

Ana Clara Araújo Machado Pires

***Lutzomyia (L.) longipalpis* (vetor da Leishmaniose Visceral Americana): A competência vetorial à diferentes espécies de *Leishmania* e a diversidade da microbiota**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro/2018

Ana Clara Araújo Machado Pires

***Lutzomyia (L.) longipalpis* (vetor de Leishmaniose Visceral Americana): A competência vetorial à diferentes espécies de *Leishmania* e a diversidade da microbiota**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Dr. Paulo F. P. Pimenta

Co-Orientador (a): Dra. Nágila F. C. Secundino

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2018



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**  
**ANA CLARA ARAÚJO MACHADO PIRES**

187/2018  
entrada  
Fº:2014  
2014659583

As quatorze horas do dia 27 de fevereiro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "LUTZOMYA(L.) LONGIPALPIS (VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA): A COMPETÊNCIA VETORIAL Á DIFERENTE ESPÉCIES DE LEISHMANIA E A DIVERSIDADE DA MICROBIOTA", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abriu-se a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta	CPqRR	APROVADA
Dr. Gustavo Fonte Paz	CPqRR	APROVADA
Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna	UFMG	APROVADA
Dr. Leonardo Barbosa Koerich	UFMG	APROVADO
Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares	CPqRR	APROVADO

Pelas indicações, a candidata foi considerada:

APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.**

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Orientador)

Dr. Gustavo Fonte Paz

Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Prof. Fernando Rodrigues C. L. de Almeida  
SUS-COORDENADOR DO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire



“Este trabalho é dedicado aos meus pais, Maurício e Meire, e  
à minha querida madrinha e tia Bitá (*in memoriam*).”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Maurício e Meire, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me ajudando em todas as etapas da minha vida. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela força e, principalmente, pelo exemplo de caráter que vocês me deram. Essa conquista tem um sentido diferente por causa de vocês. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus orientadores, Dra Nágila Secundino e Dr Paulo Pimenta, pelas oportunidades que me proporcionaram um crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente grata pelos ensinamentos que vocês me proporcionaram. Obrigada pela atenção, orientação e incentivos profissionais.

Ao Lucas pelo companheirismo, carinho, paciência, suporte e por me mostrar um mundo muito maior do que o acadêmico. A vida ao seu lado é muito mais leve e feliz. Muito obrigada por tudo!

À minha família pelos incentivos, carinho e apoio incondicional.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG pela convivência diária e ajuda científica. Obrigada Alessandra, Rafael, Nilton, Eliza, Marcílio e Breno pelas colaborações e momentos agradáveis.

Às minhas queridas princesas Thaís, Raphaela, Karine, Thaís B. e Paula Monalisa por todas as risadas, brincadeiras e, também, pelo companheirismo científico. Com vocês, meus dias no laboratório foram sempre melhores. Tenho muita sorte de ter amigas de trabalho tão incríveis como vocês.

Ao Luís Martinez pela amizade, conselhos e orientações na área de metagenômica. Você é uma inspiração para mim.

À Carolina Cunha, uma amiga que a pesquisa me deu de presente. Obrigada pela troca de confidências, risadas e por sempre está disposta a me ajudar.

Ao Dr Fabiano Oliveira e Dr Jesus Valenzuela pela oportunidade de trabalhar em um excelente instituto de pesquisa. Muito obrigada pela confiança e pelos ensinamentos compartilhados diariamente comigo. Agradeço, principalmente, ao Dr Fabiano Oliveira por me acolher e me ajudar sempre que eu precisei.

Aos colegas e equipe do LMVR – NIAID/NIH que me auxiliaram durante o ano que desenvolvi parte do meu doutorado no instituto. Obrigada Tiago, Iliano, Cláudio e Morgan pela convivência diária e ajuda científica.

Aos queridos amigos, Norinne, Nico, Dionê, Anderson, Ana Beatriz, Thiago, Beto e Raquel (+ João), que tive a sorte e privilégio de encontrar na minha jornada nos Estados Unidos. Vocês me acolheram de uma forma tão carinhosa, que não tenho palavras para agradecer. Muito obrigada por me fazerem sentir em casa durante esse um ano. Noris, obrigada por seu meu anjo da guarda.

Às minhas queridas amigas Nathália e Aline, que entraram na minha vida na faculdade e estão até hoje ao meu lado. Obrigada por serem minhas confidentes, ouvintes e maiores incentivadoras. Vocês sabem que seria impossível chegar onde estou sem vocês ao meu lado.

