



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

AGNA CRISTINA GUIMARÃES

**Polimorfismos de lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania (Leishmania)*
major-like isoladas no Brasil e seu papel na interação com *Lutzomyia*
longipalpis e *Phlebotomus papatasi***

Belo Horizonte – MG

Fevereiro 2017

AGNA CRISTINA GUIMARÃES

**Polimorfismos de lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania (Leishmania)*
major-like isoladas no Brasil e seu papel na interação com *Lutzomyia*
longipalpis e *Phlebotomus papatasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Norma Melo

Colaborador: Dr. Petr Volf

Belo Horizonte – MG

Fevereiro 2017

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (GFP) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares e da Profa. Dra. Maria Norma Melo, em colaboração com o Laboratório de Biologia de Vetor do Departamento de Parasitologia da Universidade Charles, Praga, República Tcheca, coordenado pelo Dr. Petr Volf. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e Bolsa de Mestrado (2015/2017).

Dedico este trabalho à minha família
e a todos que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder o privilégio da vida e por ser quem eu sou. Pelos ensinamentos diários de bondade e amor. Pela minha saúde física e mental, por me ensinar a ser forte nos momentos difíceis, por todas as oportunidades profissionais que já surgiram em minha vida, pelas bênçãos e proteção. Sou imensamente grata por poder ler, escrever, gostar de estudar e conseguir transmitir o meu conhecimento para outras pessoas. Obrigada por ter chegado até aqui com humildade e muito trabalho!

Aos meus pais, Eunice e Anselmo, por terem me ensinado que as conquistas e realizações da vida acontecem devido ao nosso empenho, foco e dedicação. Por serem exemplos, por estarem presentes em todos os momentos, pelo incentivo, motivação, conselhos diante das tomadas de decisões e por depositarem tanto amor e cuidado em nossas relações.

Aos meus irmãos, Nian, Tássia e Alon, pela irmandade, pelos momentos felizes, pela compreensão dos momentos em que estive ausente em dedicação aos estudos, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo na busca de conquistas profissionais.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Soares, por ter acreditado no meu potencial antes mesmo da seleção de mestrado, pelos ensinamentos em Parasitologia e por ter me ajudado durante as etapas da seleção. Agradeço por ser um orientador presente, que expõem aos seus alunos as questões burocráticas e financeiras necessárias para a realização de um projeto de pesquisa, pelas recomendações, conselhos, por me ensinar com paciência à execução dos experimentos, por ser compreensivo quando algum experimento não tinha o resultado esperado, por me encorajar a buscar novos resultados, por me proporcionar uma vivência única em um laboratório no exterior e por oportunizar todas as condições necessárias para que eu possa seguir no caminho da ciência.

A minha co-orientadora Dra. Maria Norma Melo, primeiramente por ser uma professora de Protozoologia muito querida. Por ter confiado a mim, a continuação do projeto da sua ex-aluna de doutorado e proporcionado à realização dos objetivos previstos neste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, carinho e incentivo durante todo o processo.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por ser um programa influente na comunidade científica e me proporcionar todo subsídio necessário para realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos professores do Departamento de Parasitologia da UFMG, pelos ensinamentos tão valiosos em Entomologia, Helmintologia e Protozoologia, pelas experiências de vida acadêmica e científica que se tornaram uma inspiração, pelo carinho e atenção, em especial ao Prof. Dr. Walter Lima, Profa. Dra. Héliida Monteiro, Prof. Dr. Marcos Pezzi, Prof. Dr. Maurício Sant'Anna, Profa. Dra. Daniella Bartholomeu, Prof. Dr. Stefan Geiger e Prof. Dr. Ricardo Fujiwara. Obrigada por contribuírem com minha formação profissional.

A secretaria da Pós-graduação em Parasitologia, em especial as secretárias Sumara e Sibebe, pela organização e por sempre estarem dispostas em solucionar minhas dúvidas sobre as normas e regulamento da pós-graduação.

A Soraia, técnica e doutoranda do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia da UFMG, pelos valiosos ensinamentos em cultivo de *Leishmania*, recomendações e companheirismo durante a realização deste projeto.

Aos amigos que fiz durante a realização do mestrado, Letícia, Gabi, Jamila, Jennifer, Raquel, Eduardo e Wagner, pela amizade sincera construída em tão pouco tempo, por todos os momentos que passamos juntos, pela união do nosso grupo desde o início, sempre sentados nos mesmos lugares ao lado direito do auditório, por um ajudar o outro nos momentos difíceis, pela simplicidade, pelo respeito, companheirismo, apoio e conselhos. Nunca vou me esquecer dos momentos felizes que passamos durante o mestrado: estudos compartilhados na sala dos estudantes, a viagem para a fazenda do Prof. Walter (Jamila andando de cavalo pela primeira vez), as crises de riso durante as aulas de identificação de moscas (“mosquinhas”), o trabalho de campo em São Joaquim, o amigo oculto de havainas (ostentação), as comemorações de aniversário, os cafés da manhã na salinha dos estudantes, os almoços no bandeirão, o encontro de despedida da Jamila na casa da Lê e todas as conversas, risadas e momentos compartilhados. Amigos que nasceram do mestrado e tornaram-se parte da minha vida, recebam os meus sinceros agradecimentos!

Ao Laboratório de Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp e Trypanosoma cruzi (GFP) do CPqRR, por me proporcionar toda estrutura e materiais necessários para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas e amigos do GFP do CPqRR, pela disponibilidade em ajudar, sugestões para melhoria do projeto, pelos momentos de descontração e pelo auxílio durante toda caminhada.

A Paula Monalisa, pelos ensinamentos em glicobiologia e imunologia de *Leishmania*.

Aos colegas do grupo de Glicobiologia de *Leishmania*, Jerônimo, Larissa, Christiana e Tamara, por estarem sempre dispostos a ajudar, pela companhia na execução dos

experimentos, pelo respeito, solidariedade nos momentos em que eu não estava muito bem, pelas discussões relacionadas aos projetos, pelas risadas e amizade. Agradeço ao Jê pela amizade construída desde quando fui aluna de iniciação científica, pelos ensinamentos em biologia molecular e pela confiança. E também, a Larissa, pelos excelentes conselhos e exemplo de estudante batalhadora e dedicada.

A Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Celinha), chefe do grupo de pesquisa de estudos em Leishmaniose (EL) do CPqRR, por ter acompanhado toda minha trajetória, desde a iniciação científica até a finalização deste projeto, por sempre ter acreditado no meu trabalho, pelo carinho e valiosos conselhos. Agradeço imensamente por ter me acalmado nos momentos mais difíceis e decisivos em minha vida profissional e ter vibrado, junto a mim, nos momentos de conquistas e alegrias.

As pesquisadoras, Dra. Andréa Teixeira, Dra. Vanessa Peruhype e Dra. Ana Carolina Campi do grupo integrado de pesquisas em Biomarcadores do CPqRR, por serem as precursoras da minha vida profissional científica, por toda confiança no meu trabalho e pelos ensinamentos durante o período em que fui aluna de iniciação científica e técnica.

Ao Laboratório de Biologia de Vetor, coordenado pelo pesquisador Dr. Petr Volf, do Departamento de Parasitologia, Universidade Charles, Praga, República Tcheca, pela minha estadia, por poder vivenciar a rotina tão diferente em um laboratório de outro país, pela receptividade de todos os integrantes do laboratório, em especial Jovana Sadlova, Katerina Pruzinova, Jitka Myskova e Jana Hlavacova, pelo planejamento, organização, ensinamentos e disponibilidade de todo material necessário para realização dos experimentos com flebotomíneos.

As amigas da Biologia, Izabella e Thelma, pela amizade desde a graduação. Agradeço profundamente pela sinceridade em poder compartilhar todos os acontecimentos importantes da minha vida, sejam eles tristes ou alegres, pela paciência com os momentos em que eu estava estressada, pelas conversas engraçadas, pelos *happy hours*, comemorações de aniversários, festas, pela grande amizade e companheirismo de sempre. Peço desculpas pelos dias em que estava fazendo experimentos ou estudando, e não pude encontrar com vocês.

A amiga Thaís, que conheci durante o período em que fui técnica do grupo integrado de pesquisas em Biomarcadores do CPqRR, por ser uma “menina de ouro”, por ter me dado força e motivação nos momentos difíceis que passei durante estes dois anos de mestrado, pela companhia em todo café da manhã na Asfoc, pelos estudos e conhecimentos compartilhados na área da saúde, por estar sempre presente e pela amizade.

*“Cem vezes por dia, eu lembro a mim mesmo
que minha vida interior e exterior dependem do trabalho de outras pessoas
e que devo me esforçar, para dar na mesma medida em que recebi e continuo a receber.”*

Albert Einstein

RESUMO

Leishmania (L.) major é uma espécie presente em regiões do Velho Mundo sendo um importante agente etiológico da leishmaniose cutânea (LC) nestas áreas. Esta espécie dependendo da região de transmissão tem como vetores principais *Phlebotomus papatasi* e *P. duboscqi*. Em países do continente Americano (Equador, Peru, Paraguai, México e Venezuela) alguns isolados semelhantes a *L. (L.) major* têm sido descritos sendo denominados *L. major-like*. No Brasil, três isolados de pacientes que relataram nunca ter saído do país foram caracterizados como *L. major-like* (BH49, BH121 e BH129), devido ao parentesco genético com a cepa referência de *L. major* (Friedlin FV1). Vários trabalhos têm caracterizado estas cepas do ponto de vista bioquímico, biológico e molecular. Entretanto, aspectos da glicobiologia e da interação com vetores ainda são desconhecidos para estas cepas. No presente estudo, caracterizamos preliminarmente as unidades repetitivas dos lipofosfoglicanos (LPGs) das cepas de *L. major-like* e constatamos variações intraespecíficas no nível de galactosilação e arabinosilação entre elas. As cepas BH49 e BH129 assim como o controle FV1 foram mais galactosiladas do que a cepa BH121. Em relação à análise pelo anticorpo específico para Ara (β 1,2), apenas a cepa BH129 e FV1 foram arabinosiladas. Galactose é um açúcar importante na interação parasito-hospedeiro, pois reconhece um receptor no intestino de *P. papatasi* (*PpGalec*). Para avaliar se diferentes níveis de galactosilação iriam afetar na interação com vetores, foram realizados ensaios de infecção *in vivo* em *Lutzomyia longipalpis* (vetor permissivo) e *P. papatasi* (vetor restritivo). As cepas de *L. major-like* foram oferecidas em repasto artificial para os vetores. Posteriormente, estes foram avaliados no 1º, 5º e 8º dia pós-infecção. Todas as cepas foram capazes de infectar ambos os vetores, com a colonização da válvula do estomodeu já no 5º dia e maior porcentagem de metaciclogênese no 8º dia pós-infecção. A cepa BH121 (menos galactosilada) apresentou uma menor intensidade de infecção embora tenha também colonizado com sucesso ambos os vetores. Os dados obtidos sugerem que polimorfismos no LPG de *L. major-like* podem afetar na interação com o hospedeiro invertebrado.

ABSTRACT

Leishmania (L.) major is an Old World species of causing cutaneous leishmaniasis (LC). It is mainly transmitted by *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. In the Americas (Ecuador, Peru, Paraguay, Mexico and Venezuela) some isolates similar to *L. (L.) major* have been described as *L. major*-like. In Brazil, three isolates from patients who never left the country, were characterized as *L. major*-like (BH49, BH121 and BH129), due to genetic linkage to the reference strain of *L. major* (Friedlin FV1). Several studies have characterized those strains using biochemical, biological and molecular techniques. However, aspects of glycobiology and interaction with vectors are still unknown for these strains. In the present study, we preliminarily characterized the repeat units of lipophosphoglycans (LPGs) of *L. major*-like strains and detected intraspecific variations in their levels of galactosylation/arabinylation. Strains BH49 and BH129 as well as the FV1 control were more galactosylated than strain BH121. However, only strains BH129 and FV1 were arabinylated. Galactose is an important sugar in the parasite-host interaction, since it recognizes a receptor in the *P. papatasi* midgut (*PpGalec*). In order to evaluate whether different levels of galactosylation would affect the interaction with vectors, *in vivo* infection assays were performed in *Lutzomyia longipalpis* (permissive vector) and *P. papatasi* (restrictive vector). The strains were artificially offered to the vectors and evaluated 1, 5 and 8 days post-infection. All strains were able to infect both vectors, with successful colonization of the stomodeal valve and metacyclogenesis. Although, BH121 strains (less galactosylated) exhibited lower infection intensity, it also managed to colonize the midgut of both vectors. The data obtained suggest that polymorphisms in *L. major*-like LPG may affect the interaction with the invertebrate host.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do desenvolvimento da *Leishmania* no intestino do vetor..... 21
- Figura 2.** Esquema representativo dos glicoconjugados de superfície da *Leishmania*..... 22
- Figura 3.** Esquema representativo da estrutura do lipofosfoglicano (LPG)..... 23
- Figura 4.** Esquema representativo da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. major*..... 24
- Figura 5.** Esquema de organização dos experimentos de infecção em flebotomíneos..... 33
- Figura 6.** Alimentador artificial de vidro..... 35
- Figura 7.** Esquema representativo do processo de infecção experimental “*in vivo*” com uso de alimentador artificial..... 36
- Figura 8.** Curvas de crescimento tempo dependente das formas promastigotas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) cultivadas em meio M199 acrescido de 10% SFB a 26°C..... 39
- Figura 9.** Resultado do perfil de digestão utilizando a enzima *HaeIII* do fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de amostras isoladas em cultura..... 40
- Figura 10.** LPGs purificados das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) corados pela técnica de *Stains-All*..... 40
- Figura 11.** *Western Blot* de LPG purificado (10 µg) das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo WIC 79.3 (1:1000)..... 41
- Figura 12.** *Western Blot* de LPG purificado (10 µg) das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo 3F12 (1:1000)..... 41
- Figura 13.** *Dot Blot* de LPG purificado (10 µg) das cepas de *L. infantum* (Ba262) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000)..... 42
- Figura 14.** Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH129)..... 43
- Figura 15.** Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH49)..... 44

- Figura 16.** Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major-like* (BH121)..... 45
- Figura 17.** Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major-like* (BH49) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1º, 5º e 8º dia após alimentação artificial..... 46
- Figura 18.** Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major-like* (BH129) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1º, 5º e 8º dia após alimentação artificial..... 46
- Figura 19.** Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major-like* (BH121) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1º, 5º e 8º dia após alimentação artificial..... 47
- Figura 20.** Morfologia da cepa FV1 (*L. major*) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H)..... 48
- Figura 21.** Morfologia da cepa BH49 (*L. major-like*) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H)..... 48
- Figura 22.** Morfologia da cepa BH121 (*L. major-like*) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H)..... 49
- Figura 23.** Morfologia da cepa BH129 (*L. major-like*) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H)..... 49
- Figura 24.** Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major-like* (BH49) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP)..... 50
- Figura 25.** Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major-like* (BH121) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP)..... 51
- Figura 26.** Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major-like* (BH129) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP)..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>Leishmania</i> ssp. utilizadas no presente estudo.....	28
Tabela 2. Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (10%).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ara – Arabinose

ESOAK – Solução de água/etanol/etil-éter/piridina/hidróxido de amônio (15:15:5:1:0,017)

Gal – Galactose

GIPLs – Glicoinositolfosfolípides

Glc – Glicose

gp63 – Glicoproteína 63

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

Hsp70 - Proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons

IL – Interleucina

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose disseminada

LCDA – Leishmaniose cutânea difusa anérgica

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LPS - Lipopolissacarídeo

LT – Leishmaniose tegumentar

LTB4 – Indução de leucotrieno B4

LV – Leishmaniose visceral

M199 – Meio para cultivo 199 (Sigma[®])

Man – Manose

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MP – Matriz peritrófica

MyD88 – Fator de diferenciação mieloide 88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)

NETs – Redes extracelulares de neutrófilos

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

PG – Fosfoglicano

PKR – Proteína quinase R

PO₄ – Fosfato

PPG – Proteofosfoglicano

PpGalec – Receptor para galactose presente no intestino de *P. Papatasi*

PSG – Matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos

RAPD – Amplificação aleatória de DNAs polimórficos

RFLP – Análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição

sAP – Fosfatases ácida secretadas

SDS-PAGE – Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

SFB – Soro fetal bovino

SSR – Amplificação de repetições de sequências simples

TLR – Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptor*)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Leishmanioses.....	17
1.2. <i>Leishmania (L.) major</i> -like.....	18
1.3. Interação <i>Leishmania</i> -vetor.....	20
1.4. Glicobiologia de <i>Leishmania</i>	22
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Condições de cultivo e tipagem molecular.....	28
4.2. Glicobiologia.....	29
4.2.1. Extração dos LPGs.....	29
4.2.2. Purificação dos LPGs.....	30
4.2.3. Análise por <i>Stains-All</i>	31
4.2.4. Análise por <i>Dot Blot</i>	32
4.2.5. Análise por <i>Western Blot</i>	32
4.3. Interação das cepas de <i>L. major</i> -like e <i>L. major</i> com os vetores <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Phlebotomus papatasi</i>	33
4.3.1. Flebotomíneos.....	33
4.3.2. Preparo da membrana de <i>Gallus gallus domesticus</i> jovem.....	34
4.3.3. Preparo dos parasitos.....	34
4.3.4. Alimentação artificial.....	35
4.3.5. Dissecção de fêmeas infectadas.....	36
4.3.6. Morfometria dos parasitos.....	37
4.4. Comitê de Ética.....	38
4.5. Análises estatísticas.....	38
5. RESULTADOS.....	39

5.1. Curva de crescimento.....	39
5.2. PCR-RFLP do <i>hsp70</i>	39
5.3. <i>Stains-All</i>	40
5.4. <i>Dot Blot</i> e <i>Western Blot</i>	41
5.5. Infecção experimental das cepas de <i>L. major</i> -like e <i>L. major</i> em <i>L. longipalpis</i> e <i>P. papatasi</i>	42
5.5.1. Densidade das infecções.....	42
5.5.2. Localização dos parasitos no intestino dos vetores.....	45
5.5.3. Diferenciação morfológica dos parasitos durante o desenvolvimento nos vetores	47
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças com caráter zoonótico causadas por protozoários digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, todos com grau variável de especificidade pelos hospedeiros (Ross, 1903; Kaye & Scott, 2011). O protozoário apresenta duas formas principais durante seu ciclo de vida: promastigota (flagelada) encontrada no intestino de flebotômíneos e amastigota (com flagelo internalizado), encontrada em células do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados (Chance, 1985; Kaye & Scott, 2011).

Entre as parasitoses humanas, as leishmanioses estão entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes, as quais representam um dos maiores problemas de saúde pública, pois afetam aproximadamente 12 milhões de pessoas em 98 países distribuídos em cinco dos seis continentes (Europa, Ásia, América, África e Oceania), com cerca de 1,3 milhões de novos casos e 20 a 40 mil mortes por ano (Alvar et al., 2012; Hartley et al., 2014; WHO, 2017).

De evolução crônica, as leishmanioses são doenças divididas em dois grupos principais com um amplo espectro de manifestações clínicas, dependentes da espécie de *Leishmania* envolvida e do *status* imunológico do hospedeiro: a leishmaniose tegumentar (LT) causada por espécies de *Leishmania* dermatrópicas que acometem o tegumento e a leishmaniose visceral (LV) causada por espécies viscerotrópicas que acometem a medula óssea, fígado e baço (Cunningham, 2002; Gontijo & de Carvalho, 2003; Kaye & Akira, 2011). A LT pode, por sua vez, manifestar-se pelas formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea disseminada (LCD) e leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) que geram diferentes tipos de lesões na pele (Ashford, 2000; Silveira et al., 2004; Marques et al., 2017).

