região anterior do intestino e se aderem ao epitélio intestinal (Lainson & Shaw, 1979). Considerando esse fato, acreditamos que *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (V.) braziliensis* não foram capazes de manter a infecção, pois essa espécie não conseguiu colonizar a parte anterior do trato digestório do vetor. O desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em *Lutzomyia (L.) migonei* foi comparado, por Nieves & Pimenta, 2000, ao estudar os microhabitats do parasito no trato alimentar do vetor, a sequência de alterações morfológicas do parasito que levam ao processo de metaciclogênese e a transmissão do mesmo ao hospedeiro vertebrado. Os autores observaram que *L. (L.) amazonensis* desenvolveu uma taxa de infecção maior e o típico comportamento peripilárico de *L. (V.) braziliensis*, com uma invasão de órgãos diferentes do intestino e os tubos de Malpighi. Porém, diferente dos nossos dados de transmissão (Resultados não mostrados), ambas as espécies foram capazes de transmitir a doença ao vertebrado, sugerindo, então, que *Lu. (L.) migonei* possa ser um possível vetor para as duas espécies de *Leishmania*, que coexistem em extensas áreas geográficas.

Apesar das demais espécies serem capazes de infectar o *Lu. (L.) longipalpis*, podemos considerar que elas não são capazes de transmitir a doença ao vertebrado mamífero, uma vez

que nenhum camundongo exposto à picada do flebotômíneo infectado com essas espécies apresentaram sintomas ou sinais da doença (Resultados não mostrados). O não sucesso da transmissão da doença pode estar atribuído à falha durante a etapa de adesão ao epitélio do intestino médio, migração para o intestino anterior ou diferenciação na fase metacíclica infecciosa do parasito. A adesão é uma parte essencial do ciclo de vida da *Leishmania*, pois permite que o parasito não seja expulso do intestino médio, quando o bolo fecal é eliminado pelo flebotômíneo. O seu sucesso como vetor é dependente da habilidade do parasito de se adaptar e se relacionar com as distintas situações existentes nos microhabitats do trato alimentar, inclusive sua diferenciação da forma infectiva e transmissão aos vertebrados (Molyneux et al, 1974). Sendo assim, qualquer falha nessas etapas pode impedir a transmissão do parasito durante o próximo repasto sanguíneo. Para melhor entendimento de todo o processo da interação do *Lu. (L.) longipalpis* e as diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas no projeto, estudos e experimentos mais detalhados devem ser feitos para elucidar esses pontos cruciais para o ciclo de vida do parasito e compreender como as espécies que não são encontradas infectando naturalmente o *Lu. (L.) longipalpis* se comportam no vetor.

O número de estudos que utilizam a transmissão experimental de *Leishmania* pela picada do vetor, incluindo as evidências de transmissão viável, é escassa. Isto é devido, pelo menos em parte, pela imprevisibilidade da transmissão do parasito pela picada do flebotômíneo, agravado pela falta de informações sobre os parâmetros de infecção que influenciam a transmissão. Estudos utilizando *P. (P.) dubosqi* de colônia infectados com *L. (L.) major* demonstraram uma média de  $10^2$  a  $10^5$  parasitos por intestino, dependendo da dose de parasitos usadas para a infecção. Resultados semelhantes foram relatados após a infecção experimental de *Lu. (L.) longipalpis* com *L. infantum* e com *L. mexicana*. Nós sabemos que não há dados publicados sobre a frequência de promastigotas metacíclicas dentro de flebotômíneos capturados naturalmente infectados. Portanto, só podemos especular que flebotômíneos infectados com *Leishmania*, que contêm na faixa de  $10^3$ - $10^6$  parasitos totais por intestino e altas frequências de promastigotas metacíclicas, aproximam-se do estado de infecção de transmissão de flebotômíneos na natureza (Stamper et al, 2011).