Aos meus queridos amigos biólogos Mariana, Karen, Rafael e Luiz que até hoje me proporcionam momentos de risadas e diversão.

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

À toda a equipe do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo apoio estrutural e financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela oportunidade e incentivo recebido. Agradeço, principalmente, a Rhuanna por me ajudar e esclarecer todas as inúmeras dúvidas que tive ao longo desses 4 anos de doutorado.

Ao programa Ciências sem Fronteiras – Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE), pelo apoio educacional e financeiro.

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

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIV

### PARTE I

RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XVII
1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 As Leishmanioses .....	18
1.2 Os Flebotomíneos .....	20
1.3 Os parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	22
1.4 Interação do protozoário <i>Leishmania</i> com o flebotomíneo vetor .....	23
1.5 O mecanismo de transmissão .....	27
1.6 Competência vetorial .....	29
2 OBJETIVOS .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4 RESULTADOS .....	40
5 DISCUSSÃO .....	46
6 CONCLUSÕES .....	51

### PARTE II

RESUMO .....	LII
ABSTRACT .....	LIII
1 INTRODUÇÃO .....	54
1.1 A microbiota dos flebotomíneos .....	54
2 OBJETIVOS .....	56
2.1 OBJETIVO GERAL .....	56

<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>56</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>7 ANEXOS</b> .....	<b>74</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

- Figura 1:** Classificação das espécies de *Leishmania* determinada pelo seu padrão de desenvolvimento no tubo digestório do vetor flebotomíneo (Modificado de Lainson & Shaw 1979) ..... 23
- Figura 2:** Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania* conforme a classificação de Lawyer e colaboradores (1990). Da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica (Desenho de Paulo Pimenta) ..... 25
- Figura 3:** Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor (Modificado de Sacks & Kamhawi, 2001) .....26
- Figura 4:** Local de coleta de *Lu. (L.) longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas (Fonte: Vanessa Freitas) ..... 34
- Figura 5:** Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral do processo de alimentação e dos potes contendo os flebotomíneos. (B) Detalhe do alimentador artificial revestido por pele de *Gallus gallus domesticus* jovem contendo sangue e promastigotas de *Leishmania* (Esquema adaptado de Vanessa Freitas) ..... 36
- Figura 6:** Processo de transmissão, no qual *Lu. (L.) longipalpis* infectados colocados na orelha de camundongos Balb/c (*Mus musculus*). Em destaque na seta está um flebotomíneo engorgitado (Fonte: Nágila Scundino) ..... 38
- Figura 7:** *Lu. (L.) longipalpis* é capaz de sustentar o desenvolvimento inicial de todas as espécies de *Leishmania* na alta dose parasitária. *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* na concentração de  $4 \times 10^7$  (A) e  $5 \times 10^6$  (B) parasitas por mL de sangue. *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* mostraram um alto número de parasitos, enquanto *L. (V.) braziliensis* apresentou a menor carga parasitária. ( $4 \times 10^7$  – estimativa de 8.000 parasitos/flebotomíneo;  $5 \times 10^6$  – estimativa de 1.000 parasitos/flebotomíneo). As linhas horizontais indicam a mediana. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ ) ..... 41

**Figura 8: Leishmaniose cutânea (LC) causada por *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (A) Espessura das orelhas em animais expostos às picadas de flebotomíneos infectados com *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*. (B) Carga parasitária de 12 semanas após transmissão. As setas determinam o tempo em que a carga foi quantificada. (C) Orelha com picadas de flebotomíneos (esquerda) após transmissão e lesões cutâneas (direita, seta) 3 semanas pós-transmissão por picada de *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) major* (dose  $4 \times 10^7$ ) ..... 43**

**Figura 9: *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de se infectar de uma lesão cutânea causada por *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* e transmiti-los a camundongos Balb/c naïves. (A) Intestinos médios de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (B) Porcentagem de metacíclicas presentes no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*. (C) Espessura das orelhas de animais expostos às picadas do vetor infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (D) Porcentagem de orelhas positivas após exposição às picadas de insetos infectados. (E) Lesão cutânea, causado por *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) major* em Balb/c..... 45**



## PARTE II

**Figura 1: Dendrograma filogenético dos gêneros bacterianos identificados em cada uma das condições experimentais do *Lu. (L.) longipalpis* silvestre.** As g-OTUs identificadas são mostradas seguidas de uma chave de cor que representa as condições fisiológicas das fêmeas de flebotomíneos: UF (verde); BF (azul); BFI (laranja) e GR (vermelho) ..... 62