No Novo Mundo, a LC se caracteriza por lesões cutâneas que podem ulcerar ou não, deixando cicatrizes após o tratamento. Elas são causadas por espécies do subgênero *Leishmania*, como *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis* e do sub-gênero *Viannia*, incluindo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) naiffi*. No Velho Mundo, a LC é causada principalmente pela *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. A LMC que se manifesta como lesões desfigurantes nas mucosas oral, nasal e faríngea são causadas principalmente por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e em menor

grau por *L. (V.) panamensis*. A LCD é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta doença são a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis*. A LCDA que se manifesta em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* é causada no Novo Mundo por parasitas do subgênero *Leishmania*, como *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*. A LV, manifestação mais grave da doença, caracteriza-se por hepatoesplenomegalia e linfadenopatia e pode levar ao óbito se não tratada. Esta é causada pelas espécies *L. (L.) donovani*, e *L. (L.) infantum* (syn. *Leishmania (L.) chagasi*) (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000; Matlashewski, 2001; Silveira et al., 2004; Davidson, 2005; WHO, 2017).

No Brasil, a LC tem sido causada principalmente por *L. (V.) braziliensis*. Nos últimos anos, houve uma grande expansão das áreas endêmicas, levando a um aumento no número de casos registrados. Estes, no ano de 2014, correspondiam a 95% dos 20.418 novos casos com informações clínicas disponíveis pela Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 2017). Segundo Momen et al. (1985), a LC apresenta uma diversidade de padrões epidemiológicos, o que faz com que a multiplicidade de espécies observadas, de insetos vetores e reservatórios em diferentes ambientes sejam fatores amplamente estudados para definição da epidemiologia da doença. Neste trabalho, vamos dar enfoque para uma espécie causadora de LC no Brasil, caracterizada como *L. major*-like.

1.2. *Leishmania (L.) major*-like

A *L. major*-like foi assim denominada, pois alguns estudos com isolados de *Leishmania* spp. de países do Novo Mundo demonstraram um perfil genotípico e fenotípico semelhante a *L. major* originada de países do Velho Mundo (regiões ao norte da África, Oriente Médio, Ásia Central, Europa mediterrânea e subcontinente indiano). Entretanto, estudos com aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro e a identificação dos possíveis vetores dessa espécie ainda são escassos (Momen et al., 1985; Silva et al., 2009).

O primeiro relato da ocorrência de *L. major*-like em países do continente americano foi realizado por Momen et al. (1985). Neste estudo, isolados de *Leishmania* spp. de diferentes regiões geográficas do Brasil foram submetidas à técnica de isoenzimas e de reatividade com anticorpos monoclonais. Estas apresentaram diferenças fenotípicas com relação às amostras dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*, causadoras da LC nas Américas. Porém, elas foram semelhantes às cepas de referência de *L. major*. No entanto, a análise do perfil de restrição do kDNA foi diferente daquele observado em todas as cepas de referência, inclusive

de *L. major*. Estes dados levaram os autores a propor a existência de um tipo de *Leishmania* ainda não caracterizado no Brasil, com perfil semelhante a *L. major* e, além disso, sugeriram que esta espécie poderia ter sido introduzida no país por imigrantes ou animais (roedores ou cães), uma vez que os isolados avaliados foram obtidos de pacientes que relataram nunca ter viajado para fora do país (Momen et al. 1985).

Além do Brasil, a *L. major*-like também foi encontrada em outros países do continente americano. No Equador, foram observados dois isolados de pacientes com perfis isoenzimáticos e reatividade a anticorpos similares a *L. major* (Hashigushi et al., 1991). Outro estudo realizado no Paraguai, também identificou isolados utilizando as mesmas técnicas. Dois deles apresentaram diferentes perfis de zimodemas das cepas referências, tanto do Velho, como do Novo Mundo, porém os perfis foram idênticos ao de uma cepa de *L. major*-like isolada de uma paciente do Equador (Yamasaki et al., 1994). No Peru, também foram identificadas amostras muito semelhantes, mas não idênticas a *L. major* (Shaw, 1994). Em um estudo que avaliou a função do citocromo b como fator para determinar relações filogenéticas entre as espécies de *Leishmania*, demonstrou uma homologia de 99,9% dos genes de isolados de *L. major*-like do Equador com a cepa referência de *L. major* (Luyo-Acero et al., 2004). No entanto, mais estudos são necessários englobando diferentes isolados da América Latina para se estabelecer o real *status* taxonômico destas cepas.

Segundo Calvopina et al. (2004), isolados de *Leishmania* com perfil genotípico parecido com o de *L. major* foram observados no Brasil, Paraguai, México e Venezuela, sugerindo que algumas dessas populações possam ter sido importadas de países do Velho Mundo. Em recente revisão sobre o perfil das leishmanioses no Equador, Hashiguchi et al. (2016) ressaltaram a *L. major*-like como uma das oito espécies de *Leishmania* caracterizadas no país, mas que ainda não foram identificados possíveis vetores e reservatórios.

Um estudo realizado na década de 70 em nosso país incorporou um *pool* de cinco isolados de *Leishmania* spp. de pacientes de diferentes regiões em uma vacina contra LT (Mayrink et al., 1979). Duas das cepas (BH49 e BH121) incluídas na vacina foram analisadas nesta dissertação. Promastigotas da cepa BH121 também foram utilizadas na preparação de um antígeno para teste de diagnóstico por ELISA em humanos e cães com LV (Barbosa-De-Deus et al., 2002). Ao longo dos anos, estas amostras foram sendo estudadas e estes isolados foram caracterizados como *L. major*-like, pois demonstraram estarem geneticamente relacionados com cepas referência de *L. major* (FN, 5ASHK), pela análise de isoenzimas, RAPD e SSR-PCR (Silva et al., 2009). Embora estas cepas sejam fenotipicamente semelhantes a *L. major* do Velho Mundo, o comportamento biológico das mesmas dentro dos

vetores ainda é desconhecido. Por isso, neste trabalho, pretendemos explorar um pouco mais sobre os aspectos relacionados aos possíveis vetores de *L. major*-like do Brasil.

1.3. Interação *Leishmania*-vetor

A transmissão da LT ocorre pela picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera (família Psychodidae: subfamília Phlebotominae) principalmente pelos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Young & Duncan, 1994). Os flebotomíneos são insetos holometábolos, cujo desenvolvimento ocorre a partir de ovos que dão origem a quatro estádios larvais, um estágio de pupa e adultos. Estes são pequenos (cerca de 2,5 mm de comprimento), com coloração que varia do amarelo ao castanho-escuro, são revestidos por inúmeras cerdas e quando em repouso mantêm as asas eretas (Killick-Kendrick, 1999; Aguiar & Medeiros, 2003). Estes insetos podem ser encontrados em diferentes micro-habitats úmidos, frescos e sombreados e costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa das árvores e frestas em rochas (Alexander et al., 1992; Azevedo et al., 1993). Embora a transmissão da maioria das espécies de *Leishmania* que causam LC sejam zoonótica, modificações ambientais causadas pelo homem têm contribuído para o estabelecimento da doença em vários outros cenários ecológicos (Desjeux, 2001).

Como mencionado anteriormente, as espécies de *Leishmania* que infectam o homem são classificadas em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o tipo de desenvolvimento no trato digestório do vetor. O interior do tubo digestivo do inseto é dividido em intestino posterior, intestino médio (abdominal e torácico) e intestino anterior. As espécies do subgênero *Leishmania* apresentam desenvolvimento suprapilário, no qual os parasitos se desenvolvem predominantemente no intestino médio antes de migrarem para a porção anterior. Já as espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento peripilário, ou seja, possuem uma fase do desenvolvimento que se passa no intestino posterior antes de migrarem para porções mais anteriores (Lainson & Shaw, 1987).

O processo de interação da *Leishmania* com os flebotomíneos inicia-se quando a fêmea precisa de se alimentar de sangue para ovogênese. Durante o repasto sanguíneo, ela pode eventualmente ingerir formas amastigotas livres ou dentro de macrófagos de um hospedeiro vertebrado infectado. As formas do parasito são rapidamente direcionadas ao intestino médio do inseto e envoltas por uma matriz peritrófica (MP), junto ao bolo sanguíneo. A MP é composta por proteínas, glicoproteínas e quitina que protegem o epitélio intestinal do inseto contra danos causados pelo conteúdo alimentar e atua como barreira contra patógenos (Walters et al., 1992;

Pimenta et al., 1997; Kamhawi, 2006). As alterações das condições fisiológicas do intestino médio do inseto, como a diminuição da temperatura e aumento do pH, induzem a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, que são curtas, replicativas e mais resistentes a ação das enzimas digestivas (Borovsky & Schlein, 1987; Dostalova & Volf, 2012).

As formas promastigotas, ao longo do trato digestório, assumem diferentes denominações de acordo com a variação morfológica. No presente estudo, foram utilizadas as propostas por Rogers et al. (2002) e Bates (2007). Em sequência, as promastigotas procíclicas diferenciam-se em: nectomonadas (promastigotas longas que escapam do confinamento da MP pela secreção da enzima quitinase, ligam-se ao epitélio do intestino médio evitando a excreção do parasito via defecação e, posteriormente, se movem para o intestino médio torácico do vetor), leptomonadas (promastigotas curtas responsáveis pela rápida expansão no intestino médio torácico e anterior do vetor, e pela produção da matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos-PSG que obstrui o intestino médio anterior, desempenhando um papel significativo na transmissão do parasito), haptomonadas (formas que se aderem à camada de quitina da válvula do estomodeu) e metacíclicas (formas altamente móveis, caracterizadas por serem curtas, com flagelo longo, não replicativas e infectantes para o hospedeiro vertebrado) (Sacks & Perkins, 1985; Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002; Bates, 2007; Sadlova & Volf, 2009) (Figura 1).

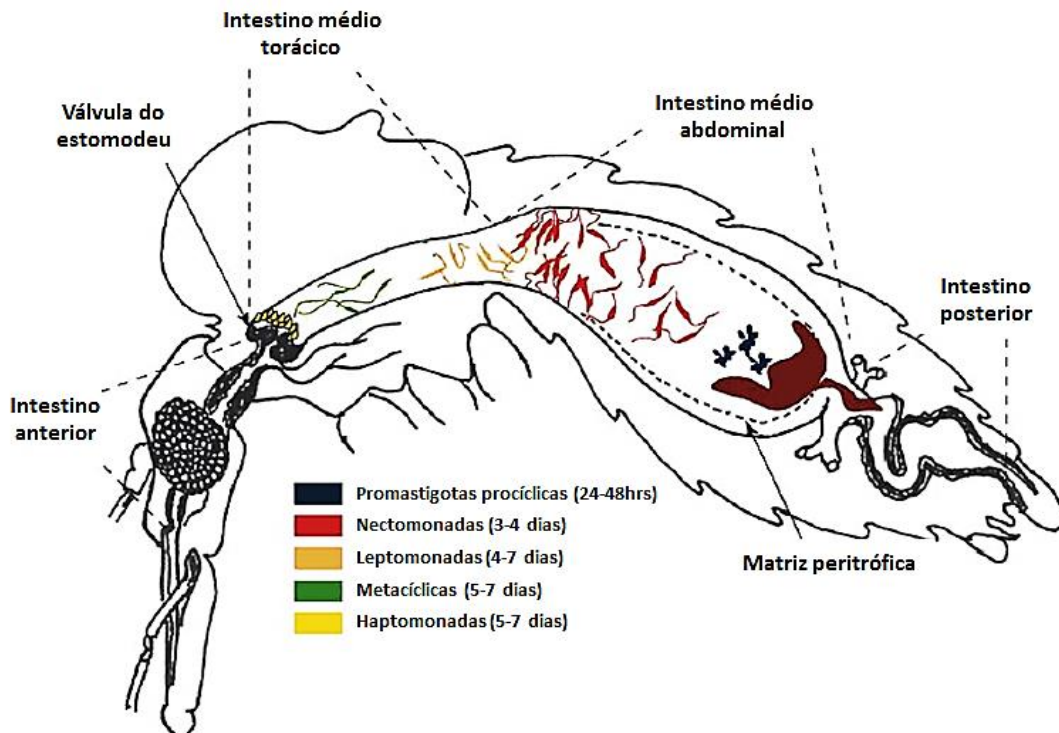


Figura 1: Esquema representativo do desenvolvimento da *Leishmania* no intestino do vetor (Fonte: adaptado de *Trends in Parasitology*, Kamhawi, 2006).

As fêmeas de flebotomíneos infectadas transmitem o parasito aos hospedeiros vertebrados durante um próximo repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas na pele do hospedeiro juntamente com a saliva do vetor durante a picada (Bates, 2007).

1.4. Glicobiologia de *Leishmania*

Para sobrevivência e multiplicação das *Leishmanias* nos ambientes hostis encontrados no tudo digestório do vetor e nos tecidos do hospedeiro vertebrado, elas expressam moléculas em sua superfície, os glicoconjugados, que desempenham um papel importante no estabelecimento da infecção e mecanismos de escape (Sacks & Kamhawi, 2001). O termo “glicoconjugados” refere-se a qualquer molécula que possui algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas, como lipídeos e/ou proteínas. Estes incluem os lipofosfoglicanos (LPGs), glicoinositolfosfolípides (GIPLs) e as proteases de superfície (gp63) que estão ancorados a superfície do parasito por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, os glicoconjugados podem ser secretados sob a forma de fosfatases ácidas (sAPs), fosfoglicanos (PGs) e proteofosfoglicanos (PPGs) (Assis et al., 2012a). As estruturas dos glicoconjugados estão representadas na figura 2.

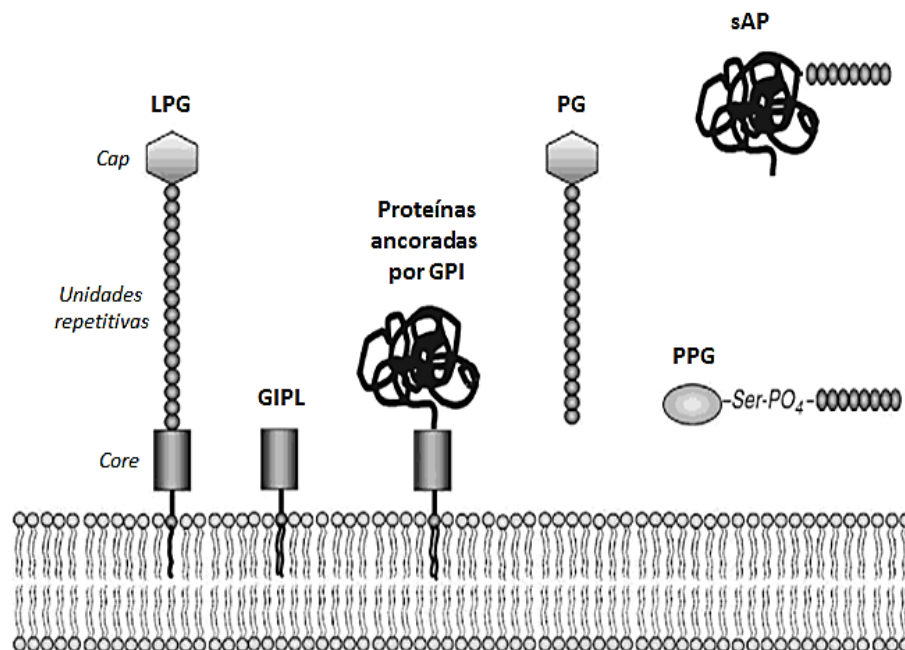


Figura 2: Esquema representativo dos glicoconjugados de superfície da *Leishmania*. As pequenas estruturas ovais representam as unidades repetitivas Gal-Man-PO₄. No PPG (proteofosfoglicano) e sAP (fosfatase ácida secretada) as unidades repetitivas estão ligadas ao polipeptídeo via Man-PO₄-Serina. GPI = glicosilfosfatidilinositol; PG = fosfoglicano; LPG = lipofosfoglicano; GIPL = glicosilinositolfosfolípide (Fonte: adaptado de *Molecular Medical Parasitology*, Turco, 2003).

Dentre os glicoconjugados presentes na superfície do protozoário *Leishmania*, destaca-se o LPG. Ele é considerado um fator de virulência multifuncional sendo importante na interação parasito-hospedeiro tanto no vertebrado quanto no invertebrado. Suas funções incluem: adesão e especificidade ao intestino médio do inseto vetor, resistência a ação das enzimas digestivas, resistência ao complemento, inibição do processo de maturação dos fagossomos, inibição da proteína quinase C, modulação da produção de óxido nítrico (NO) e citocinas, modulação de MAPKs, agonista de TLR2/TLR4, indução de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), indução da proteína quinase R (PKR), indução da heme-oxigenase I, indução de leucotrieno B4 (LTB4) (Sacks & Kamhawi, 2001; Guimarães-Costa et al., 2009; Vivarini et al., 2011; Assis et al., 2012b; Luz et al., 2012; Ibraim et al., 2013; Paranaíba et al., 2015, Nogueira et al., 2016).

Os LPGs estão expressos apenas nas formas promastigotas, onde formam um denso glicocálice que recobre toda a superfície da *Leishmania*. A sua estrutura geral é bem conservada, composta por quatro domínios: (I) uma âncora lipídica conservada representada por 1-*O*-alquil-2-lisofosfatidilinositol (PI) ligado a; (II) uma porção central composta por um heptassacarídeo, também conservado, representado por Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Galf(α 1-3)[Glc α 1-PO₄]Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α 1-); (III) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal(α 1-4)Man(α 1)-PO₄ que podem possuir substituições de um ou mais açúcares e dar origem a polimorfismos intra e interespecíficos e (IV) uma região terminal que recebe o nome de *cap* formada por um oligossacarídeo neutro (Descoteaux & Turco, 1999; Dobson et al., 2003a; Soares et al., 2004; Coelho-Finamore et al., 2011; Nogueira et al., 2016) (Figura 3).

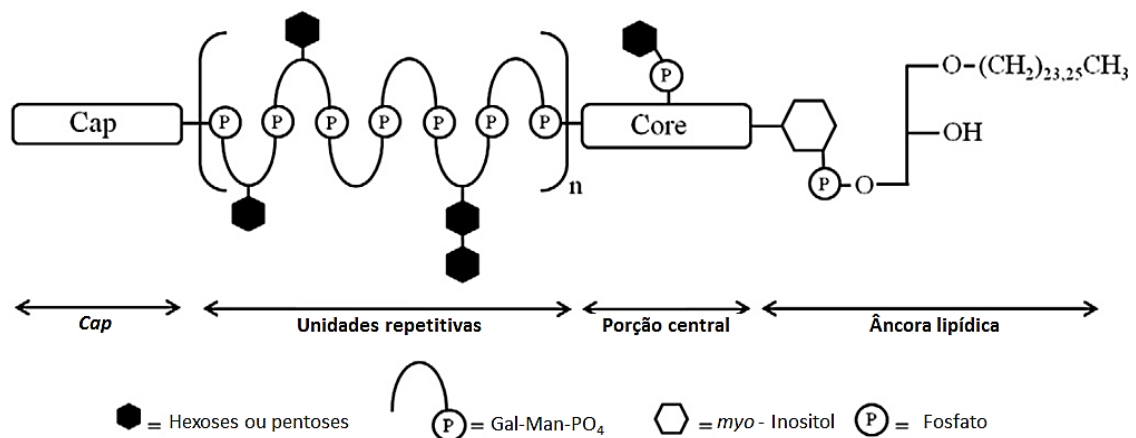


Figura 3: Esquema representativo da estrutura do lipofosfoglicano (LPG). Bioquimicamente é composta por quatro domínios, uma âncora lipídica de fosfatidilinositol ligada a um alquilglicerol, um núcleo glicano conservado, região de unidades repetitivas e uma região terminal, chamada de *cap*, formada por um oligossacarídeo neutro. A estrutura e o número de unidades repetitivas dos fosfoglicanos variam e dependem do estágio de vida e do tipo de espécie de *Leishmania*. Gal = galactose; Man = manose; Core = Núcleo glicano de hexassacarídeos; *Cap* = oligossacarídeo neutro. (Fonte: adaptado de *Biochimica et Biophysica Acta*, Assis et al., 2012a).

Um dos primeiros LPGs caracterizados foi o de *L. major*. Em promastigotas procíclicas eles apresentam principalmente, resíduos de galactose nas unidades repetitivas. Estes resíduos reconhecem o receptor *PpGalec* no intestino de *P. papatasi* (Kamhawi et al., 2004). Durante a metaciclogênese, alguns resíduos de galactose (β 1,3) são substituídos por arabinose (β 1,2) nas formas metacíclicas, resultando no desprendimento do parasito das microvilosidades intestinais do vetor e posterior migração para o intestino anterior (McConville et al., 1992) (Figura 4).