Na literatura atual os trabalhos sobre competência vetorial e o efeito da saliva do vetor na exacerbação ou proteção contra a infecção por *Leishmania* têm sido desenvolvidos com vetores colonizados em laboratório. O sucesso da colonização de importantes vetores tais como *Lu. (L.) longipalpis*, *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) dubosqi* propiciaram um vasto conhecimento nesta área. Entretanto, mais recentemente nosso grupo, utilizando o modelo murino, demonstrou significativas diferenças no efeito de exacerbação causado por lisados de glândulas salivares de *Lu. (L.) longipalpis* criados em laboratório (colonizados) ou capturados

no campo (silvestres) (Laurenti *et al.*, 2009a, 2009b). Quando co-inoculada com parasitos, a saliva dos flebotomíneos colonizados apresentou um efeito de exacerbação mais forte, causando lesões duas vezes maiores do que aquelas provocadas pela inoculação dos parasitos com saliva de flebotomíneos capturados no campo. Além disso, foi sugerido que a saliva dos insetos capturados no campo não possui os mesmos fatores quimiotáticos verificados na saliva de flebotomíneos colonizados. A composição e quantidade de proteínas observadas na saliva dos dois grupos também foram substancialmente diferentes (Laurenti *et al.*, 2009a). Em outro trabalho, os mesmos autores sugeriram que essa diferença poderia explicar o menor efeito na modulação da infecção por *Leishmania* observado em camundongos co-inoculados com parasitos e saliva de flebotomíneos do campo, quando comparados àqueles co-inoculados com parasitos e saliva de flebotomíneos colonizados (Laurenti *et al.*, 2009b). Nos hipotetizamos, então, que também poderíamos observar diferenças em relação à competência vetorial entre os flebotomíneos de campo e colônia e, para comparar este fato, utilizamos a dose com maior concentração de parasitos para os experimentos.

Em relação à diferença entre insetos de colônia e silvestres, foi observado que ambos respondem de maneira semelhante quando confrontados com a infecção por diferentes *Leishmanias*. Através dessas observações, podemos afirmar que as espécies se comportam de maneira similar e que a origem dos insetos não parece influenciar na interação entre o *Lu. (L.) longipalpis* e as espécies de *Leishmania*. Essa observação indica que novos experimentos poderão ser realizados com insetos de colônia, o que é um método de cultivo simples e mais fácil de ser controlado, quando comparado a captura de insetos na natureza, sem que haja prejuízo ou uma alteração significativa durante a coleta e análise dos dados.

## 7 CONCLUSÕES

- I. A maior dose utilizada para a infecção ( $4 \times 10^7$ ) permite o desenvolvimento de todas as espécies de *Leishmania*;
- II. O número excessivo de parasitos favorece ( $4 \times 10^7$ ), em condições experimentais, o desenvolvimento artificial em *Lu. (L.) longipalpis*;
- III. A dose média ( $2 \times 10^7$ ) apresenta um desenvolvimento similar, índice de parasitos, quando comparado a maior dose ( $4 \times 10^7$ );
- IV. A dosagem média também favorece, com exceção de *L. (V.) braziliensis*, o desenvolvimento artificial em *Lu. (L.) longipalpis* e não representa o que realmente acontece na natureza durante a interação parasito-vetor;
- V. A menor dose utilizada para a infecção ( $1 \times 10^7$ ) não permite altas taxas de desenvolvimento parasitário em *Lu. (L.) longipalpis*;
- VI. A dose de  $1 \times 10^7$  é a que mais representa o que realmente acontece na natureza durante a interação parasito-vetor;
- VII. A presença de parasitos no intestino médio do vetor no sexto dia após a infecção experimental indica uma infecção permanente;
- VIII. *Leishmania (L.) chagasi*, par natural de *Lu. (L.) longipalpis* desenvolve-se bem em todas as doses utilizadas e em todos os dias analisados, validando o processo de infecção experimental;
- IX. *Lutzomyia (L.) longipalpis* só é susceptível ao desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* quando utiliza-se a maior dose ( $4 \times 10^7$ ), porém com baixa taxa de infecção;
- X. *Leishmania (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, apesar de não ser o par natural de *Lu. (L.) longipalpis*, são capazes de desenvolver no vetor em todas as doses utilizadas.