**Figura 2: NMDS - Análise multivariada sem restrições de padrões biológicos.** A abundância bacteriana ao nível de família (f-OTUs) pode ser discriminada entre os quatro grupos experimentais. Conforme observado em todas as dimensões do NMDS (1 e 2), os insetos dos grupos GR e UF apresentam perfis de abundância bacteriana semelhantes, ao passo que a alimentação sanguínea parece gerar duas assinaturas distintas que explicam o agrupamento espacial e os padrões de ramificação em ambas as dimensões ..... 65

**Figura 3: Análise multivariada restrita dos perfis de abundância bacteriana de *Lu. (L.) longipalpis* baseada na fonte alimentar.** Os eixos CCA1 e CCA2 explicam aproximadamente 97% da abundância bacteriana dentro da matriz. Os grupos UF e GR co-localizam no quadrante superior esquerdo e estão separados, ao longo do CCA1, dos dois grupos alimentados com sangue (grupos BF e BFI). A presença do parasito afasta, ao longo do CCA2, o grupo BFI do seu contra-grupo BF. O comprimento dos vetores em azul corresponde à importância que cada uma das variáveis explicativas (restritivas) teve sobre o padrão de agrupamento. A preferência de cada um dos f-OTUs (vermelho) por um "nicho ecológico" pode ser atribuída à sua proximidade com cada um dos grupos experimentais ..... 68

## LISTA DE TABELAS

### PARTE I

<b>Tabela 1:</b> Condições importantes de uma infecção madura em <i>Lu. (L.) longipalpis</i> infectados com diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	42
--	----

### PARTE II

<b>Tabela 1:</b> Perfil taxonômico e abundância relativa de f-OTUs associadas a <i>Lu. (L.) longipalpis</i> sob diferentes condições fisiológicas .....	63
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**BF** = Blood Fed

**BFI** = Blood Fed Infected

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

**CCA** = Análise de Correspondência Canônica

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

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

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

**Fiocruz** = Fundação Oswaldo Cruz

**GalNAc** = N-acetilgalactosamina

**OMS** = Organização Mundial da Saúde

**LC** = Leishmaniose Cutânea

**LCPK** = Leishmaniose Cutânea pós-Kala-azar

**LEM** = Laboratório de Entomologia Médica

**LPG** = Lipofosfoglicano

**LM** = Leishmaniose Mucocutânea

**LV** = Leishmaniose Visceral

**Km** = Quilômetros

**MG** = Minas Gerais

**MP** = Matriz Peritrófica

**MS** = Mato Grosso do Sul

**mL** = mililitro

**Mm** = milimolar

**M199** = meio 199

**NMDS** = Escala Multidimensional não Métrica

**OTU** = Operational Taxonomic Unit

**fOTU** = Operational Taxonomic Unit - nível família

**gOTU** = Operational Taxonomic Unit – nível gênero

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

**PCR** = Polymerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

**qPCR** = Polymerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real

**PSG** = Promastigote Secretory Gel

**rRNA** = Ribosomal Ribonucleic Acid

**RJ** = Rio de Janeiro

**SFB** = Soro Fetal Bovino

**SP** = São Paulo

**TO** = Tocantins

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

**°C** = grau Celsius

**µg** = micrograma

**µl** = microlitro

**pH** = potencial de hidrogênio iônico

**rpm** = rotações por minuto

**%** = porcentagem

## PARTE I

### RESUMO

Estudos da interação do protozoário *Leishmania* com o flebotomíneo vetor constituem um importante campo de pesquisa, já que podem contribuir com o conhecimento dos processos envolvidos na transmissão do parasito e na epidemiologia das Leishmanioses. Detalhes de todos os aspectos da interação parasito-vetor são desejáveis para a formulação de novas estratégias de controle do protozoário e do vetor. Algumas espécies de flebotomíneos mostram notável especificidade para serem vetores exclusivos de determinadas espécies de *Leishmania* transmitidos na natureza, enquanto outras espécies podem se infectar, experimentalmente, por mais de uma espécie de parasito. À essas últimas têm sido sugerido o termo "Vetores Permissivos". Ainda não se sabe ao certo como funciona a interação dos Vetores Permissivos com o parasito *Leishmania*, mas acredita-se que o mecanismo de adesão no intestino médio desses vetores seja diferente dos "Vetores Naturais". O estudo aqui apresentado, descreve o desenvolvimento de cinco espécies distintas de *Leishmania* - *L. (Leishmania) infantum chagasi*, *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) mexicana* e *L. (Viannia) braziliensis* - em *Lutzomyia (L.) longipalpis*, considerado, experimentalmente, um vetor permissivo. Diferentes concentrações de parasitos foram utilizadas afim de compreender os aspectos determinantes da permissibilidade do vetor. Nossos resultados mostraram que a habilidade do *Lu. (L.) longipalpis* de se infectar experimentalmente por *Leishmania* é dose dependente e o vetor se mostrou competente para transmitir *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*.