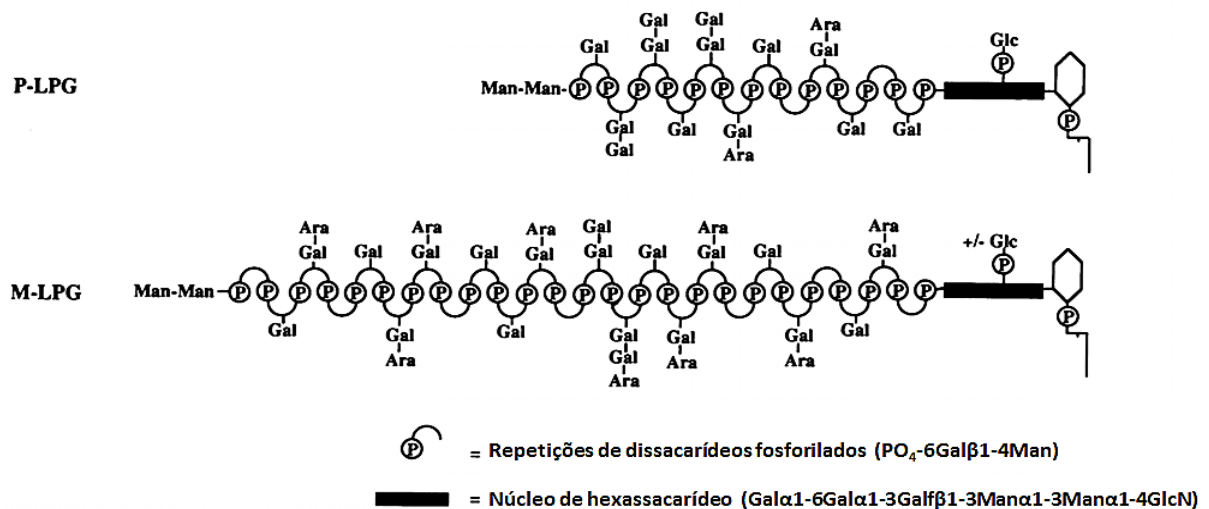


Figura 4: Esquema representativo da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. major*. As formas promastigotas procíclicas (P-LPG) apresentam nas unidades repetitivas, em sua maioria, cadeias laterais contendo resíduos de galactose (Gal). Durante a metaciclogênese ocorre um aumento no número médio das unidades repetitivas e alguns resíduos de Gal são substituídos por resíduos de arabinose (Ara) nas formas metacíclicas (M-LPG). Glc = glicano; Man = manose; P = fosfato (Fonte: adaptado de *The EMBO Journal*, McConville et al., 1992)

Outros LPGs de espécies de *Leishmania* do Velho Mundo já foram caracterizados, tais como *L. tropica* (McConville et al., 1995; Soares et al., 2004); *L. aethiopica* (McConville et al., 1995); *L. donovani* (Sudão e Índia) (Sacks et al., 1995; Mahoney et al., 1999). Algumas espécies do Novo Mundo, também tiveram suas estruturas elucidadas, como *L. mexicana* (Ilg et al., 1992), *L. infantum* (Soares et al., 2002; Coelho-Finamore et al., 2011), *L. braziliensis* (Soares et al., 2005) e recentemente *L. enriettii* (Paranaíba et al., 2015), *L. shawi* (Passero et al., 2015) e *L. amazonensis* (Nogueira et al., 2016).

Algumas características apresentadas nas estruturas dos LPGs já descritos apresentam polimorfismos intra e interespecíficos. O LPG de *L. infantum* apresenta uma β -glicose nas cadeias laterais das unidades repetitivas. Após a metaciclogênese, esta β -glicose desaparece. Em *L. braziliensis* acontece o oposto, as formas promastigotas procíclicas não possuem cadeias laterais em suas unidades repetitivas e as metacíclicas possuem 1-2 β -glicoses (Soares

et al., 2005). O mesmo é observado no LPG de promastigotas procíclicas de *L. enriettii* (Paranaíba et al., 2015). O papel destas modificações bioquímicas resulta em diferentes padrões de adesão ao intestino médio de alguns vetores, como *L. longipalpis*, *L. intermedia* e *L. whitmani* (Soares et al., 2010).

Estudos sobre a variabilidade intraespecífica dos LPGs ainda são escassos. O primeiro estudo que mostrou polimorfismos em *L. major* identificou que a cepa FV1 possuía cadeias laterais de galactose e arabinose, enquanto que a cepa LV39 apresentava apenas galactose (Dobson et al., 2003b). Posteriormente, um estudo caracterizou os LPGs de 16 cepas de *L. infantum*, os quais foram agrupados em 3 tipos: I) sem cadeias laterais; (II) com adição de resíduos de uma a duas β -glicoses e III) formados por cadeias laterais de três ou mais glicoses. Esta variabilidade da conformação dos LPGs resultou numa maior ativação da produção de NO por macrófagos murinos, porém não interferiu na infectividade para o vetor *L. longipalpis* (Coelho-Finamore et al., 2011). Duas cepas de *L. amazonensis* demonstraram variabilidade em seus LPGs. A cepa PH8 apresentou duas cadeias de β -glicoses enquanto a cepa Josefa exibiu três cadeias laterais de galactose. Entretanto, estes polimorfismos não afetaram o desenvolvimento destas cepas em *Lutzomyia migonei* (Nogueira et al., 2016). A estrutura do LPG de cepas de *L. major*-like do Brasil ainda é desconhecida. Estudos recentes mostram que ocorrem variações importantes no nível de galactosilação nos LPGs das cepas BH49 e BH121 (Wu et al., 2015). Porém, o impacto destes polimorfismos na interação com o vetor ainda é desconhecido.

Diante do exposto, este projeto pretende descrever se ocorrem polimorfismos nos LPGs de cepas de *L. major*-like isoladas de diferentes regiões do Brasil e avaliar a capacidade de interação com os vetores *L. longipalpis* (permissivo) e *P. papatasi* (restritivo). Pretende-se entender o possível papel destas cepas na cadeia epidemiológica da LC no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos que avaliam a caracterização molecular e/ou bioquímica de isolados de pacientes provenientes de áreas endêmicas para LT em países do Novo Mundo têm observado algumas cepas geneticamente semelhantes a *L. major* (Velho Mundo). Estas foram denominadas como *L. major*-like e já foram identificadas em regiões do Equador, Paraguai, Peru, México, Venezuela e Brasil. Entretanto, os aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro e os possíveis vetores desta espécie ainda não estão bem estabelecidos.

Os resultados obtidos neste projeto vão complementar as observações de caracterização biológicas (Silva et al., 2009), por expressão gênica e bioquímicas descritas por Wu et al. (2015). Este será o primeiro trabalho a avaliar a interação de cepas de *L. major*-like em vetores do Novo Mundo (*L. longipalpis*) e do Velho Mundo (*P. papatasi*), o que irá contribuir para compreensão da possível origem e manutenção destes isolados no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de polimorfismos intraespecíficos nos LPGs de três cepas de *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) isoladas no Brasil e seu papel na interação com vetores.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair, purificar e caracterizar preliminarmente as estruturas dos LPGs das cepas BH49, BH121 e BH129 de *L. major*-like.
- Avaliar a taxa de infecção, localização e morfologia dos parasitos no intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* alimentados artificialmente com as diferentes cepas de *L. major*-like.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo e tipagem molecular

As cepas utilizadas neste estudo estão representadas na tabela 1. Com exceção da cepa BH49 isolada de paciente com LT no estado de Goiás, as demais cepas de *L. major*-like foram procedentes de casos humanos de LT próximas à cidade de Caratinga, na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, de indivíduos que nunca viajaram para fora do Brasil. As cepas FV1 (*L. major*) e Ba262 (*L. infantum*) foram utilizadas como controles. Todas as cepas de *Leishmania* utilizadas no estudo encontram-se criopreservadas e mantidas no Criobanco do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e também no Criobanco do grupo de pesquisas em Glicobiologia de *Leishmania* do Laboratório de Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Tabela 1. Cepas de *Leishmania* spp. utilizadas no presente estudo.

Cepas analisadas			
Código internacional ^a	Denominação usada no texto	Espécie	Origem (cidade/estado/país)
MCAN/BR/89/Ba-262	Ba262	<i>L. (L.) infantum</i>	Jacobina/BA/Brasil
MHOM/IL/1980/Friedlin	FV1	<i>L. (L.) major</i>	Tunísia/Velho Mundo
MHOM/BR/1971/BH49	BH49	<i>L. (L.) major</i> -like	Goiás/Brasil
MHOM/BR/1973/BH121	BH121	<i>L. (L.) major</i> -like	Vale do Rio Doce/Minas Gerais/Brasil
MHOM/BR/1986/BH129	BH129	<i>L. (L.) major</i> -like	Vale do Rio Doce/Minas Gerais/Brasil

^aCódigos da Organização Mundial de Saúde: hospedeiro (MHOM, *Homo sapiens*; MCAN, *Canis familiaris*)/país/anos de isolamento/denominação da cepa.

As formas promastigotas das cepas de *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129), *L. major* (FV1) e *L. infantum* (Ba262) foram cultivadas em meio definido M199 (Sigma[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/streptomicina (100x), hepes (40 mM), bicarbonato de sódio, biotina (1 mg/mL), hemina (0,0005%), solução de vitamina MEM (100x), hipoxantina, água de injeção (Sanobiol), pH 7,4 e mantidas em estufa BOD a 24°C.

Para conhecimento do perfil de crescimento dos parasitos e determinação do melhor período para extração dos LPGs e DNAs, foram realizadas curvas de crescimento, em duplicata, de cada cepa utilizada no estudo. O crescimento foi monitorado diariamente por doze dias, através da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Após os dados coletados, foi realizado um gráfico de curva de crescimento utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

Para garantir a identificação correta das cepas utilizadas, foi realizada a técnica de PCR-RFLP do gene *hsp70*. Foram utilizadas culturas de promastigotas de *Leishmania* com concentração de aproximadamente 1×10^9 parasitos/mL. Primeiramente as culturas foram centrifugadas (3000 rpm, 7 minutos, à temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de PBS 1x estéril. Em seguida, os parasitos foram submetidos à extração do DNA genômico utilizando o Kit de extração de tecido e células Gentra Puregene® (QIAGEN), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com algumas modificações. Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA por Nanodrop®. As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/μL. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP mix (New England), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso *Hsp70for* - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e 0,4 pmol de iniciador anti-senso *Hsp70rev* 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia et al., 2004). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 μL, contendo 1 μL de *HaeIII* (New England) (10 U/μL), 1,5 μL de tampão da enzima 10x e 12,5 μL de produto de PCR. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.2. Glicobiologia

4.2.1. Extração dos LPGs

A extração dos LPGs baseou-se no método descrito por Orlandi & Turco (1987) contendo modificações feitas por Soares et al. (2005) e Assis et al. (2012a). Dessa forma, foram utilizadas culturas de *Leishmania* em fase exponencial de crescimento com concentração de aproximadamente 1×10^7 parasitos/mL. Os parasitos foram lavados em PBS 1x e centrifugados a temperatura ambiente por 7 minutos, 3000 rpm. Para delipidação da

amostra foram adicionados ao pellet 2,5 mL de solução de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (Clorofórmio/Metanol – 3:2 v/v) e 0,5 mL de MgCl_2 (Cloreto de Magnésio – 4 mM). O material foi sonicado e centrifugado (temperatura ambiente, 7 minutos, 3000 rpm) resultando em uma fase sólida intermediária, o sobrenadante foi descartado. Para esta primeira etapa o procedimento foi repetido duas vezes.

Ao pellet de parasitos obtidos na etapa anterior foram adicionados 2,5 mL de MgCl_2 a 4 mM. O material foi sonicado e centrifugado (temperatura ambiente, 7 minutos, 3000 rpm) para promover a extração de proteínas. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida, na terceira etapa, foram adicionados á fase sólida 3,0 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (Clorofórmio/Metanol/Água – 10:10:3 v/v) e 0,5 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1 v/v), este último adicionado apenas na primeira centrifugação. O material foi sonicado e centrifugado (temperatura ambiente, 7 minutos, 3000 rpm) nos quais o sobrenadante contendo GIPLs foi obtido e armazenado. O procedimento desta terceira etapa foi repetido por três vezes.

Para extração do LPG, foi adicionado solução ESOAK (água/etanol/etil/éter/piridina/ NH_4OH – 15:15:5:1:0,017 v/v) ao sedimento resultante, o qual foi sonicado e centrifugado (temperatura ambiente, 7 minutos, 3000 rpm). O procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante contendo LPG foi evaporado utilizando-se nitrogênio gasoso a 45° C.

4.2.2. Purificação dos LPGs

Para purificação, cada amostra contendo LPG foi solubilizada em 1 mL de solução ácido acético/cloreto de sódio (NaCl) (0,1N/0,1N), sonicada e submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica, em que foi utilizada resina fenil-sefaroze. Aproximadamente 1 mL de resina foi aplicada em uma coluna Bio-Rad (#731-1550). A coluna foi lavada com 6 mL (1 mL por vez) de solução de ácido acético/ NaCl (0,1N/0,1N), o qual possibilitou o empacotamento da resina. Após a adição do último mL desta solução, a amostra contendo LPG foi adicionada.

Em seguida, o material contido na resina fenil-sefaroze foi lavado com solução de 1 mL de ácido acético/ NaCl (0,1N/0,1N), 1 mL de ácido acético (0,1N) e 1 mL de água destilada. Posteriormente, foram utilizados 4 mL de solução ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/ NH_4OH ; 15:15:5:1:0,017 v/v) para eluir o LPG. A amostra purificada foi novamente evaporada em nitrogênio, e em seguida, solubilizada em 200 μL de água de injeção (Sanobiol) e armazenada a 4° C. Os LPGs obtidos foram dosados pelo método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).

4.2.3. Análise por *Stains-All*

Para a detecção da presença dos LPGs em quantidade suficiente para realização dos experimentos de *Dot Blot* e *Western Blot*, as amostras obtidas após purificação foram submetidas à técnica de *Stains-All*. Este método é utilizado para corar vários tipos de padrões, como DNA, RNA e proteínas. As amostras dos LPGs das cepas de *L. major*-like e de *L. major* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). As especificações para preparação dos géis estão contidas na tabela 2.

Tabela 2. Soluções para o preparo dos géis de resolução e concentração (10%)*.

Gel de Resolução	(mL)	Gel de Concentração	(mL)
30% acrilamida/0,8% bisacrilamida	5	30% acrilamida/0,8% bisacrilamida	0,65
4x TrisHCl/DSD pH 8,8 (1,5 M)	3,75	4x TrisHCl/SDS pH 6,8 (0,5 M)	1,25
H ₂ O destilada e deionizada	6,25	H ₂ O destilada e deionizada	3,05
10% persulfato de amônio (APS)	0,07	10% persulfato de amônio (APS)	0,07
N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED)	0,01	N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED)	0,01

*Volume suficiente para dois mini géis de 0,75mmx14x14.

As amostras foram submetidas à eletroforese com diferença de potencial constante de 150V. Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma placa de *petri* de vidro com tampa contendo solução de 25% isopropanol (C₃H₈O). A placa foi coberta por papel alumínio, vedada e colocada para agitar lentamente durante 10 minutos. Em seguida, a solução contida dentro da placa foi desprezada em recipiente apropriado e nova solução de 25% isopropanol foi adicionada até a completa cobertura do gel. O material foi incubado *over night*.

No dia seguinte, a solução foi descartada e novamente nova solução de 25% isopropanol foi adicionada à placa. Esta foi incubada sob agitação por 20 minutos. Durante este período foi preparada a solução para corar o gel (*Stains-All*): 5 mL *Stains-All* 0,1% (10 mg de corante *Stains-All* + 100 mL formamida), 5 mL de formamida (CH₃NO), 25 mL de isopropanol, 64,5mL de H₂O tipo I e 1 mL de 1.5 M Tris-HCL (pH 8.8). Após preparação da solução corante, a solução de 25% isopropanol que estava cobrindo o gel foi descartada em recipiente apropriado. A solução *Stains-All* foi adicionada à placa de *petri* até completa cobertura do gel e incubada ao abrigo da luz, por 15 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com solução de 25% isopropanol em intervalos de 15 minutos entre cada lavagem (Bayne et al., 1993). Após

a última etapa de lavagem o material de cada amostra de LPG foi revelado (as amostras são coradas em roxo) e registrado por fotografia pelo equipamento ImageQuant™ LAS 4000.

4.2.4. Análise por *Dot Blot*

Para análise pela técnica de *Dot Blot*, a qual representa um método simplificado da técnica de *Western Blot*, foram utilizados anticorpos específicos anti-LPG: WIC 79.3 (1:1000) específico para Gal terminal (β 1,3) (Kelleher et al., 1992), o anticorpo 3F12 (1:1000) específico para Ara (β 1,2) (Kelleher et al., 1994) e CA7AE (1:1000) que reconhece as unidades repetitivas de Gal(β 1,4)-Man(α 1)-PO₄ presente em todos os LPGs (Tolson et al., 1989).

Para confirmar a eficácia dos anticorpos e a presença dos LPGs das cepas de *L. major*-like e dos controles nos materiais purificados, foram adicionados 5 μ L de cada amostra diretamente em uma membrana de nitrocelulose, em um molde circular, sendo 1 μ L de cada vez até sua completa secagem. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em uma solução de caseína 5% e posteriormente incubada com o anticorpo primário específico durante o mesmo intervalo de tempo. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de PBS 1x em intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Após a última etapa de lavagem a membrana foi revelada com as soluções SuperSignal® West Pico Luminol (Nogueira et al., 2016) e visualizada pelo equipamento ImageQuant™ LAS 4000.

4.2.5. Análise por *Western Blot*

Para análise pela técnica de *Western Blot*, foram avaliados os mesmo anticorpos utilizados na técnica de *Dot Blot* e os LPGs das cepas avaliadas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). Os géis de resolução e concentração foram preparados conforme tabela 2, descrito acima no tópico 4.2.3.

As amostras foram submetidas à eletroforese com diferença de potencial constante de 150V. Em seguida, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (45 μ m) sob uma corrente de 12V, por 1 hora, utilizando o aparelho de transferência Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell. Após transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora em uma solução de caseína 5% e posteriormente incubada com o anticorpo primário específico durante o mesmo intervalo de tempo. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de PBS 1x em intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e, depois, incubada por 1

hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Após a última etapa de lavagem, a membrana foi revelada com as soluções SuperSignal® West Pico Luminol (Soares et al., 2002) e visualizada pelo equipamento ImageQuant™ LAS 4000.

4.3. Interação das cepas de *L. major*-like e *L. major* com os vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*

Para análise da taxa de infecção em *L. longipalpis* e *P. papatasi* pelas cepas de *L. major*-like e cepa controle *L. major* avaliadas no presente estudo, os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia de Vetores, coordenado pelo Dr. Petr Volf, do Departamento de Parasitologia da Universidade Charles, em Praga, República Tcheca durante os meses de agosto e setembro de 2016. Os mesmos foram organizados conforme as combinações apresentadas na figura 5.