- XI. *Leishmania (L.) major* apresenta um índice de infecção maior e demonstra uma maior afinidade com o *Lu. (L.) longipalpis*;
- XII. Insetos de colônia são capazes de suportar a infecção com todas as espécies de *Leishmania*, porém, *L. (V.) braziliensis* apresenta uma média de parasitos baixa no sexto dia.

## 8 ANEXO

Artigo publicado em 2012 na Parasites & Vectors intitulado: **The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two diferente vertebrates**, no qual colaborei nos experimentos durante o período em que fui aluna de mestrado.

## 9 REFERÊNCIAS

Andrade AF, Saraiva EM. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 1999 Jul; 85 (7):576-81.

Ashford RW. A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. *Parassilologia*; a JJ 1991.

Aslan H, Dey R, Meneses C, Castrovinci P, Jeronimo SM, Oliva G, Fischer L, Duncan RC, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Kamhawi S. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. *J Infect Dis.* 2013 Apr 15;207(8):1328-38. doi: 10.1093/infdis/jis932. Epub 2013 Jan 3.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64:1-109.

Bates, PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007 Aug;37(10):1097-106. Epub 2007 Apr 18.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998; 188:1941-53.

Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DL, Ribeiro JM. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(12):6704–9.

Bofill D, Vilaseca J, Zaera L., Grau A 1985. La Leishmaniasis. *Med Integ* 6:337-344.

Borovsky D, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol.* 1987 Jul;1(3):235-42.

Brazil RP, Oliveira MO. Parthenogenesis in the sand fly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol* 1999; 13:463-4.

Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL. Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania* major lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20573-9.

Chapman, R.F. *The Insects. Structure and Function*, 3rd ed. Hodder and Stoughton, London 1982.

Chapman RF. Structure of the digestive system. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (ed. GA Kerkut & LI Gilbert). Oxford. Pergamon Press. 1985, vol. 4 165-205

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib, H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral Leishmaniasis: what are the need for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:S7-S16.

Darwish AB, Tewfick MK, Doha SA, Abo-Ghaila AH, Soliman BA. Vectorial competence of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to transmit two old world *Leishmania* species: *Leishmania major* and *L. Tropica*. *J Egypt Soc Parasitol.* 2011 Dec;41(3):565-72.

Descoteaux A, Turco JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 341-52.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-18.

Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J MedEntomol* 1997; 34:719-28.

Forattini OP, 1973. Entomologia Médica. V.4ed. São Paulo: Edgard Blucher/ Universidade de São Paulo.

Gontijo NF, Almeida-Silva S, Costa FF, Mares-Guia ML, Williams P, Melo MN. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive, Glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* Development. Exp Parasitol 1998; 90:212-9.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches on disease control. Int J Parasitol 2005; 35:1169-80

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

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

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

Kamhawi S, Ortigão MR, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A Role for Insect Galectins in Parasite. Cell 2004; 119(3): 329-41.

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

Killick-Kendrick RR, Leaney AJ, Ready PD, Molyneux DH. *Leishmania* in Phlebotominae sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamster by bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. Proc R Soc Lond B 1977b; 196:105-15.

Killick-Kendrick R, Molyneux DH. Transmission of leishmaniasis by bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75:152-4.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4:1-24.

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

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Efen J, Lawyer P, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(29):10125-30.

Lainson R, Shaw JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: WHR Lumsden and DA Evans, *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 1-120.

Laurenti MD, Silveira VM, Secundino NF, Corbett CE, Pimenta PP. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol Int. 2009 Sep;58(3):220-6. doi: 10.1016/j.parint.2009.05.005. Epub 2009a May 18.

Laurenti MD, da Matta VL, Pernichelli T, Secundino NF, Pinto LC, Corbett CE, Pimenta PP. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Scand J Immunol. 2009b Oct;70(4):389-95. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02310.x.