## ABSTRACT

Studies of the interaction between *Leishmania* protozoans with phlebotomine vector constitute an important field of research, since it can improve our knowledge of the processes involved in the transmission of the parasite and the epidemiology of Leishmaniasis. Details regarding all of the aspects between parasite-vector interaction are desirable for a formulation of novel protozoan and vector control strategies. Some phlebotomine species show remarkable specificity for exclusive vectors of certain *Leishmania* species transmitted in nature, while other species may be experimentally infected by more than one species of parasite. The term "Permissive Vectors" has been created to describe the latter. It is not yet known exactly how the interaction between Permissive Vectors with the *Leishmania* parasites works, but it is hypothesized that the mechanism of adhesion within the midgut of these vectors differs from the "Natural Vectors". The present study describes the development of five distinct species of *Leishmania* - *L. (Leishmania) infantum chagasi*, *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) mexicana* and *L. (Viannia) braziliensis* - in *Lutzomyia (L.) longipalpis*, considered, experimentally, a permissive vector. Different concentrations of parasites were required for determination of vector permissibility. Our results showed that the ability of *Lu. (L.) longipalpis* from being infected experimentally by *Leishmania* is dose dependent and the vector proved to be competent to transmit *L. (L.) major* and *L. (L.) mexicana*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. Estes parasitos são transmitidos aos seres humanos pela picada da fêmea do flebotomíneo infectada. Existem três formas principais de Leishmaniose (Cutânea, Mucocutânea e Visceral), as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomas, relacionados com as diferentes espécies do parasito (Herwaldt, 1999; WHO, 2017). A maioria das pessoas infectadas pelo parasito não desenvolve nenhum sintoma em sua vida. Portanto, o termo Leishmaniose refere-se ao fato de se tornar doente devido a uma infecção por *Leishmania* e não ao simples fato de estar infectado com o parasito (WHO, 2017). O tratamento das Leishmanioses depende de uma variedade de drogas tóxicas (tais como, Antimonial Pentavalente e Anfotericina B) e o acesso a esses medicamentos é um desafio em alguns países pobres, os quais apresentam os maiores números de casos das doenças (WHO, 2017).

Em 2014, mais de 90% dos casos de Leishmaniose notificados à OMS (Organização Mundial da Saúde) ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para as Leishmanioses e estima-se que apareçam, em todo o mundo, cerca de 600.000 – 1.000.000 de novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) por ano e 50.000 – 90.000 de novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2017).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais comum da doença e ocorre quando o parasito apresenta tropismo por células da pele. Geralmente, produz úlceras nas partes expostas do corpo, como o rosto, os braços e as pernas. Quando as úlceras cicatrizam, invariavelmente deixam cicatrizes permanentes, que muitas vezes são a causa de um grave prejuízo social (WHO, 2017). A LC pode se apresentar sob duas formas clínicas: localizada ou disseminada. Na LC localizada a lesão, única ou múltipla (até 20 lesões), é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e, geralmente, apresenta uma boa resposta ao tratamento. A forma disseminada da LC é uma expressão relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos. Esta forma de apresentação da doença é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência

acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. Pode haver um grande número de lesões, às vezes até 200, o que pode causar incapacidade grave no paciente. As lesões disseminadas, distantes do local da picada, aparecem após o desenvolvimento das lesões primárias, provavelmente por disseminação do parasito por via hemática ou via linfática. Essas lesões se estabelecem em poucos dias, as vezes em 24 horas (Ministério da Saúde, 2018).

A maioria dos casos de LC ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. Nos países do Velho Mundo, a doença geralmente é caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em ambientes onde há migração em larga escala de populações (Herwaldt et al, 1999; WHO, 2017). No Brasil, a LC é uma doença com diversidade de agentes etiológicos (múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes em uma mesma área geográfica), de reservatórios e de vetores, os quais apresentam diferentes padrões de transmissão. A doença é amplamente distribuída pelo país, com registros em todas as regiões brasileiras. Em dez anos, o número de casos de LC no Brasil reduziu 27%, passando de 26.685 casos em 2005 para 19.395 casos em 2015. A região Norte registrou o maior número de casos (8.939) dessa doença, seguida do Nordeste (5.152), Centro-Oeste (2.937), Sudeste (1.762) e Sul (493) (Ministério da Saúde, 2018).