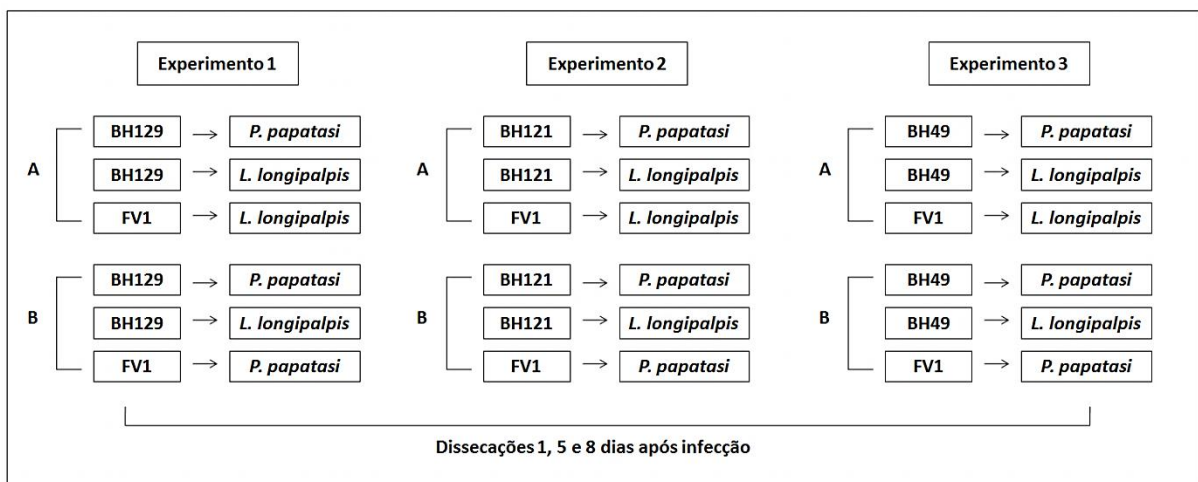


Figura 5: Esquema de organização dos experimentos de infecção em flebotomíneos. Foram realizados três experimentos para avaliar a infecção das cepas de *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) e a cepa controle *L. major* (FV1) em *P. papatasi* e *L. longipalpis*. Cada experimento foi subdividido em dois ensaios (A-B) e constou com três combinações cepa-vetor em cada. Após as infecções, as fêmeas de flebotomíneos alimentadas foram separadas e dissecadas no 1º, 5º e 8º dia.

4.3.1. Flebotomíneos

Foram avaliados flebotomíneos das espécies *L. longipalpis* e *P. papatasi* provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Biologia de Vetores, do Departamento de Parasitologia da Universidade Charles, em Praga, República Tcheca. As colônias de *L. longipalpis* foram originadas do município de Jacobina, Bahia, Brasil e as de *P. papatasi*

originadas da Turquia. Elas são mantidas em condições descritas em Volf & Volfova (2011), sendo que as fêmeas, utilizadas neste estudo, foram mantidas em incubadora com temperatura controlada a 25-28°C e tinham entre 4 a 7 dias da data de emergência do adulto.

4.3.2. Preparo da membrana de *Gallus gallus domesticus* jovem

Alguns dias antes da infecção experimental foram preparadas peles de *G. (g.) domesticus* jovens (“pintinho”) de 1-3 dias de idade previamente descongelados. As penas que da região ventral foram removidas e a pele foi dissecada cuidadosamente com pinça e tesoura estéreis. Cada membrana retirada foi colocada em uma placa de *petri* contendo etanol a 70% durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Em seguida, a membrana foi colocada em outra placa de *petri* contendo solução salina estéril durante 10 minutos, também, por duas vezes. Por fim, as membranas foram colocadas em uma nova placa de *petri* estéril com tampa e armazenadas em freezer a -20° C (Volf & Volfova, 2011).

4.3.3. Preparo dos parasitos

Promastigotas das cepas BH49, BH121, BH129 de *L. major*-like e FV1 de *L. major* (controle) foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% SFB até a fase log de crescimento. As culturas de cada cepa foram centrifugadas por 4100 *rpm*, 10 minutos a temperatura ambiente, para lavagem dos parasitos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em 1 mL de solução salina estéril (ou PBS 1x). Para contagem do número de parasitos, foram retirados 10 µL do material solubilizado e adicionados em um eppendorf contendo 990 µL de solução salina a 1% de formaldeído. Em seguida, os parasitos foram contados em câmara de Bürker e ajustados para uma concentração final de 1×10^7 promastigotas/mL.

Durante o ajuste do número de parasitos, sangue de coelho desfibrinado estéril foi colocado em banho a 56° C, por 35 minutos, para inativação do sistema complemento. Em seguida, foram adicionados em um tubo *falcon* 300 µL dos parasitos já ajustados e 2700 µL de sangue inativado, para uma concentração final de 10^6 promastigotas/mL de sangue.

4.3.4. Alimentação artificial

O processo de infecção experimental das fêmeas de flebotomíneos foi realizado através de um sistema artificial que simula um hospedeiro vertebrado. Foram utilizados três alimentadores artificiais de vidro, sendo que em cada um continha uma abertura pequena na parte superior (para introdução do sangue com parasitos), duas aberturas nas laterais que se comunicam com os outros alimentadores através de uma mangueira de plástico (para circulação de água a 37° C) e uma última abertura maior na parte inferior (para fixação da membrana de pintinho onde os insetos adquiriram o repasto infectivo).

Previamente descongelada, a membrana de *G. (g.) domesticus* jovem com superfície exterior virada para fora foi colocada na abertura maior de cada recipiente de vidro. Todas as membranas foram colocadas com ajuda de uma pinça estéril e fixadas cuidadosamente com fita *Parafilm* (Figura 6-A). Pela abertura superior os recipientes foram preenchidos com sangue de coelho inativado estéril nas concentrações de parasitos descritas acima (Figura 6-B).

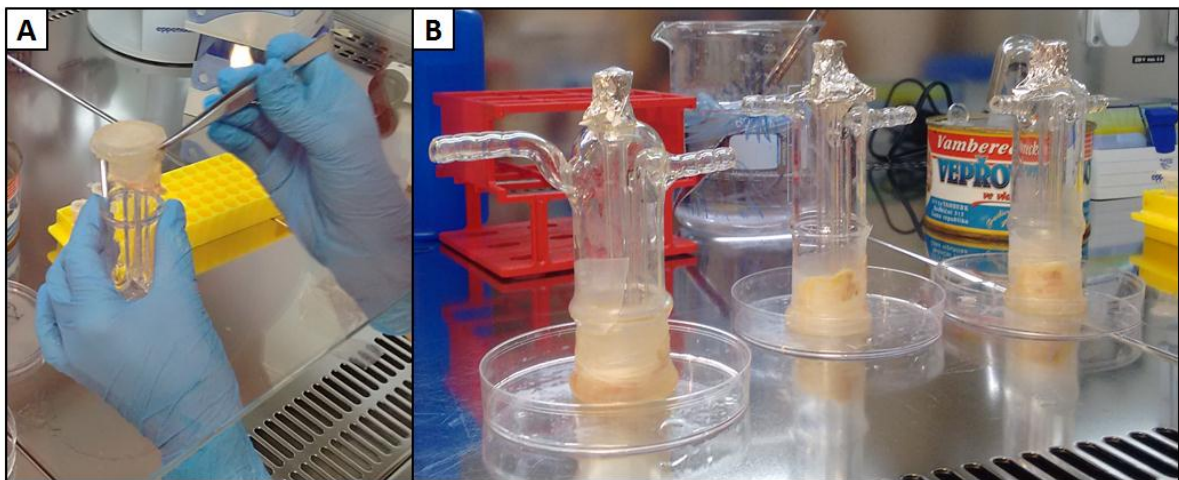


Figura 6: Alimentador artificial de vidro. **A:** Membrana de *G. (g.) domesticus* jovem sendo colocada cuidadosamente no alimentador artificial. **B:** Alimentadores artificiais prontos para serem preenchidos com sangue contendo promastigotas de *Leishmania*. (Fonte: Agna C. Guimarães).

Em seguida, os três alimentadores contendo sangue com parasitos foram levados para um infectório com temperatura controlada a 28° C. Cada alimentador foi acoplado a um suporte separadamente. Entre as aberturas laterais de cada sistema foram conectadas mangueiras finas que bombeava água através de um banho a 37° C, fazendo com que ela aquecesse o sangue e mimetizasse a temperatura do corpo de um hospedeiro vertebrado. À parte inferior do recipiente de vidro revestida com a pele de pintinho foi colocada uma gaiola de nylon ou voal contendo cerca de 300 fêmeas de *P. papatasi* e 200 fêmeas de *L. longipalpis*,

permitindo dessa forma, que as fêmeas fossem atraídas pelo calor e se alimentassem com sucesso (Figura 7). O tempo de alimentação foi de 2 horas.

Já é sabido que as taxas de alimentação no alimentador artificial são geralmente mais baixas do que no hospedeiro vertebrado, por isso, para suprir esta queda às fêmeas separadas um dia antes do experimento foram deixadas sem alimentação açucarada (50% sacarose) e durante a infecção experimental foram estimuladas pela respiração humana (CO_2) e mantidas no escuro (Volf & Volfova, 2011).

Depois de passado o período de repasto, as fêmeas alimentadas foram separadas vivas com ajuda de um aspirador bucal, contadas e transferidas para uma nova gaiola de filó. Elas foram mantidas em uma estufa, reservada para insetos infectados, com temperatura controlada entre 23 a 26° C e receberam alimento através de solução açucarada (50% sacarose). No intervalo de 1, 5 e 8 dias após a infecção, as fêmeas foram dissecadas e examinadas.

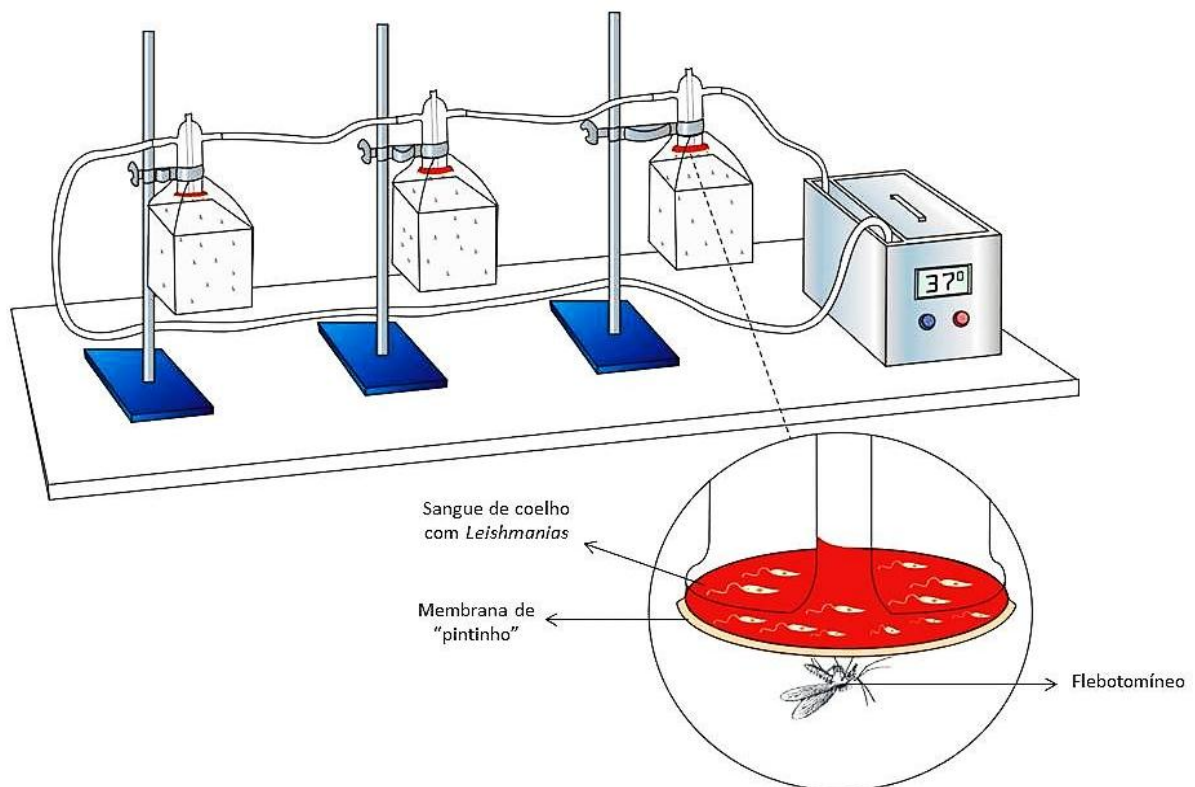


Figura 7: Esquema representativo do processo de infecção experimental “*in vivo*” com uso de alimentador artificial. Detalhe do alimentador artificial, em maior aumento, revestido por pele de *G. g. domesticus* jovem (“pintinho”) contendo sangue de coelho inativado com promastigotas de *Leishmania*, concentração final de 10^6 promastigotas/mL (Fonte: Agna C. Guimarães).

4.3.5. Dissecação de fêmeas infectadas

No intervalo após 1, 5 e 8 dias da infecção experimental, algumas fêmeas alimentadas foram coletadas com aspirador bucal e transferidas para um recipiente de plástico com tampa de filó. Para anestésias as fêmeas, o recipiente foi colocado no gelo durante o procedimento de dissecação.

Cada inseto imobilizado foi colocado em uma lâmina de microscopia contendo duas gotas de solução salina estéril. A dissecação foi feita em microscópio estereoscópico com auxílio de estiletes de ponta fina e curva. Na primeira gota foram retiradas as antenas, as pernas e as asas. O restante do corpo do inseto foi transferido para a segunda gota onde um dos estiletes ficou apoiado na cabeça e com o outro foi feito dois cortes na porção final do abdômen (últimos tergitos), o qual foi puxado com movimentos leves, trazendo o tubo digestório para fora do corpo do flebotômico. O intestino foi transferido para uma nova lâmina com uma gota de tampão Tris-NaCl e examinado “*in situ*” em microscópio óptico para avaliar a presença, localização e taxa de infecção por *Leishmania*.

A densidade de parasitos encontrados no intestino médio dos insetos foi estimada por um profissional treinado e classificada em quatro categorias: negativa (nenhum parasito), baixa (<100 parasitos por intestino), moderada (100 a 1000 parasitos por intestino) e alta (>1000 parasitos por intestino) (Myskova et al., 2008).

4.3.6. Morfometria dos parasitos

Após avaliação da densidade de parasitos no intestino médio de cada fêmea dissecada, foi realizado um esfregaço com ajuda de uma lâmina por aposição, causando o rompimento do intestino médio. Para fixar o material foi adicionado metanol (100%) e aguardado até sua completa secagem. Em seguida, as lâminas foram coradas em corante Giemsa durante 20 minutos, lavadas com água destilada e colocadas para secar.

Em microscópio óptico ao aumento da objetiva de imersão (100x) foram examinadas 3 lâminas para cada combinação cepa-vetor, sendo um total de 18 lâminas por experimento em cada tempo de dissecação (1º, 5º e 8º dia após a infecção). Com o auxílio de uma câmara D70 Olympus, acoplada ao microscópio, foram fotografados aleatoriamente 40 campos com parasitos em uma lâmina. Em cada combinação cepa-vetor foram fotografadas 120 promastigotas, totalizando 720 campos por experimento (1, 2 e 3) em cada tempo de dissecação. Por fim, foram fotografados e analisados 6480 parasitos.

Para avaliação das transformações morfológicas ocorridas pelo parasito dentro do vetor foi utilizado o *software* ImageJ. Neste foram medidos comprimento do corpo, comprimento do flagelo e largura do corpo de cada *Leishmania* fotografada. As formas morfológicas adquiridas foram distinguidas em promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas e metacíclicas com base nos critérios de Cihakova & Volf (1997).

4.4. Comitê de Ética

Os animais utilizados nos experimentos de infecções em flebotomíneos foram mantidos e manuseados na unidade animal da Universidade Charles, em Praga, em conformidade com as orientações e Legislação Tcheca (Lei n.º 246/1992 e 359/2012 relativa à proteção dos animais contra crueldade nos presentes estatutos em geral), que cumpre todas as orientações comunitárias aplicáveis aos animais de experimentação. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentos de Laboratório da Universidade Charles, em Praga e foram realizados sob o Certificado de Competência (Número de registro: CZ 03069).

4.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos após a avaliação da taxa de infecção, localização e morfometria dos parasitos das cepas avaliadas no intestino médio de *L. longipalpis* e *P. papatasi* foram gerados por colaboradores do Laboratório de Biologia de Vetores, do Departamento de Parasitologia da Universidade Charles em Praga, os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Qui-quadrado (χ^2) e análise de variância utilizando o *software* SPSS Statistics 23. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de crescimento

Cada cepa apresentou um padrão de crescimento particular sendo a cepa BH121 a que alcançou maiores densidades ($5,6 \times 10^7$ parasitos/mL). As outras cepas variaram entre $2,6 \times 10^7$ parasitos/mL (FV1 e BH129) a $3,5 \times 10^7$ parasitos/mL (BH49). Por esta razão, a extração dos LPGs foi realizada entre os dias 4-5 para a cepa BH121, dias 6-8 para as cepas FV1 e BH129 e entre os dias 8-10 para BH49 (Figura 8).

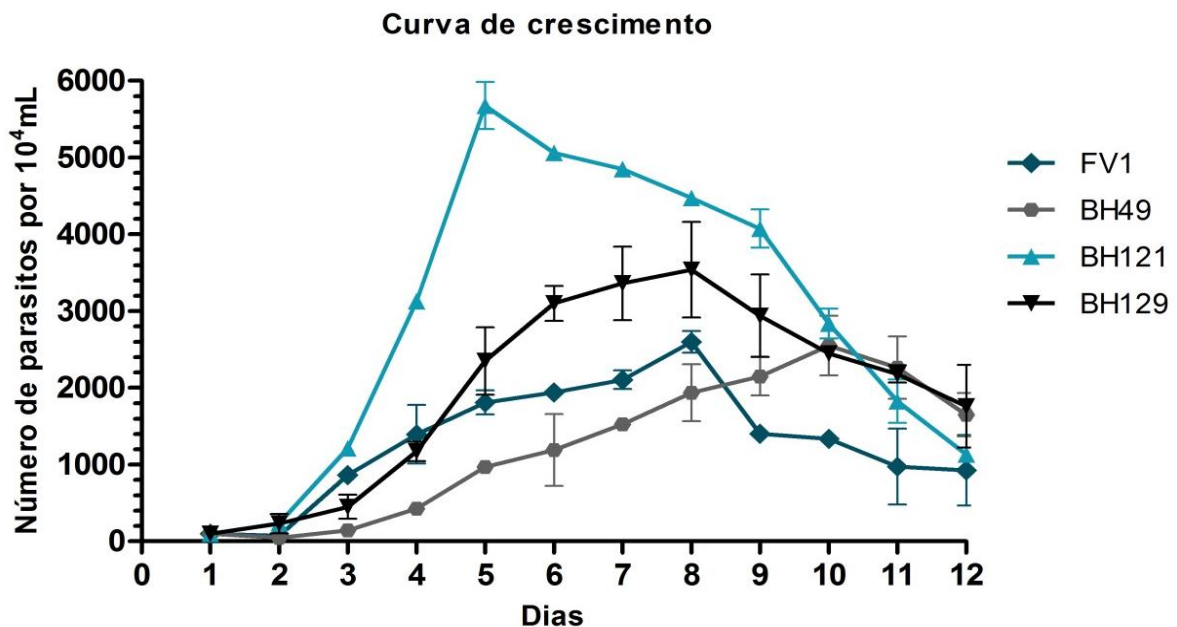


Figura 8: Curvas de crescimento tempo dependente das formas promastigotas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) cultivadas em meio M199 acrescido de 10% SFB a 26° C.

5.2. PCR-RFLP do *hsp70*

Após a tipagem das cepas pela reação de PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70*, os perfis de restrição de *L. major*-like obtidos no gel foram idênticos àquele observado para a cepa referência de *L. major* (Figura 9, canaletas 5 a 8).