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

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

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry. 1999 Aug 3;38(31):9813-23.

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

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

Molyneux DH, Lewis DH, Killick-Kendrick R, 1974. Aspects of the microecology of *Leishmania*. Colloques Internationaux du CNRS N° 239 Ecologie des Leishmanioses, pp. 31-41.

Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., Volf, P., 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microb. Infect. 9

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

Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia médica. 10 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan 1977.

Peters NS, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kiling N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. Science 2008; 321:970-4.

Pimenta, P.F.P.; Turco, S.T.; MC Conville, M.J.; Lawyer, P.G.; Perkins, P.V.; Sacks, D.L., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science, 256: 1812-1815

Pimenta P.F.P., Saraiva E.M., Rowton E, Mogi G.G., Garraway L.A., Beverley S.M., Turco S, Sacks D.L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Natl Acad Sci USA 1994a; 91: 9155-9.

Pimenta PF, Pinto da Silva P, Rangarajan D, Smith DF, Sacks DL. *Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. *Exp Parasitol*. 1994b Nov;79(3):468-79.

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

Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Sousa NA, Wermelinger ED. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992 Apr-Jun;87(2):235-8.

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

Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008 Dec;24(12):2948-52.

Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol*. 1997, 22:219-240.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430:463-7.

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

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

Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985 May;34(3):456-9.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Späth G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):406-11.

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

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

Sadlova J, Hajmova M, Volf P. *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania (L.) major* and *L. tropica*. *Med. Vet. Entomol* 2003;17:244–250.

Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992

Schlein Y. 1993. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*. Jul;9(7):255-8.

Schlein Y, Jacobson RL. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*. 1998 Nov; 117 ( Pt 5):467-73.

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

Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol*.2005, 42(6):928-938.

Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks D. 2010. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania (L.) major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol*. 2010 Jul;12(7):906-18

Secundino, N. F. C. ; Freitas, V.C. ; Pimenta, P. F. P. . A biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 1ed.: , 2011, v. 1, p. 90-101.

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

Stamper LW, Patrick RL, Fay MP, Lawyer PG, Elnaiem DE, Secundino N, Debrabant A, Sacks DL, Peters NC. Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5 (8):e1288 doi:10.1371/journal.pntd.0001288. Epub 2011 Aug 23.

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

Svobodová M, Bates PA, Volf P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Acta Trop*. 1997 Oct 14;68(1):23-35.

Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volf P 2010. *Leishmania* (L.) major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis*.

Titus RG, Ribeiro JM, 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today*. 1990 May;6(5):157-60.

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

Volf P, Palánová L. The relationship between protein content of the meal and **lectin** secretion in the midgut of *Phlebotomus duboscqi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996 Oct;90(5):567-70.

Volf P, Hajmova M, Sadova J, Votypka J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol* 2004; 34:1221-7.

Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.* 2007 Mar;23(3):91-2. Epub 2007 Jan 4.

Young, D.G; Perkins, P.V; Endris,R.G. A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 1981, 18: 446.

Young DG, Lawyer PG. 1987 *Current Topics in Vector Research* vol 4. Edited by Kerry F. Harris. New York, pp 29-69.

Young DG, Arias JR 1991. Phlebotomine sandflies in the Americas. PAHO. Technical Paper 33

Young DG, Duncan MA 1994. 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* 54: 1-881.

Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1989a; 41(3):295-317.

Walters, L.I., Irons, K.P., Chaplin, G., Tesh, R.B., 1993. Life cycle of *Leishmania* (L.) major (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia* (L.) longipalpis(Diptera: Psychodidae). *J. Med.Entomol.* 30, 699–7

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

Warburg A, Hamada GS, Schlein Y, Shire D. The effect of post-blood-meal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:926-30.

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 Jul 29;345(1312):223-30.

World Health Organization, 2013. Leishmaniasis: background information. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/en/). Acesso em de 07 de janeiro de 2014.