Na Leishmaniose Mucocutânea (LM), as lesões podem levar à destruição parcial ou total das mucosas do nariz, cavidades da boca e garganta e tecidos circundantes. Esta forma incapacitante de Leishmaniose pode levar o paciente a ser rejeitado pela comunidade. Quase 90% dos casos de LM ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2017).

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Kala-azar, é a forma sistêmica da doença e pode ser fatal se não tratada. Apresenta como principais sintomas febre, perda de peso, hepato-esplenomegalia e pancitopenia (redução dos elementos do sangue: hemácias, leucócitos e plaquetas) (Gramiccia & Grandoni, 2005; Chappuis et al., 2007). A LV acomete principalmente crianças, indivíduos desnutridos e imunossuprimidos. Em alguns casos, após o tratamento, pode haver o aparecimento de uma forma cutânea pós Kala-azar. A Leishmaniose Cutânea pós-Kala-azar (LCPK) é uma



complicação da LV em áreas onde *Leishmania donovani* é endêmica, sendo uma manifestação clínica restrita ao Velho Mundo. A LCPK é caracterizada por uma erupção macular, maculopapular e nodular hipopigmentada em pacientes que se recuperaram da LV. Geralmente, aparece de 6 meses a 1 ano após a cura aparente da doença, mas pode ocorrer mais cedo ou mesmo em simultâneo com a LV, especialmente no Sudão. A LCPK cura espontaneamente na maioria dos casos na África, mas raramente em pacientes na Índia. Considera-se que a LCPK tenha um papel importante na manutenção e na transmissão da doença, particularmente em períodos interepidêmicos da LV, atuando como reservatório dos parasitos (WHO, 2017).

Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Recentemente, casos autóctones foram registrados pela primeira vez na Região Sul (Reis et al, 2017). Em dez anos, o número de casos de LV no Brasil reduziu 9%, passando de 3.597 casos, em 2005, para 3.289 casos, em 2015. Em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de casos de LV (1.806), seguida pelas regiões Sudeste (538), Norte (469), Centro-Oeste (157) e Sul (5) (Ministério da Saúde, 2018).

## 1.2 Os Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros da família Psychodidae e, de acordo com sua distribuição geográfica e características morfológicas, podem ser classificados em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (Killick-Kendrick, 1990; Ashford, 1991; Young & Duncan, 1994; Desjeux, 2004). No Brasil, os flebotomíneos são popularmente chamados de “mosquito palha”, “birigui”, “anjinho”, “gangalhinha”, “flebótomo”, entre outros (Neves et al., 2011). Estes insetos são holometábolos e seu desenvolvimento, a partir do ovo, passa por quatro estádios larvais, pupa e adulto (Brazil

& Brazil, 2003; Rangel & Lainson, 2003). A eclosão da larva ocorre de 7 a 17 dias após a postura, em condições ambientais favoráveis e o seu desenvolvimento completo pode variar de 30 a 100 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais. *Lutzomyia (L.) longipalpis*, por exemplo, apresenta um ciclo de desenvolvimento de 30 a 45 dias, em condições laboratoriais (Killick-Kendrick et al., 1977a; Soares & Turco, 2003).

As larvas se alimentam de matéria orgânica do solo e são encontradas em locais que apresentam matéria orgânica, umidade e baixos níveis de luz. As formas imaturas já foram encontradas em ambientes domésticos (fendas de chão e paredes, porões de casas e construções abandonadas), peridomésticos (tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras, aterros) e silvestre (cavernas, formigueiros, raízes tubulares, toca de roedores) (Feliciangeli, 2004). Os flebotomíneos adultos vivem em abrigos úmidos como fendas de árvores, tocas de animais e fendas de pedras e se alimentam, tanto fêmeas quanto machos, de fontes naturais de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar). Além da fonte de açúcar, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação do folículo ovariano que ocorre após a digestão e absorção dos nutrientes do sangue. Os flebotomíneos possuem, em sua maioria, hábitos crepusculares ou noturnos para realizarem a hematofagia (Forattini et al., 1953; Killick-Kendrick et al., 1977a; Ferro et al., 1997; Killick-Kendrick, 1999; Rangel & Lainson, 2003; Sangiorgi et al., 2012).