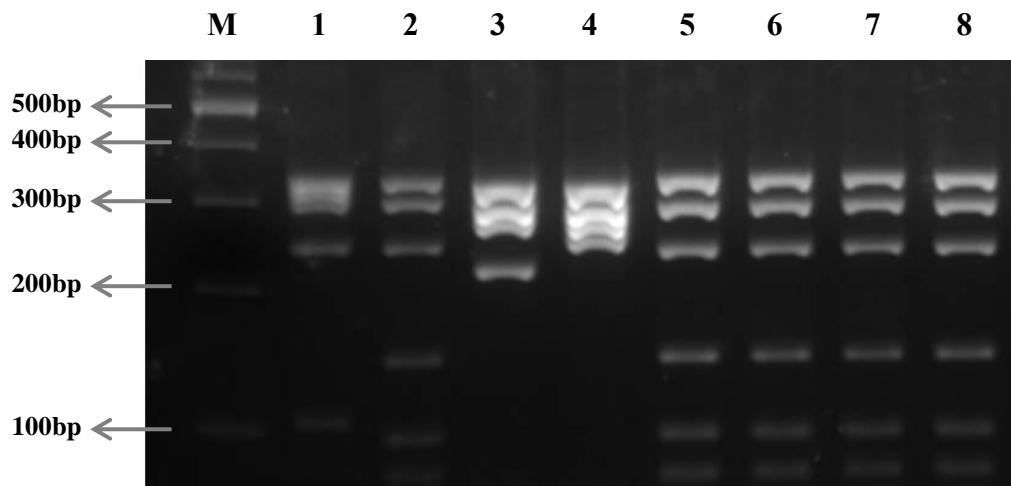


Figura 9: Resultado do perfil de digestão utilizando a enzima *HaeIII* do fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de amostras isoladas em cultura. M – marcador de peso molecular de 100bp; 1-cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8); 2-cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 3-cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 4-cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 5-cepa referência *L. major* (MHOM/IL/1980/Friedlin); 6-*L. major*-like BH49; 7-*L. major*-like BH121; 8-*L. major*-like BH129.

5.3. *Stains-All*

Todas as amostras de LPGs purificados foram coradas pela técnica de *Stains-All* (Figura 10). A purificação pode ser observada no gel de poliácridamida, através dos arrastes presentes em todas as amostras avaliadas. A cepa BH129 demonstrou ter uma menor concentração de material disponível em volume pré-determinado, por isso de acordo com a dosagem obtida em cada amostra foi padronizado o valor de 10 µg que foram suficientes para realização das técnicas de *Dot Blot* e *Western Blot*.

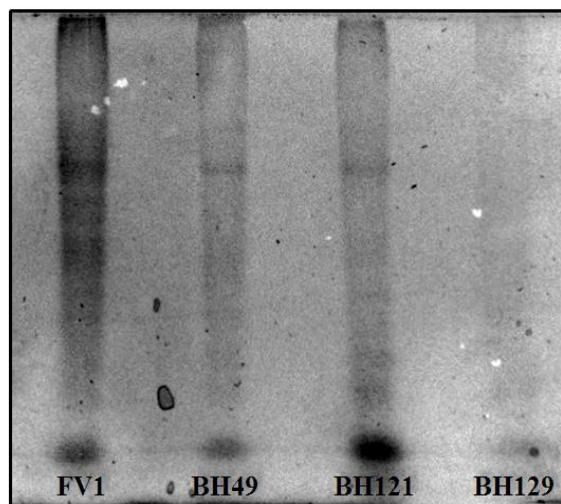


Figura 10: LPGs purificados das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) corados pela técnica de *Stains-All*.

5.4. Dot Blot e Western Blot

Os LPGs purificados das cepas de *L. major*-like foram reconhecidos pelo anticorpo WIC 79.3, específico para Gal terminal (β 1,3) em diferentes níveis de galactosilação. O anticorpo reagiu fortemente com as cepas BH49, BH129 e com o controle FV1, porém reconheceu fracamente o LPG da cepa BH121 (Figura 11).

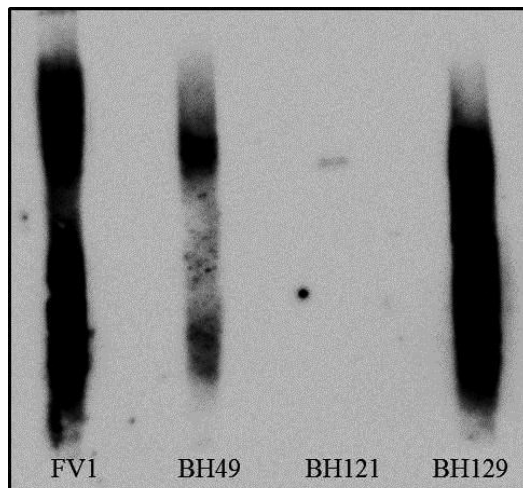


Figura 11: *Western Blot* de LPG purificado (10 μ g) das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo WIC 79.3 (1:1000).

Os LPGs purificados das cepas de *L. major*-like, também foram submetidos a um *Western Blot* utilizando o anticorpo 3F12, específico para Ara (β 1,2). Apenas os LPGs da cepa controle FV1 e da cepa BH129 reagiram com o anticorpo, demonstrando ter em suas cadeias laterais resíduos de arabinose (Figura 12).

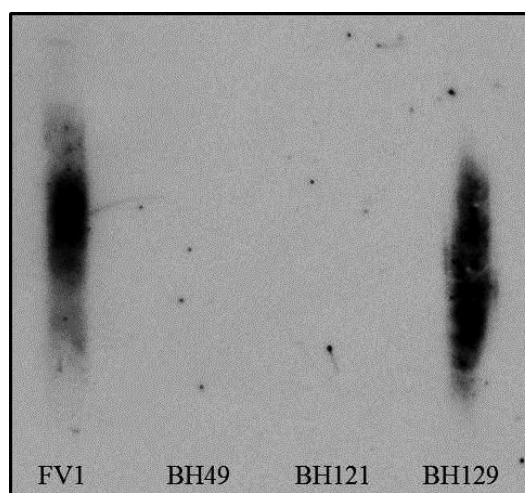


Figura 12: *Western Blot* de LPG purificado (10 μ g) das cepas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo 3F12 (1:1000).

De acordo com os experimentos de *Western Blot*, os LPGs das cepas de *L. major*-like demonstraram um polimorfismo intraespecífico, tendo em suas cadeias laterais resíduos de carboidratos diferentes umas das outras. Dessa forma, as cepas de *L. major*-like e a cepa controle de *L. infantum* (Ba262) foram submetidos a um *Dot Blot* utilizando o anticorpo CA7AE (1:1000) que reconhece as unidades repetitivas de Gal(β 1,4)-Man(α 1)-PO₄ comuns a todos os LPGs de *Leishmania*. O anticorpo reagiu fortemente com o controle Ba262 (*L. infantum*) e com as cepas BH121 e BH129, porém não reagiu com a cepa BH49 (Figura 13).

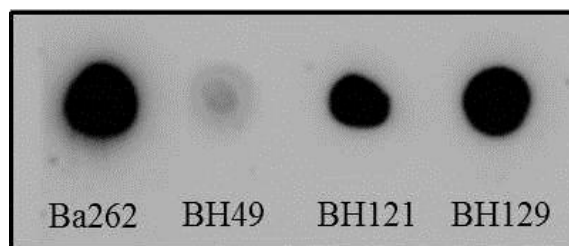


Figura 13: *Dot Blot* de LPG purificado (10 μ g) das cepas de *L. infantum* (Ba262) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000).

5.5. Infecção experimental das cepas de *L. major*-like e *L. major* em *L. longipalpis* e *P. papatasi*

5.5.1. Densidade das infecções

Após a alimentação artificial, as fêmeas de flebotomíneos foram dissecadas e avaliadas no 1º, 5º e 8º dias pós-infecção. Todas as cepas de *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) foram capazes de infectar ambos os vetores, *L. longipalpis* do Novo Mundo e *P. papatasi* do Velho Mundo.

A cepa BH129 apresentou uma maior intensidade de parasitos no intestino médio das fêmeas dissecadas (82 a 100%), entre os dias avaliados. A densidade da infecção aumentou progressivamente desde o 1º dia pós-infecção e a partir do 5º dia, foi observado um aumento considerável de parasitos (>1000 parasitos por intestino) presentes no intestino médio dos vetores.

Foram observadas diferenças significativas na taxa de infecção ($P < 0,05$) entre as combinações *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH129 ($P < 0,05$) e entre as combinações *P.*

papatasi-FV1 e *P.papatasi*-BH129 ($P<0,02$) avaliados no 1º dia após alimentação (representadas pela linha com asterisco) (Figura 14).

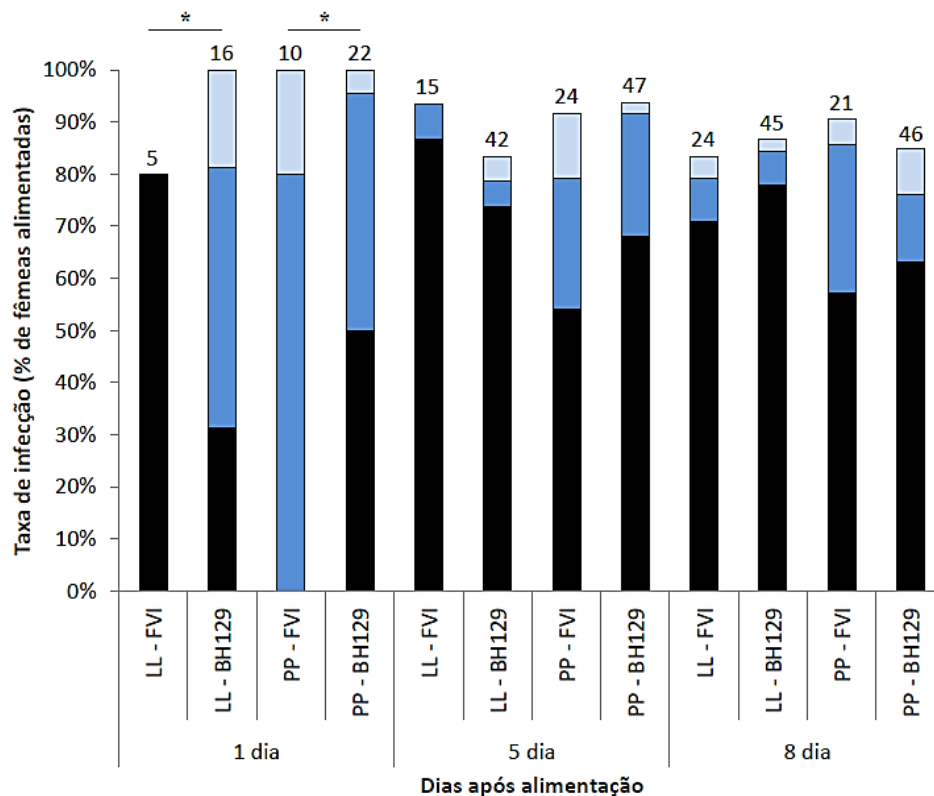


Figura 14: Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH129). As fêmeas dissecadas foram avaliadas em microscópio óptico no 1º, 5º e 8º dia pós-alimentação e a intensidade de parasitos foi classificada em três categorias: ■ baixa (<100 parasitos/intestino), ■ moderada (100-1000 parasitos/intestino), ■ alta (>1000 parasitos/intestino). Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Diferenças estatísticas (valor de $P<0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

Entre os dias avaliados, a cepa BH49 apresentou uma variação de 65 a 100% na taxa de infecção. Semelhante ao observado pela cepa BH129, a intensidade da infecção pela cepa BH49, também aumentou consideravelmente após o 5º dia de dissecação (>1000 parasitos por intestino), período em que os parasitos provavelmente já venceram as condições adversas da matriz peritrófica e se aderiram no intestino médio dos flebotomíneos. Diferença estatística significativa foi observada apenas no 8º dia pós-infecção entre as combinações *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH49 ($P=0,043$) (Figura 15).

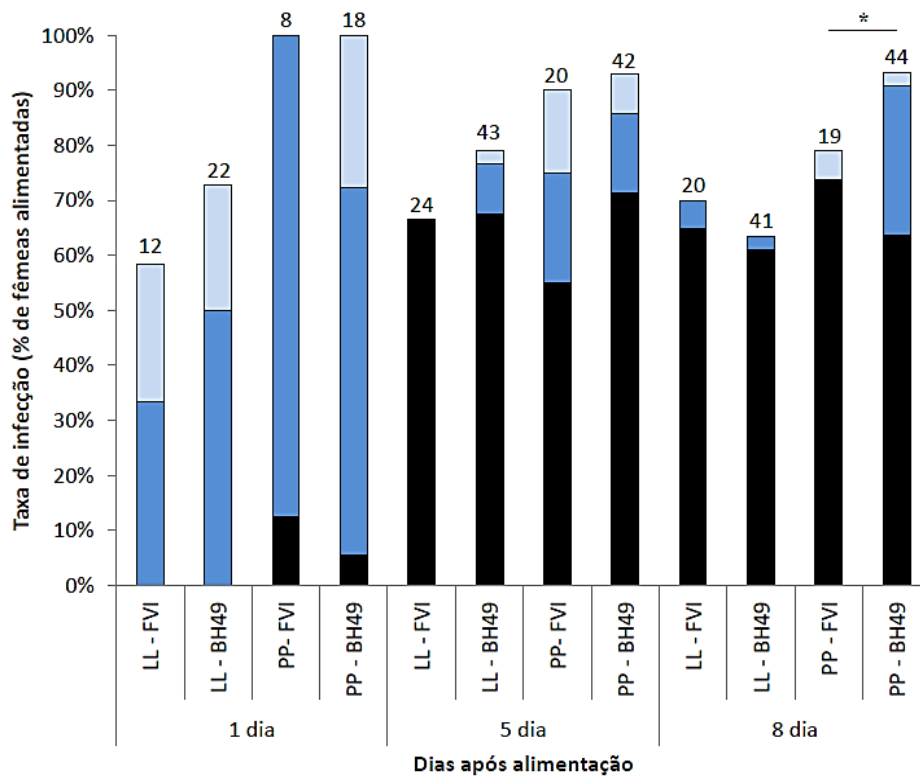


Figura 15: Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH49). As fêmeas dissecadas foram avaliadas em microscópio óptico no 1º, 5º e 8º dia pós-alimentação e a intensidade de parasitos foi classificada em três categorias: ■ baixa (<100 parasitos/intestino), ■ moderada (100-1000 parasitos/intestino), ■ alta (>1000 parasitos/intestino). Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Diferenças estatísticas (valor de $P < 0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

Diferentemente do observado pelas cepas anteriores, a cepa BH121 demonstrou um perfil de infecção menor entre os dias avaliados. A taxa de infecção variou de 55 a 95% e foi menos intensa quando comparado ao controle (FV1). A intensidade de promastigotas variou de baixa (<100 parasitos por intestino) a moderada (100 a 1000 parasitos por intestino) no intestino médio de ambos os vetores, *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP).

Foram observadas diferenças significativas em todas as combinações cepa-vetor ($P < 0,05$). No 1º dia após alimentação, entre *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,05$); *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,019$). No 5º dia, entre *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,0001$); *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,0001$). E no 8º dia, entre as combinações *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,003$); *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,0001$) (Figura 16).

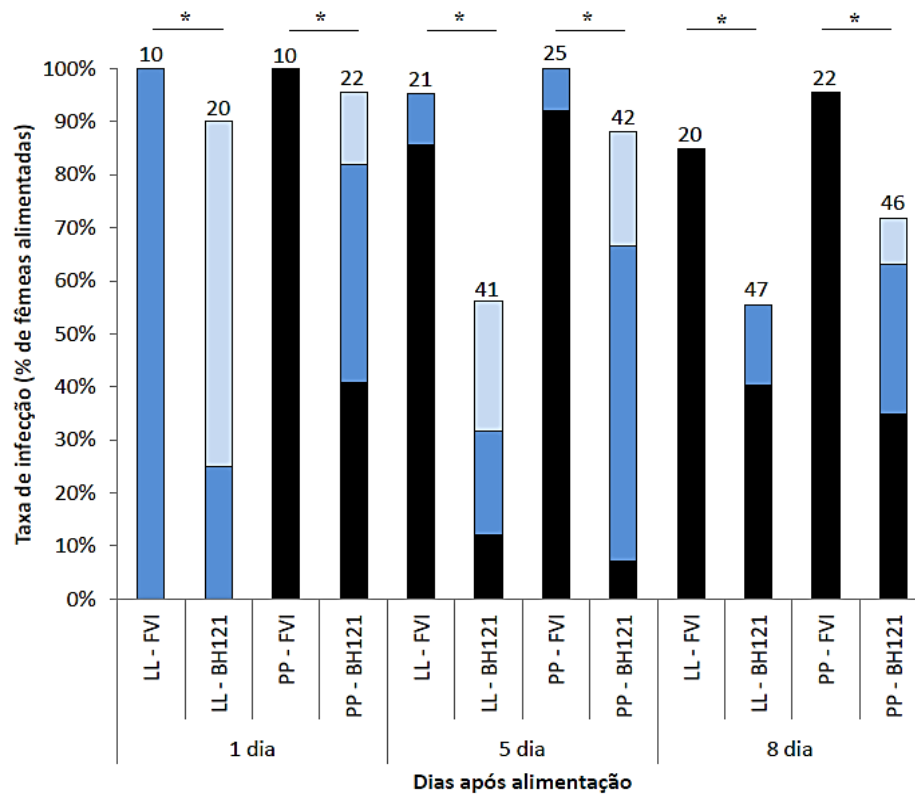


Figura 16: Taxa de infecção no intestino médio de *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP) por promastigotas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH121). As fêmeas dissecadas foram avaliadas em microscópio óptico no 1º, 5º e 8º dia pós-alimentação e a intensidade de parasitos foi classificada em três categorias: ■ baixa (<100 parasitos/intestino), ■ moderada (100-1000 parasitos/intestino), ■ alta (>1000 parasitos/intestino). Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Diferenças estatísticas (valor de $P < 0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

5.5.2. Localização dos parasitos no intestino dos vetores

Em relação à localização dos parasitos das cepas de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH49, BH121 e BH129) durante a infecção, foi possível verificar que todas as cepas avaliadas tiveram um desenvolvimento regular no trato digestório de *L. longipalpis* e *P. papatasi*. No 1º dia de dissecação, todos os parasitos foram vistos no espaço endoperitrófico (matriz peritrófica). A partir do 5º dia, as *Leishmanias* foram vistas em toda extensão do trato digestório (intestino médio abdominal, torácico, cárdia e válvula do estomodeu). Já no 8º dia, foi observada uma diferença na quantidade de promastigotas colonizando a região da válvula do estomodeu. A cepa BH49 e BH129 demonstraram uma maior porcentagem de parasitos neste local (Figura 17 e 18) do que a cepa BH121 (Figura 19). A partir do 5º dia pós-infecção, em todas as combinações cepa-vetor, *L. longipalpis* demonstrou uma maior concentração de promastigotas na válvula do estomodeu do que *P. papatasi*.

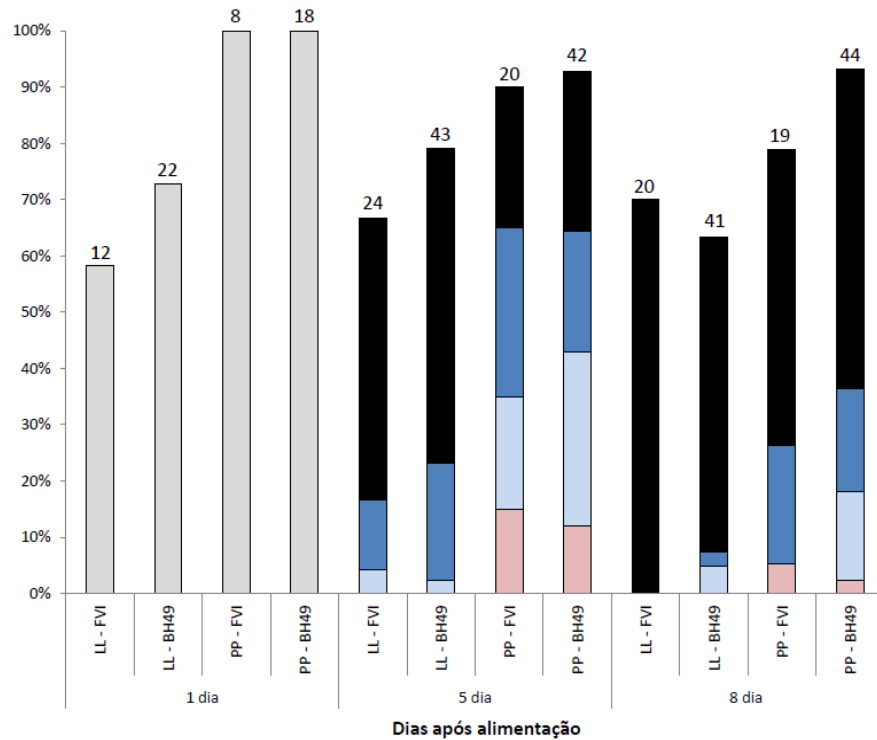


Figura 17: Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH49) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1°, 5° e 8° dia após alimentação artificial. Os locais avaliados foram separados em: ■ válvula do estomodeu; ■ intestino médio abdominal, torácico e cárdia; ■ intestino médio abdominal e torácico; ■ intestino médio abdominal; ■ espaço endoperitrófico. Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

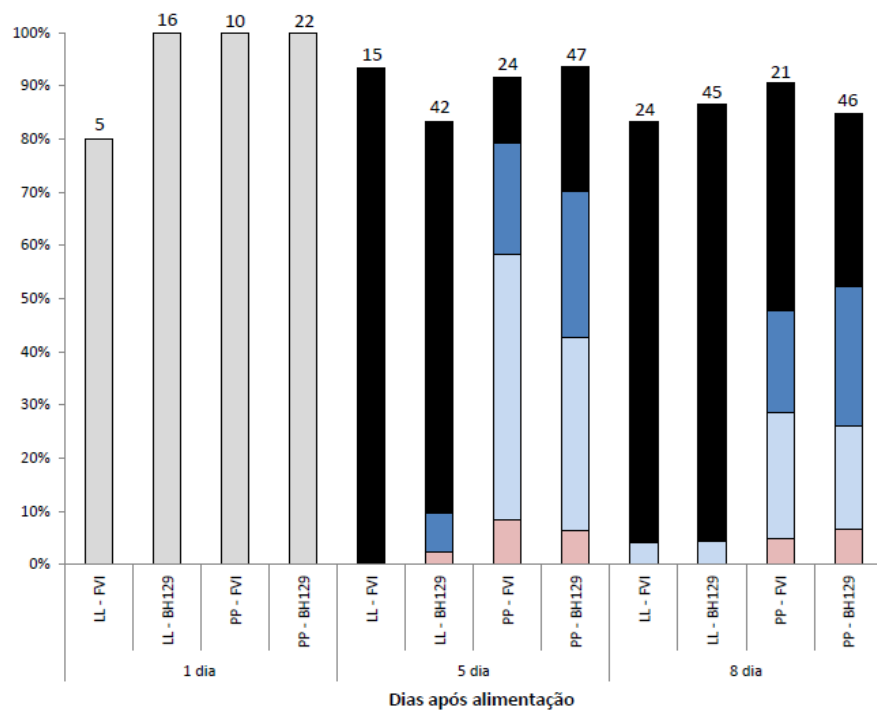


Figura 18: Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH129) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1°, 5° e 8° dia após alimentação artificial. Os locais avaliados foram separados em: ■ válvula do estomodeu; ■ intestino médio abdominal, torácico e cárdia; ■ intestino médio abdominal e torácico; ■ intestino médio abdominal; ■ espaço endoperitrófico. Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

Dentre as cepas, a BH121 demonstrou uma menor colonização da válvula do estodomeu no 8º dia pós-infecção, com uma quantidade de promastigotas maior (~35%) em *L. longipalpis* do que em *P. papatasi* (~15%). Diferenças significativas foram observadas entre as combinações cepa-vetor a partir do 5º dia após alimentação, em *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,0001$); *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,02$). No 8º dia após alimentação foram observadas diferenças em *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,01$); *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,0001$) (Figura 19).

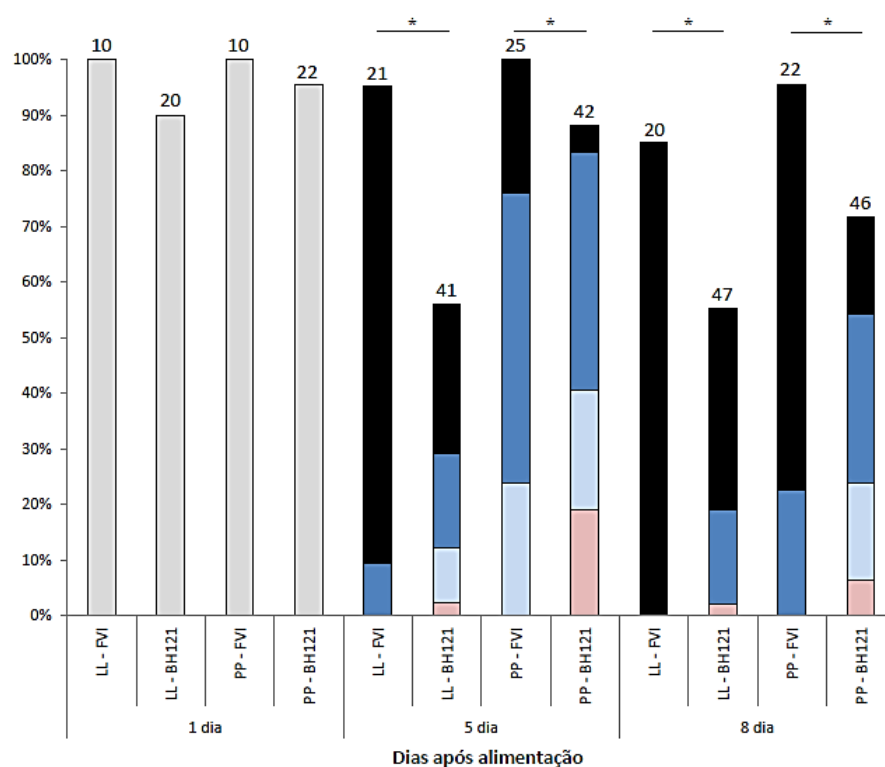


Figura 19: Localização dos parasitos de *L. major* (controle FV1) e *L. major*-like (BH121) durante a infecção em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP), avaliados em microscópio óptico durante 1º, 5º e 8º dia após alimentação artificial. Os locais avaliados foram separados em: ■ válvula do estodomeu; ■ intestino médio abdominal, torácico e cárdia; ■ intestino médio abdominal e torácico; ■ intestino médio abdominal; ■ espaço endoperitrófico. Os números acima das barras indicam a quantidade total de fêmeas dissecadas. Diferenças estatísticas (valor de $P < 0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

5.5.3. Diferenciação morfológica dos parasitos durante o desenvolvimento nos vetores

Após observação da taxa de infecção e localização da porcentagem de flagelados nas localidades do intestino dos vetores, os parasitos foram fixados em lâmina e corados para avaliação da morfometria. Estes foram diferenciados conforme as medidas do comprimento do corpo, comprimento do flagelo e largura do corpo e, posteriormente, classificados em promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas e metacíclicas. Nas figuras 20, 21, 22 e

23 estão representadas, respectivamente, algumas formas das cepas FV1 (*L. major*), BH49, BH121 e BH129 (*L. major*-like) presentes no intestino dos vetores avaliados, durante os oito dias de infecção experimental.

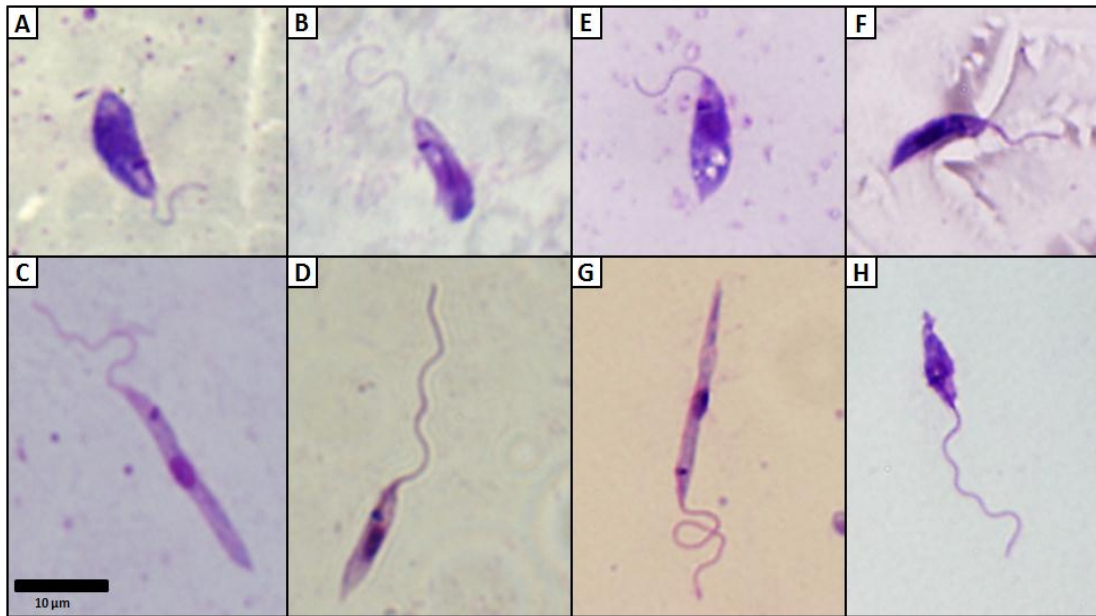


Figura 20: Morfologia da cepa FV1 (*L. major*) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H). (A e E) promastigotas procíclicas; (B e F) leptomonadas; (C e G) nectomonadas; (D e H) metacíclicas. Os esfregaços em lâmina foram fixados em metanol e corados com corante Giemsa. As imagens foram adquiridas pelo *software* ImageJ em 1360x1024 pixels/97.00x13.03 μm e escala = 10 μm .

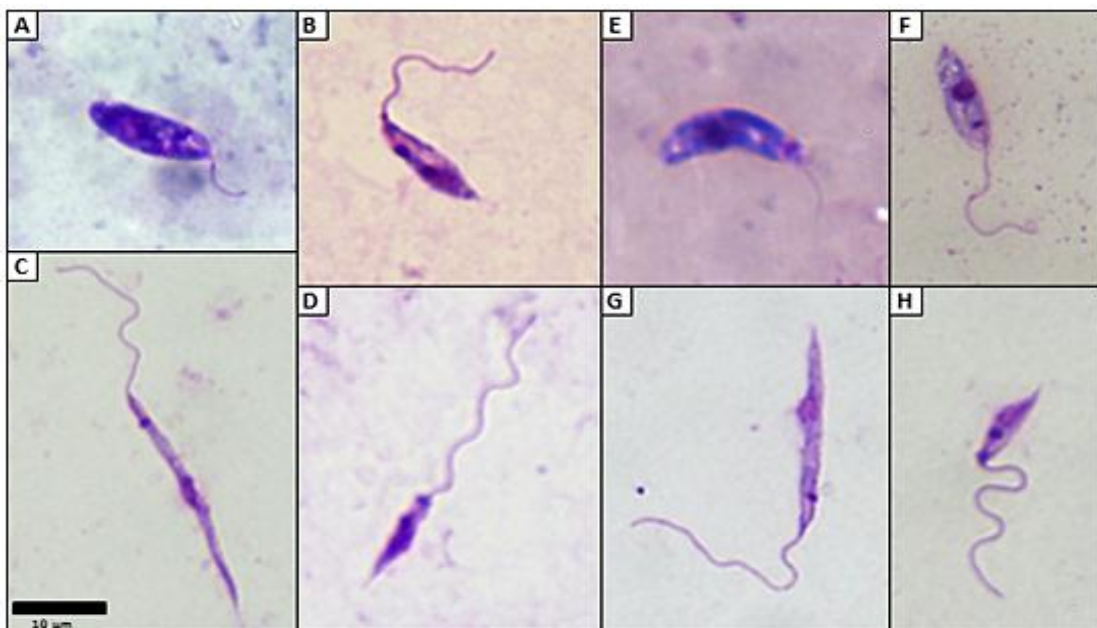


Figura 21: Morfologia da cepa BH49 (*L. major*-like) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H). (A e E) promastigotas procíclicas; (B e F) leptomonadas; (C e G) nectomonadas; (D e H) metacíclicas. Os esfregaços em lâmina foram fixados em metanol e corados com corante Giemsa. As imagens foram adquiridas pelo *software* ImageJ em 1360x1024 pixels/97.00x13.03 μm e escala = 10 μm .

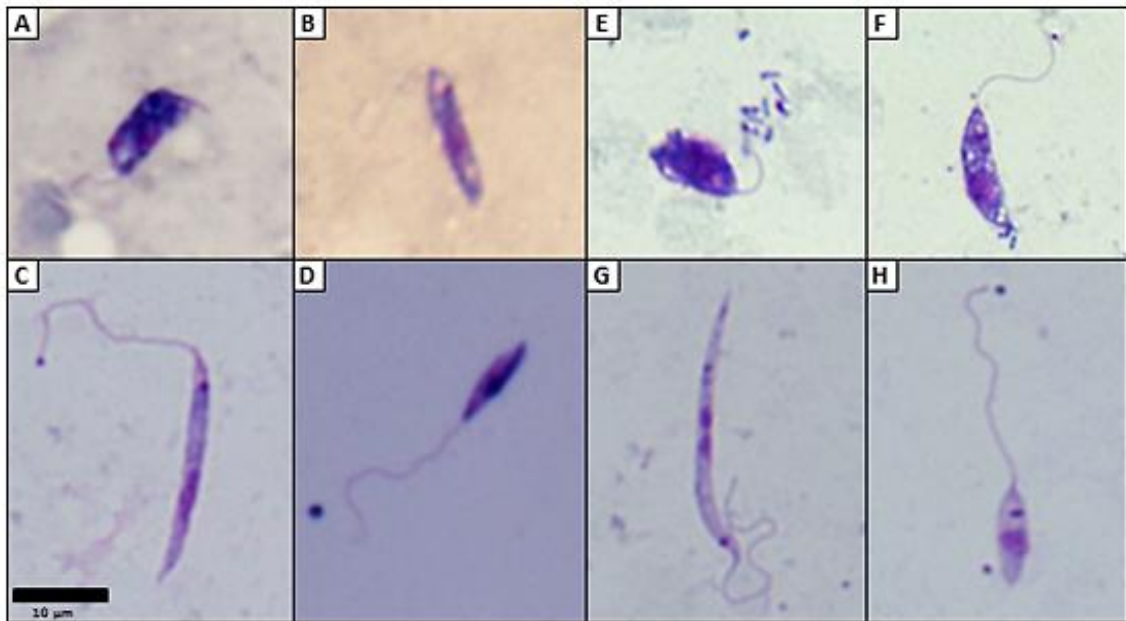


Figura 22: Morfologia da cepa BH121 (*L. major*-like) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H). (A e E) promastigotas procíclicas; (B e F) leptomonadas; (C e G) nectomonadas; (D e H) metacíclicas. Os esfregaços em lâmina foram fixados em metanol e corados com corante Giemsa. As imagens foram adquiridas pelo *software* ImageJ em 1360x1024 pixels/97.00x13.03 µm e escala = 10 µm.

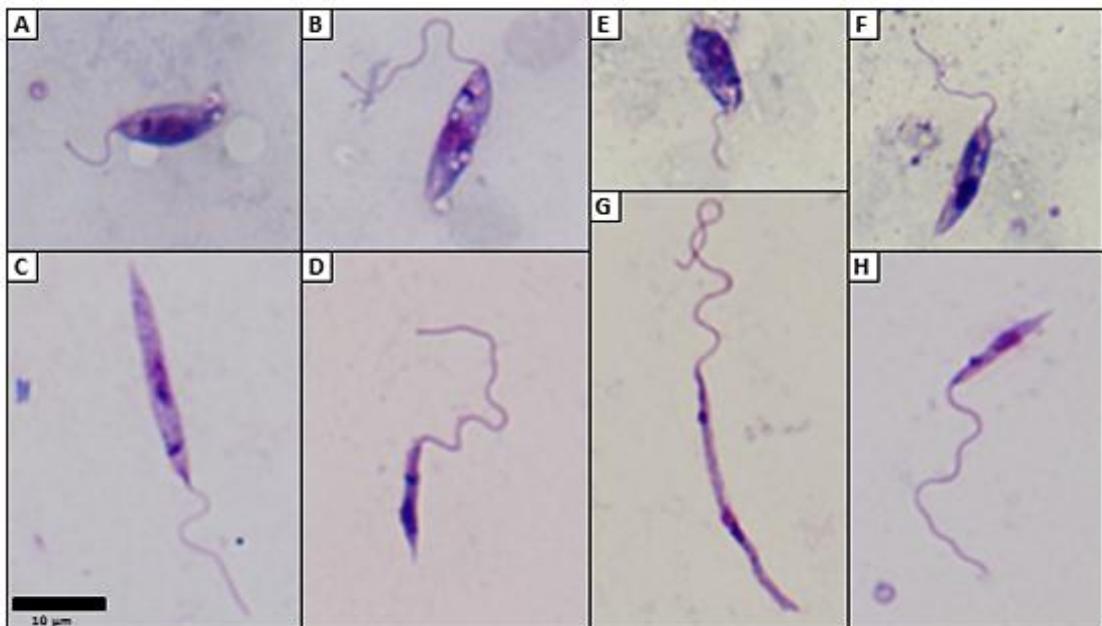


Figura 23: Morfologia da cepa BH129 (*L. major*-like) presentes no intestino de *L. longipalpis* (A-B-C-D) e *P. papatasi* (E-F-G-H). (A e E) promastigotas procíclicas; (B e F) leptomonadas; (C e G) nectomonadas; (D e H) metacíclicas. Os esfregaços em lâmina foram fixados em metanol e corados com corante Giemsa. As imagens foram adquiridas pelo *software* ImageJ em 1360x1024 pixels/97.00x13.03 µm e escala = 10 µm.

Em relação à porcentagem dos morfotipos de *Leishmania* da cepa BH49, as formas promastigotas procíclicas foram mais abundantes (~55%) no início da infecção, quando comparadas à cepa controle, em ambos os vetores. As formas metacíclicas foram encontradas

em todos os dias e combinações cepa-vetor, estando em maior evidência no 8º dia em *L. longipalpis*-BH49 (17%) e *P. papatasi*-BH49 (20%).

A infecção pela cepa BH49 quando comparada ao controle apresentou diferenças estatisticamente significativas na quantidade de formas nectomonadas encontradas no 1º e 5º dia pós-infecção, em *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH49 ($P < 0,02$). No 8º dia, foram observadas diferenças significativas na quantificação das formas leptomonadas e nectomonadas em combinações das cepas FV1 e BH49 com *L. longipalpis* ($P < 0,02$) e nas formas nectomonadas e metacíclicas com *P. papatasi* ($P < 0,01$) (Figura 24).

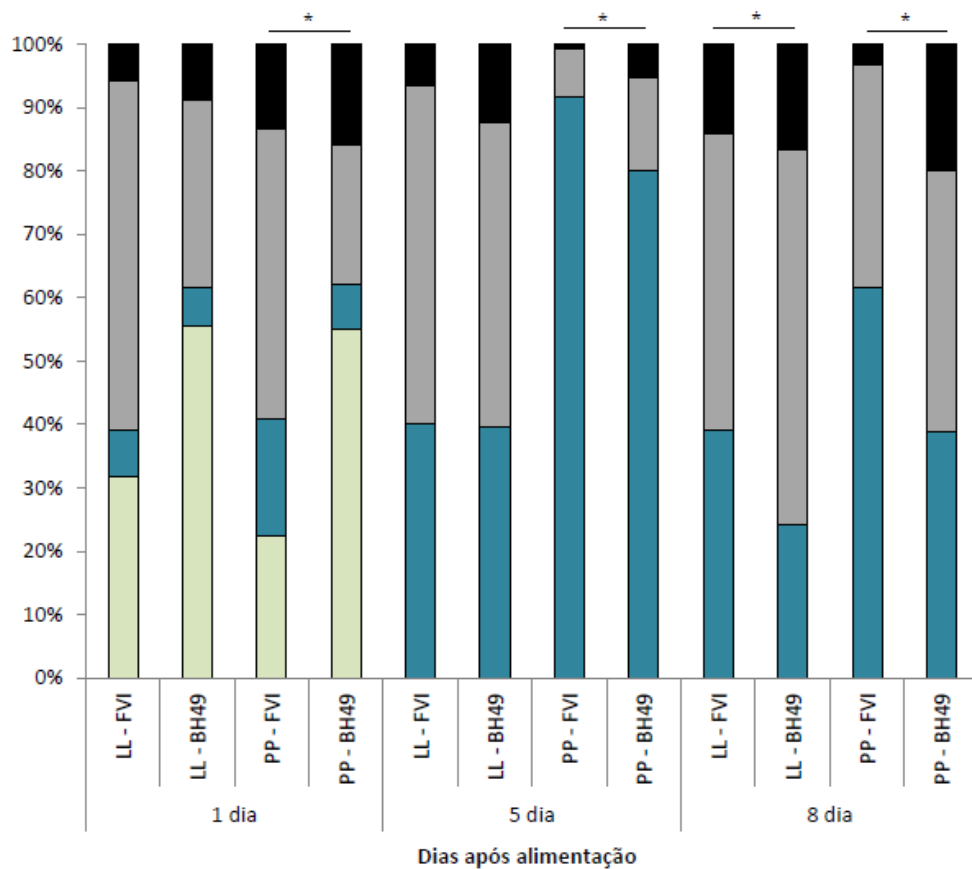


Figura 24: Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH49) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP). Os flebotomíneos foram avaliados no 1º, 5º e 8º dia após alimentação. As barras demonstram a porcentagem de cada forma encontrada e as cores representam: ■ promastigotas procíclicas; ■ nectomonadas; ■ leptomonadas; ■ metacíclicas. Diferenças estatísticas (valor de $P < 0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

Quando se avaliou a porcentagem dos morfotipos de *Leishmania* da cepa BH121, as formas promastigotas procíclicas foram encontradas em pequena quantidade (~34%) no início da infecção. Neste mesmo período, foi constatada uma maior quantidade de formas leptomonadas (~55%), com uma diminuição das mesmas ao longo dos dias avaliados. Houve uma prevalência de formas nectomonadas a partir do 5º dia pós-infecção, sendo que no 8º dia

demonstrou uma grande quantidade destes parasitos nas combinações *L. longipalpis*-BH121 (77%) e *P. papatasi*-BH121 (79%). Um fato interessante foi que poucas formas metacíclicas foram observadas no último dia avaliado (~5%).

A infecção pela cepa BH121 quando comparada ao controle apresentou diferenças significativas na quantidade de formas leptomonadas e nectomonadas prevalentes no 1º dia em *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH121 ($P < 0,02$) e 5º dia em *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH121 ($P < 0,01$). No 8º dia pós-infecção, foram observadas diferenças estatísticas na quantificação das formas leptomonadas, nectomonadas e metacíclicas em todas as combinações cepa-vetor ($P < 0,01$) (Figura 25).

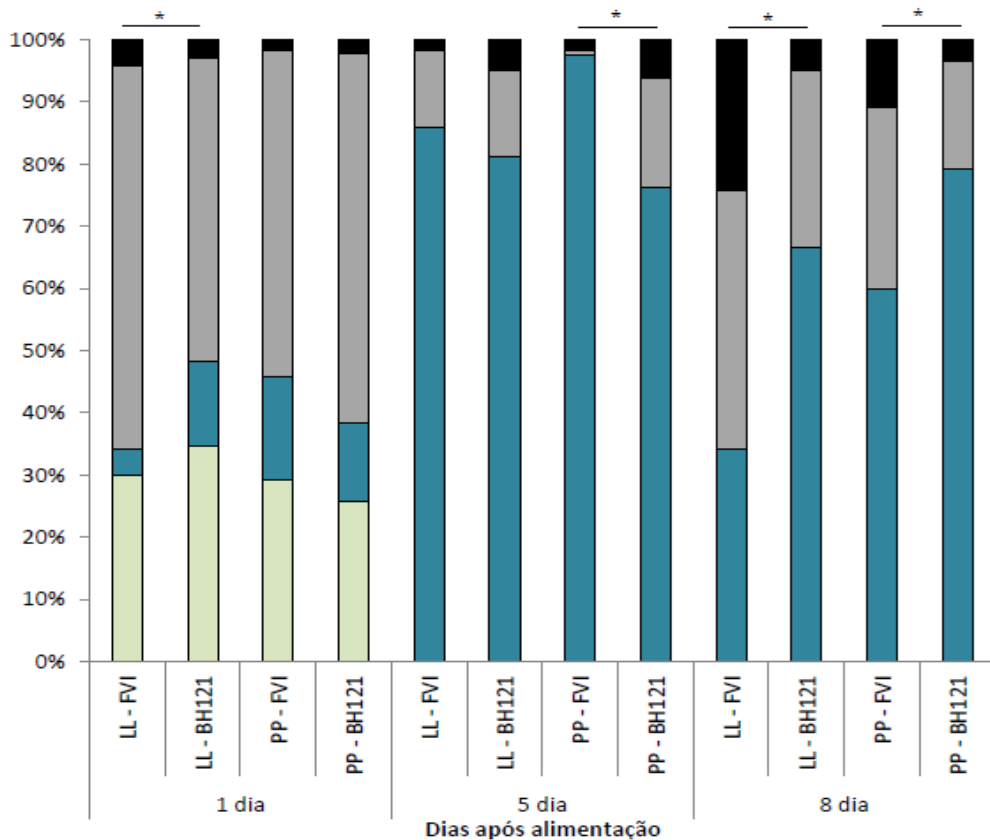


Figura 25: Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH121) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP). Os flebotomíneos foram avaliados no 1º, 5º e 8º dia após alimentação. As barras demonstram a porcentagem de cada forma encontrada e as cores representam: ■ promastigotas procíclicas; ■ nectomonadas; ■ leptomonadas; ■ metacíclicas. Diferenças estatísticas (valor de $P < 0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

Em relação às formas encontradas na avaliação da cepa BH129, promastigotas procíclicas demonstraram uma menor quantidade (~35%) em relação às formas leptomonadas (~55%), no 1º dia pós-infecção. Formas metacíclicas foram observadas em todos os dias e combinações cepa-vetor, sendo que no último dia demonstrou uma porcentagem maior na

combinação *L. longipalpis*-BH129 (43%) em relação as outras cepas de *L. major*-like (BH49 e BH121) e ao controle FV1.

A infecção pela cepa BH129 quando comparada ao controle apresentou diferenças estatísticas em todas as combinações *Leishmania*-vetor. No 1º dia, foram observadas diferenças significativas nas formas nectomonadas em *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH129 ($P<0,05$) e nas formas metacíclicas em *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH129 ($P<0,02$). No 5º dia, foram observadas diferenças nas formas leptomonadas, nectomonadas e metacíclicas em *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH129 ($P<0,01$) e nas formas leptomonadas e nectomonadas em *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH129 ($P<0,02$). No último pós-infecção, apresentaram diferenças estatísticas entre as formas leptomonadas e metacíclicas nas combinações *L. longipalpis*-FV1 e *L. longipalpis*-BH129 ($P<0,01$) e nas formas metacíclicas em *P. papatasi*-FV1 e *P. papatasi*-BH129 ($P<0,05$) (Figura 26).

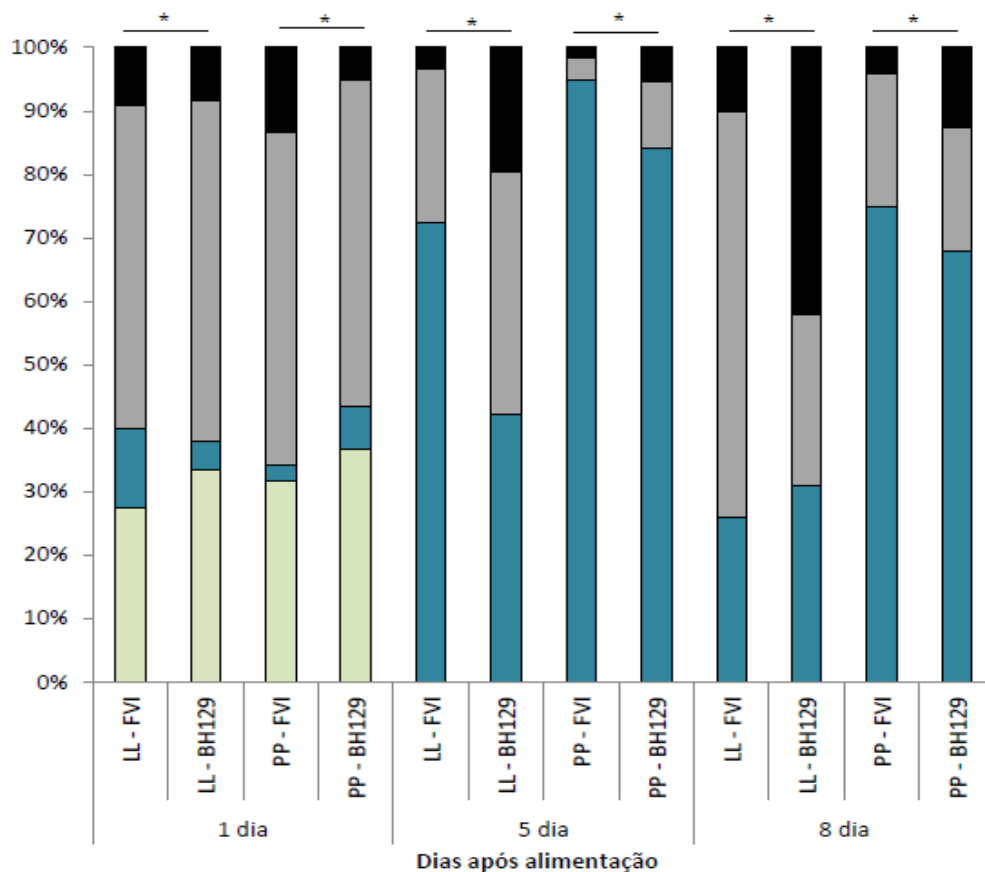


Figura 26: Diferenciação entre as formas de *L. major* (FV1) e *L. major*-like (BH129) durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (LL) e *P. papatasi* (PP). Os flebotomíneos foram avaliados no 1º, 5º e 8º dia após alimentação. As barras demonstram a porcentagem de cada forma encontrada e as cores representam: ■ promastigotas procíclicas; ■ nectomonadas; ■ leptomonadas; ■ metacíclicas. Diferenças estatísticas (valor de $P<0,05$) estão representadas entre os grupos pela linha com asterisco (*).

6. DISCUSSÃO

O conhecimento das espécies de *Leishmania* que ocorrem em uma determinada região é essencial para estudos epidemiológicos e um melhor entendimento da transmissão, patologia, tratamento, profilaxia e controle da doença. Vários estudos têm sido voltados para descrição de isolados de parasitos localizados em áreas endêmicas. As metodologias empregadas em estudos de identificação de espécies têm sido baseadas em aspectos bioquímicos, moleculares, imunológicos e/ou biológicos. No presente estudo utilizamos técnicas de glicobiologia que permitiram caracterizar preliminarmente os LPGs das cepas de *L. major*-like isoladas de pacientes que relataram nunca ter saído do Brasil. Além disso, avaliamos o impacto desta variabilidade na interação com vetores do Velho e Novo Mundo.

Desde a denominação por Momen et al. em 1985, ainda são poucos os estudos sobre a biologia de *L. major*-like. Um trabalho utilizando as cepas BH49 e BH121 demonstrou diferenças marcantes no comportamento destes isolados quanto à infecção *in vivo* em *hamsters* e camundongos (BALB/c e C57BL/6), e *in vitro* em macrófagos murinos. A cepa BH49 foi capaz de causar infecção em todos os animais e nos macrófagos, diferentemente do observado pela cepa BH121 que foi caracterizada como não virulenta para o modelo murino (Silva et al., 2009). Para melhor entender quais mecanismos poderiam estar por detrás destas variações na virulência, Wu et al. (2015) avaliaram pela técnica de subtração por hibridização e supressão (SSH) a amplificação de alguns genes diferencialmente expressos nas leishmanias. Após analisar a homologia de alguns fragmentos de cDNAs das cepas de *L. major*-like, eles observaram quatro genes mais expressos na cepa BH49 e um na cepa BH121. Dentre os da cepa BH49, dois estavam diretamente relacionados à virulência, um homólogo à alfa-hemolisina e outro ao gene da β -1,3-galactosiltransferase 3. Este último está situado no cromossomo 2 de *L. major*, em uma região denominada “Galactosyl T”, a qual codifica as galactosiltransferases (Dobson et al., 2003a; Dobson et al., 2010). Estas enzimas são responsáveis pela transferência de galactose para as unidades repetitivas do LPG, um importante fator de virulência. Além disso, Wu et al. (2015) demonstraram pela técnica de *Western Blot* uma maior galactosilação no LPG da cepa BH49. Estes dados, juntamente com os obtidos no nosso estudo, confirmam os de McConville et al. (1992), onde mostra que o LPG de *L. major* apresenta cadeias laterais de β -Gal.

Considerando que o LPG é um fator de virulência multifuncional, provavelmente por ser mais galactosilada, a cepa BH49 poderia ter causado uma maior infecção nos camundongos. Corroborando com estes resultados, Proudfoot et al. (1996) mostrou que LPGs

mais galactosilados resultaram numa maior produção de óxido nítrico por macrófagos murinos. No presente estudo, a cepa BH129 também mostrou ser bastante galactosilada e, além disso, foi à única que reagiu com o anticorpo específico para Ara terminal, demonstrando ter um LPG muito parecido ao da cepa controle FV1. As cepas BH49 e BH121 reagiram em diferentes níveis de galactosilação, sendo a BH49 mais galactosilada, porém ambas não apresentaram resíduos de arabinose em suas cadeias laterais.

A partir destas observações, realizamos um *Dot Blot* utilizando o anticorpo CA7AE que reconhece unidades repetitivas de Gal-Man-PO₄ comuns a todos os LPGs de *Leishmania*. O LPG da cepa FV1 de *L. major* não demonstra reação com este anticorpo (Soares et al., 2004; Volf et al., 2014) provavelmente pela existência das cadeias laterais com galactose e resíduos de arabinose nas unidades repetitivas das formas promastigotas procíclicas e metacíclicas (McConville et al., 1992). Por esta razão, a cepa Ba262 de *L. infantum* foi utilizada como controle (Coelho-Finamore et al., 2011). O anticorpo reagiu fortemente com a cepa Ba262, BH121 e BH129, porém não reagiu da mesma maneira com a cepa BH49, confirmando os polimorfismos anteriormente apresentados. Em um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, também foi observado um possível polimorfismo intraespecífico nas unidades repetitivas e nos níveis de galactosilação dos LPGs de duas cepas de *L. amazonensis* (PH8 e Josefa). O LPG da cepa Josefa não foi reconhecido pelo anticorpo CA7AE, porém foi reconhecido por anticorpos específicos para galactose (WIC 79.3) e glicose (LT22), sugerindo a presença destes carboidratos em suas cadeias laterais (Nogueira et al., 2016).

Outras espécies de *Leishmania* do Novo Mundo que são infecciosas ao homem já possuem a molécula de LPG caracterizada e apresentam polimorfismos interespecíficos: *L. mexicana*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. O LPG de *L. mexicana* possui uma β -glicose ligada a resíduos de galactose nas unidades repetitivas (Ilg et al., 1992). O LPG de *L. infantum* (cepa PP75) apresenta uma β -glicose nas cadeias laterais das unidades repetitivas, após a metaciclogênese esta β -glicose não está presente (Soares et al., 2002). Em *L. braziliensis* acontece o oposto, as formas procíclicas não possuem cadeias laterais e as metacíclicas possuem 1-2 β -glicoses (Soares et al., 2005). Polimorfismos intraespecíficos foram observados em um estudo do nosso grupo que caracterizou o LPG de várias cepas de *L. infantum*, inclusive a cepa Ba262 utilizada como controle, e agrupou-o em três categorias: LPGs sem cadeias laterais, LPGs com uma cadeia lateral de Glc e LPGs com até três cadeias laterais de Glc (Coelho-Finamore et al., 2011).

Diante disso, os polimorfismos observados nos LPGs das cepas de *L. major*-like avaliadas neste estudo possivelmente podem ser caracterizados como pouco galactosilados (BH121), bastante galactosilados (BH49 e BH129) e contendo resíduos de arabinose terminal, juntamente com algumas unidades repetitivas sem cadeias laterais (BH129). Estas características bem distintas entre os LPGs de *L. major*-like também foi descrito em *L. tropica*, que apresenta um LPG muito polimórfico (Soares et al., 2004).

Já é sabido que o LPG é uma molécula fundamental para a sobrevivência do parasito e suas variações conferem importante papel na interação com os seus hospedeiros. Estudos *in vitro* mostraram que os polimorfismos inter e intraespecíficos nas estruturas dos LPGs são importantes na especificidade da *Leishmania* com o hospedeiro invertebrado (Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994). O reconhecimento de locais de ligação no epitélio intestinal do flebotomíneo pela molécula de LPG é crucial para o estabelecimento e desenvolvimento do parasito (Kamhawi, 2004). Segundo Butcher et al. (1996), parasitos mutantes deficientes para a síntese de LPG não são capazes de estabelecer infecção no hospedeiro, pois esta molécula exerce papel importante na resistência dos parasitos à ação de enzimas digestivas do intestino do vetor e durante a metaciclogênese.

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar a interação de cepas de *L. major*-like com vetores do Velho e Novo Mundo, *P. papatasi* e *L. longipalpis* respectivamente, utilizando o método de infecção experimental por alimentador artificial. Em estudos recentes, esta técnica tem sido utilizada por permitir controlar e quantificar fatores, tais como a forma evolutiva e a concentração do parasito utilizada durante a alimentação dos flebotomíneos (Seblova et al., 2015). Em vista disso, os nossos resultados demonstraram que todas as cepas de *L. major*-like avaliadas foram capazes de infectar com sucesso *L. longipalpis* e *P. papatasi*. As cepas BH49 e BH129 apresentaram uma alta taxa de infecção e a cepa BH121 variou de baixa a moderada, com 55 a 95% de fêmeas infectadas.

A competência vetorial destes insetos para a transmissão de diferentes espécies de *Leishmania* parece ser controlada por variações na estrutura do LPG. Em vetores restritivos a adesão normalmente é controlada por lectinas do intestino médio dos flebotomíneos que se ligam a açúcares terminais do LPG do parasito (Kamhawi et al., 2004; Kamhawi, 2006). No caso específico de *L. major*, esta especificidade foi atribuída a interação entre os resíduos de galactose do seu LPG com o receptor *PpGalec* (Kamhawi et al., 2004). Ao contrário, *L. longipalpis* é conhecido por ser susceptível ao desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania* que provavelmente são independentes do LPG para estabelecimento da infecção (Kamhawi, 2006; Myskova et al., 2007). Há pouco tempo tínhamos pouco conhecimento

sobre moléculas presentes no epitélio intestinal de *L. longipalpis* que influenciasssem na interação com o parasito. Estudos recentes têm demonstrado que vetores considerados permissivos, possuem glicoproteínas no intestino médio que participam da interação com moléculas presentes na superfície do parasito e que não estão presentes em vetores considerados restritivos (Myskova et al., 2007). Uma glicoproteína recombinante “rLuLoG” (mucina) presente em *L. longipalpis*, recém caracterizada, demonstrou forte interação com promastigotas de *Leishmania* (Myskova et al., 2016).

Nossos resultados demonstram que os LPGs de *L. major*-like que possuem resíduos de galactose (cepas BH49 e BH129) poderiam ter se ligado com sucesso aos receptores *PpGalec* de *P. papatasi*, mantendo com sucesso a infecção neste vetor. Em relação a *L. longipalpis* (permissivo), estes mecanismos poderiam ser independentes ou não de LPG, ou de outros aspectos ainda desconhecidos. Entretanto, considerando o caráter rural da transmissão de LC, este projeto abre perguntas para outros vetores que poderiam também contribuir para a transmissão de *L. major*-like. Estes poderiam incluir *L. migonei*, *L. whitmani* e *L. intermedia*. Considerando a dificuldade em colonizar estes vetores, exceto *L. migonei*, estudos no campo para a detecção de *L. major*-like em *L. whitmani*/*L. intermedia* através de PCR poderiam ajudar a elucidar esta questão.

O desenvolvimento dos parasitos das cepas de *L. major*-like nos vetores corrobora com outros estudos que, também, observaram a colonização de toda extensão do trato digestório do flebotomíneo a partir do 5º dia pós-infecção e uma maior quantidade de promastigotas presentes na região da válvula do estomodeu no 8º dia pós-infecção. Por exemplo, em *L. longipalpis* e *L. migonei* infectados com *L. infantum* (Freitas et al., 2012; Guimarães et al., 2016). Dessa forma, essas poucas leishmanias conseguiram sobreviver às condições adversas presentes no vetor, escaparam do confinamento estabelecido pela matriz peritrófica, não foram eliminadas durante o processo de defecação, estabeleceram infecções em estágio inicial em toda extensão do intestino médio e colonizaram a válvula do estodomeu, que conforme Rogers et al. (2002) e Bates (2007) é uma atividade muito importante para a possível transmissão do parasito pela picada da fêmea do flebotomíneo.

Em relação às mudanças morfológicas que ocorrem com o parasito durante o ciclo de vida no vetor, as formas promastigotas procíclicas foram observadas em todas as cepas de *L. major*-like durante o 1º dia pós-infecção, com uma densidade de aproximadamente 55% de parasitos da cepa BH49, 34% de BH121 e 35% de BH129. As formas leptomonadas foram abundantes em todas as cepas, sendo detectadas em todas as partes do intestino do vetor a partir do 5º dia pós-infecção. Estas promastigotas que antes eram nectomonadas agora não se

aderem ao epitélio intestinal, por isso são responsáveis pela rápida expansão do intestino médio torácico e anterior do vetor, e pela produção da matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos (PSG) que obstrui o intestino médio anterior, desempenhando um papel significativo na transmissão do parasito (Rogers et al., 2004; Kamhawi et al., 2006; Bates, 2007). No 8º dia pós-infecção em todas as combinações *Leishmania*-vetor foram observados em maior evidência promastigotas metacíclicas. Entretanto, um fato interessante foi que a cepa BH121 apresentou apenas 5% destas formas no último dia, provavelmente por ser a única cepa menos galactosilada. A metaciclogênese é um processo acompanhado por diversas alterações morfológicas nos parasitos, bem como alterações bioquímicas no LPG e na expressão de proteínas de superfície (revisado por Volf & Myshova, 2007). A análise morfométrica dos parasitos mostrou que todas as cepas foram capazes de realizar com sucesso a metaciclogênese em ambos os vetores. No entanto, estudos futuros são necessários para avaliar a capacidade de transmissão destes vetores.

Diante de todas essas observações, é necessário considerar que amostras de *L. major*-like cada vez mais demonstram similaridade, seja genética ou bioquímica, com *L. major* do Velho Mundo. A existência de novas espécies causadoras de LC no Novo Mundo devem ser consideradas em estudos que contribuem para identificação de isolados de *Leishmania* sp., bem como em estudos de interação parasito-hospedeiro e investigação epidemiológica da doença. No presente estudo foi possível caracterizar preliminarmente o LPG de três cepas de *L. major*-like e demonstrar variações intraespecíficas em sua galactosilação que podem ter influenciado na infecção nos vetores especialmente pela cepa BH121. Apesar disso, todas estas cepas conseguiram estabelecer com sucesso a infecção em *L. longipalpis* (Novo Mundo) e *P. papatasi* (Velho Mundo).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as cepas de *L. major*-like isoladas no Brasil foram capazes de sobreviver em diferentes vetores e possuem variações bioquímicas em seus glicoconjugados, os quais abrem novas perspectivas para se tentar conhecer melhor a origem destas espécies nas Américas. Semelhante a *L. infantum*, que poderia ter sido introduzida por cães/homens infectados nas Américas (Maurício et al., 2000), não sabemos se a *L. major*-like seria autóctone ou também foi introduzida por roedores trazidos em navios. Estudos de campo nas regiões onde estas cepas foram isoladas, a mais de 40 anos, são necessários para se determinar a atual importância epidemiológica de *L. major*-like no Brasil.

7. CONCLUSÕES

- A cepa BH129 de *L. major*-like apresentou um LPG antigenicamente similar ao da cepa referência pela OMS de *L. major* (FV1).
- As cepas de *L. major*-like, analisadas no estudo, demonstraram um polimorfismo intraespecífico entre os seus LPGs, sendo as cepas BH49 e BH129 mais galactosiladas que a cepa BH121.
- As cepas BH49 e BH121 não possuem arabinose como cadeia lateral em suas unidades repetitivas.
- A cepa BH129 possui 3 tipos de cadeias laterais possíveis: (I) com resíduos de Gal terminal; (II) com resíduos de Ara terminal; (III) sem cadeias laterais em suas unidades repetitivas.
- Todas as cepas de *L. major*-like tiveram sucesso na infecção em ambos os vetores, porém a cepa BH121 demonstrou uma infecção menos intensa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, G. M. & Medeiros, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. p.207- 255. In Rangel EF & Lainson R (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368 pp., 2003.
- Alexander, B.; Ferro, C.; Young, D. G.; Morales, A.; Tesh, R. B. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz, 87:387-395, 1992.
- Alvar, J.; Velez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One, 7:e35671, 2012.
- Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, 30: 1269-1281, 2000.
- Assis, R. R.; Ibraim, I. C.; Nogueira, P. M.; Soares, R. P.; Turco, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. Biochim Biophys Acta, Sep;1820:1354-65, 2012a.
- Assis, R. R.; Ibraim, I. C.; Noronha, F. S.; Turco, S. J.; Soares, R. P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. PLoS Negl Trop Dis; 6: e1543, 2012b.
- Azevedo, A. C. R.; Luz, S. L. B.; Vilela, M. L.; Rangel, E. F. Studies on the sand fly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 88: 509-512, 1993.
- Barbosa-De-Deus, R.; Mares-Guia, M. L.; Nunes, A. Z.; Costa, K. M.; Junqueira, R. G.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Tavares, C. A. P. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine Visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, nov, p.1361-1366, vol 9, n 6, 2002.
- Bates, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology, 37:1097–1106, 2007.
- Bayne R. A.; Kilbride, E. A.; Lainson, F. A.; Tetley, L.; Barry, J. D. A major surface antigen of procyclic stage *Trypanosoma congolense*. Mol Biochem Parasitol, Oct;61:295-310, 1993.
- Borovsky, D. & Schlein, Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sand fly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. Medical and Veterinary Entomology, 1:235–242, 1987.
- Calvopina, M.; Armijos, R. X.; Hashiguchi, Y. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge – A review. Mem Inst Osw Cruz, v. 99, p. 663-672, 2004.

Chance, M. L. The biochemical and immune taxonomy of *Leishmania*. In: Chang/ Gray (eds) Elsevier Science Publishing Company, 93-110, 1985.

Cihakova, J. & Volf, P. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 91:267–79, 1997.

Coelho-Finamore, J. M.; Freitas, V. C.; Assis, R. R.; Melo, M. N.; Novozhilova, N.; Secundino, N. F.; Pimenta, P. F.; Turco, S. J.; Soares, R. P.; J. M. et al *Leishmaniain fantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol*. 41: 811–820, 2011.

Cunningham, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol. Apr.*, 72:132-41, 2002.

Davidson, R. N. Leishmaniasis. *Medicine*, 33: 1-3, 2005.

Descoteaux, A. & Turco, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*; 1455: 341–352, 1999.

Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 69: 473-480, 2001.

Dobson, D. E.; Kamhawi, S.; Lawyer, P.; Turco, S. J.; Beverley, S. M.; Sacks, D. L. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. *Plos Pathog*. Nov 11;6:e1001185, 2010.

Dobson, D. E.; Mengeling, B. J.; Cilmi, S.; Hickerson, S.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modification of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*. *J Biol Chem*. Aug 1;278:28840-8, 2003b.

Dobson, D. E.; Scholtes, L. D.; Valdez, K. E.; Sullivan, D. R.; Mengeling, B. J.; Cilmi, S.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. Functional identification of galactosyltransferases (SCGs) required species-specific modifications of the lipophosphoglycan adhesin controlling *Leishmania major*-sand fly interactions. *J Biol Chem*. May 2;278:15523-31, 2003a.

Dostalova, A. & Volf, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite–vector interactions overview. *Parasites & Vectors* 5, 276, 2012.

Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*; 28: 350 – 356, 1956.

Freitas, V. C.; Parreiras, K. P.; Duarte, A. P.; Secundino, N. F.; Pimenta P. F. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 86, p. 606-612, 2012.

- Garcia, L.; Kindt, A.; Bermudez, H.; Llanos-Cuentas, A.; De Doncker, S.; Arevalo, J. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:2294–7, 2004.
- Gontinjo, B.; de Carvalho, Mde. L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Ver Soc Bras Med Trop*, Jan-Feb, 36:71-80, 2003.
- Guimarães, V. C.; Pruzinova, K.; Sadlova, J.; Volfova, V.; Myskova, J.; Filho, S. P.; Volf, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competente for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*, Mar 17;9:159, 2016.
- Guimarães-Costa, A. B.; Nascimento, M. T.; Froment, G. S.; Soares, R. P.; Morgado, F. N.; Conceição-Silva, F.; Saraiva, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes Induce and Are Killed by Neutrophil Extracellular Traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 106: 6748–6753, 2009.
- Hartley, M-A.; Drexler, S.; Ronet, C.; Beverley, S. M.; Fasel, N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 30:412-422, 2014.
- Hashiguchi, Y.; Gomez, E. A.; Coronel, V. V.; Mimori, T.; Kawabata, M. Furuya, M.; Nonaka, S.; Takaoka, H.; Alexander, B.; Quizhpe, A. M. et al. Andean Leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites. *Am J Trop Med Hyg*, v. 44, p. 205-217, 1991.
- Hashiguchi, Y.; Velez, L. N.; Villegas, N. V.; Mimori, T.; Gomez, E. A.; Kato, H. Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta Trop*, Feb;166:299-315, 2016.
- Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet.*, 354(9185):1191-9, 1999.
- Ilg, T.; Etges, R.; Overath, P.; McConville, M. J.; Oates, J. T.; Thomas, J., et al. Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.*, 267:6834-40, 1992.
- Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, Sep;22:439-45, 2006.
- Kamhawi, S.; Ramalho-Ortigao, M.; Pham, V. M.; Kumar, S.; Lawyer, P. G.; Turco, S. J., et al. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119: 329-41, 2004.
- Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34: 637–650, 2011.
- Kaye, P. & Soctt, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Rev. Microbiol.*, Jul 9: 604-15, 2011.

- Kelleher, M.; Bacic, A.; Handman, E. Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6–10, 1992.
- Kelleher, M.; Curtis, J. M.; Sacks, D. L.; Handman, E.; Bacic, A. Epitope mapping of monoclonal antibodies directed against lipophosphoglycan of *Leishmania major* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66, 187–200, 1994.
- Killick-Kendrick, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17(3): 279-289, 1999.
- Lainson, R. & Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. *Biology and Epidemiology*; 1: 1–120, 1997.
- Luyu-Acero, G. E.; Uezato, H.; Oshiro, M.; Takei, K.; Kariya, K.; Katakura, K.; Gomez-Landires, E.; Hashiguchi, Y.; Nonaka, S. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*, May 128 (Pt5):483-91, 2004.
- Luz, N. F.; Andrade, B. B.; Feijó, D. F.; Araújo-Santos, T.; Carvalho, G. Q.; Andrade, D.; Abánades, D. R.; Melo, E. V.; Silva, A. M.; Brodskyn, C. I.; Barral-Netto, M.; Barral, A.; Soares, R. P.; Almeida, R. P.; Bozza, M. T.; Borges, V. M. Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of *Leishmania chagasi* Infection. *J Immunol*; 188: 4460–4467, 2012.
- Mahoney, A. B.; Sacks, D. L.; Saraiva, E.; Modi, G.; Turco, S. J. Intra-species and stage-specific polymorphisms in LPG control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*; 38: 9813–9823, 1999.
- Marques, A. F.; Soares, R. P.; Almeida, G. G.; Souza, S. S.; Melo, M. N.; Pinto, S. A.; Quixabeira, V. B.; Pereira, L. I.; Dorta, L. M.; Ribeiro-Dias, F.; Silveira, F. T.; Silva, S. M.; Gontijo, C. M.; Tafuri, W. L. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasitology International* 66; 884-888, 2017.
- Matlashewski, G. *Leishmania* infection and virulence. *Med. Microbiol Immunol*, 190: 37-42, 2001.
- Maurício, I. L.; Stothard, J. R.; Miles, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, May;16:188-9, 2000.
- Mayrink, W.; Da Costa, C. A.; Magalhães, P. A.; Melo, M. N.; Dias, M.; Oliveira Lima, A.; Michalick, M. S.; Williams, P. A field trial of a vaccine against American dermal Leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 4, p. 385-387, 1979.
- McConville, M. J.; Schnur, L. F.; Jaffe, C.; Schneider, P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*, (310): 807-18, 1995.

McConville, M. J.; Turco, S. J.; Ferguson, M. A. J.; Sacks, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Eur Mol Biol Organ J*, 11: 3593-3600, 1992.

Momen, H.; Grimaldi, J. R.; Pacheco, R. S.; Jaffe, C. L.; MacMahon Pratt, D.; Marzochi, M. C. A. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:1076-1084, 1985.

Myskova, J. Svobodova, M.; Beverly, S. M.; Volf, P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect*, Mar;9:317-24, 2007.

Myskova, J.; Dostalova, A.; Penickova, L.; Halada, P.; Bates, P. A.; Volf, P. Characterization of a midgut mucin-like glycoconjugate of *Lutzomyia longipalpis* with a potential role in *Leishmania* attachment. *Parasit Vectors*, Jul 25;9:413, 2016.

Myskova, J.; Votypka, J.; Volf, P. *Leishmania* in sand flies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *J Med Entomol*, 45:133–8, 2008.

Nogueira, P. M.; Assis, R. R.; Torrecilhas, A. C.; Saraiva, E. M.; Pessoa, N. L.; Campos, M. A. S.; Marialva, E. F.; Ríos-Velasquez, C. M.; Pessoa, F. A.; Secundino, N. F.; Rugani, J. N.; Nieves, E.; Turco, S. J.; Melo, M. N.; Soares, R. P. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. *Plos Negl Trop Dis*, Aug 10:e0004848, 2016.

OPAS/OMS - Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Epidemiological Report of the Americas, 2016. Home Page <http://www.paho.org/bra/>. Acesso em 12/01/2017.

Orlandi, P. A. Jr.; Turco, S. J.; Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J BiolChem*; 262: 10384–10391, 1987.

Paranaíba, L. F.; de Assis, R. R.; Nogueira, P. M.; Torrecilhas, A. C.; Campos, J. H.; Silveira, A. C.; Martins-Filho, O. A.; Pessoa, N. L.; Campos, M. A.; Parreiras, P. M.; Melo, M. N.; Gontijo, Nde. F.; Soares, R. P. *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycan (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. *Parasit Vectors*, Jan 17;8:31, 2015.

Passero, L. F. D.; Assis, R. R.; Silva, T. N. F.; Nogueira, P. M.; Macedo, D. H.; Pessoa, N. L.; Campos, M. A.; Laurenti, M. D.; Soares, R. P. Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitology International*, 64;32-35, 2015.

Pimenta, P. F. P.; Turco, S. J.; McConville, M. J.; Lawyer, P. G.; Perkins, P. V.; Sacks, D. L. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. *Science*, 256: 1812-15, 1992.

Pimenta, P. F.; Modi, G. B.; Pereira, S. T.; Shahabuddin, M.; Sacks, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115:359–36, 1997.

Proudfoot, L.; Nikolaev, A. V.; Feng, G. J.; Wei, W. Q.; Ferguson, M. A.; Brimacombe, J. S.; Liew, F. Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:10984–10989, 1996.

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

Rogers, M. E.; Iig, T.; Nikolaev, A. Av.; Ferguson, M. A.; Bates, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, Jul 22; 430:463-7, 2004.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman Donovan. *Br Med J*, 14:1261-1262, 1903.

Sacks, D. L. & Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, (55):453-83, 2001.

Sacks, D. L. & Perkins, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34:456–459, 1985.

Sacks, D. L.; Pimenta, P. F. P.; McConville, M. J.; Schneider, P.; Turco, S. J. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*, 181: 685-97, 1995.

Sadlova, J. & Volf, P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research*, 337:313–325, 2009.

Seblova, V.; Myskova, J.; Hlavacova, J.; Votypka, J.; Antoniou, M.; Volf, P. Natural hybrid of *Leishmania infantum/L.donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with nonhybrid strains differing in tissue tropism. *Parasites & Vectors*, London, v. 8, n. 605, 2015.

Shaw, J. J. The meeting of two worlds: Eco-epidemiology and molecules. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.89, suppl I, Nov., p. 7, 1994.

Silva, Sde. O.; Wu, A. A.; Evans, D. A.; Vieira, L. Q.; Melo, M. N.; *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like, *Acta Trop*, Dec;112:239-48, 2009.

Silveira, F. T.; Lainson, R.; Corbett, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, maio, v. 99, n. 3, p. 239–51, 2004.

Soares, R. P. P.; Cardoso, T. L.; Barron, T.; Araújo, M. S. S.; Pimenta, P. F. P.; Turco, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol*. 35: 245-53, 2005.

Soares, R. P. P.; Macedo, M. E.; Ropert, C.; Gontijo, N. F.; Almeida, I. C.; Gazzinelli, R. T., et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol*, 121: 213-24, 2002.

Soares, R. P.; Barron, T.; McCoy-Simandle, K.; Svobodova, M.; Warburg, A.; Turco, S. J. *Leishmania tropica*: Intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol*, 107: 105–114, 2004.

Soares, R. P.; Margonari, C.; Secundino, N. C.; Macedo, M. E.; da Costa, S. M.; Rangel, E. F. et al, Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol*. 2010: 1-7, 2010.

Stierhof, Y. D.; Bates, P. A.; Jacobson, R. L.; Rogers, M. E.; Schlein, Y.; Handman, E.; Ilg, T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*, 78:675–689, 1999.

Tolson, D. L.; Turco, S. J.; Beecroft, R. P.; Pearson, T. W. The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35, 109–118, 1989.

Turco, S. J. & Sacks, D. L. Control of *Leishmania*-sand fly interactions by polymorphisms in lipophosphoglycan structure. *Meth Enzy mol*; 363: 377–381, 2003.

Turco, S. J. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates. In: Marr JJ, Nilsen T. W.; Komuniecki, R. W., editores. *Molecular Medical Parasitology. Section II: Biochemistry and cell biology protozoa. Chapter 10 - Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates.* [s.l.]:Academic Press, p.225-40, 2003.

Vivarini, Ade. C.; Pereira, Rde. M.; Teixeira. K. L.; Calegari-Silva, T. C.; Bellio, M.; Laurenti, M. D.; Corbett, C. E.; Gomes, C. M.; Soares, R. P.; Silva, A. M.; Silveira, F. T.; Lopes, U. G. Human Cutaneous Leishmaniasis: Interferon-dependent expression of Doublestranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR) via TLR2. *Faseb J*; 25: 4162–4173, 2011.

Volf, P. & Myskova, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitology*, Oxford, v. 23, p. 91-92, 2007.

Volf, P. & Volfova, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecl*, Mar;36 suppl 1:S1-9, 2011.

Volf, P.; Nogueira, P. M.; Myskova, J.; Turco, S. J.; Soares, R. P. Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol Int*, Oct;63:683-6, 2014.

Walters, L. L.; Iron, K. P.; Modi, G. B.; Tesh, R. B. Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera:Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*, Feb;46:211-28, 1992.

WHO – World Health Organization. Leishmaniasis. Home Page on The World Wide Web available from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 12/01/2017.

Wu, A. C. A.; Freita, M. A. R.; Silva, S.; Nogueira, P. M.; Soares, R. P. P.; Pesquero, J. B.; Gomes, M.; Pesquero, J. L.; Melo, M. N. Genetic differences between two *Leishmania major*-like strains revealed by suppression subtractive hybridization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol. 203, Pages 34-38, 2015.

Yamasaki, H.; Agatsuma, T.; Pavon, B.; Moran, M.; Furuya, M.; Aoki, T. *Leishmania major*-like parasite, a pathogenic agent of cutaneous Leishmaniasis in Paraguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 51, p. 749-757, 1994.

Young, D. G. & Duncan, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 881 pp, 1994.