Aproximadamente 100 espécies são suspeitas de serem vetores de *Leishmania* sp, porém pouco menos que 50 espécies são vetores comprovados na transmissão do parasito (Desjeux, 2004; Lainson & Rangel, 2005).

A invasão humana em áreas florestais combinada com as mudanças ambientais altera os habitats naturais dos flebotomíneos e modificam a situação ecológica entre vetores e parasitos. A aproximação cada vez maior dos vetores do ambiente peridomiciliar e domiciliar propicia que a transmissão do parasito *Leishmania* ocorra de forma extra silvestre (Lainson & Shaw, 1998; Elnaien et al., 2003; Madeira et al., 2003; Pessoa et al., 2007; Queiroz et al., 2012).

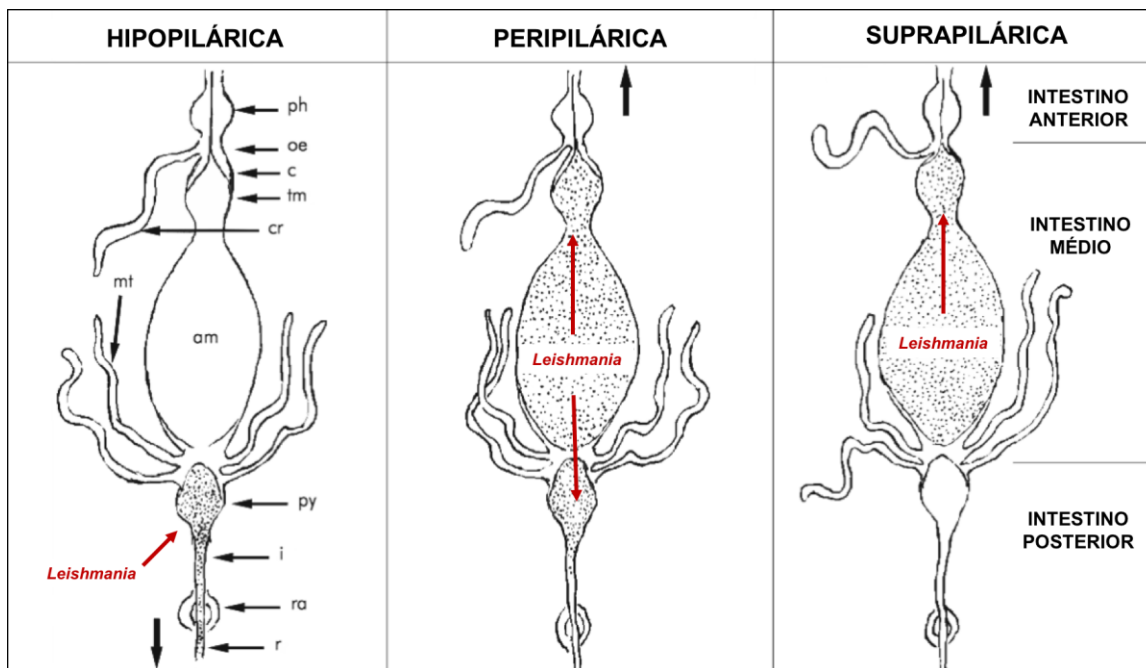
### 1.3 Os parasitos do gênero *Leishmania*

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

O gênero *Leishmania* foi dividido em três subgêneros (*Sauroleishmania*, *Viannia* e *Leishmania*) de acordo com as observações do tipo de desenvolvimento do parasito no intestino do hospedeiro invertebrado (inseto vetor), demonstrado na Figura 1. Na adesão do tipo hipopilárica, os parasitos se desenvolvem no intestino posterior e pertencem ao subgênero *Sauroleishmania*, tendo como hospedeiros apenas os lagartos do Velho Mundo e não apresentam importância médica. A transmissão ocorre quando o inseto infectado é ingerido por lagartos (Lainson & Shaw, 1979).

O subgênero *Viannia* compreende os parasitos que se aderem ao intestino do vetor de forma peripilárica, estabelecendo uma infecção inicial no triângulo pilórico e no intestino posterior. Posteriormente, esses parasitos migram e se desenvolvem na região do intestino médio. Esse grupo inclui parasitos encontrados somente nas Américas, por exemplo, *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* (Lainson & Shaw, 1979).

A maioria das espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, como por exemplo, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* apresentam adesão do tipo suprapilárica e pertencem ao subgênero *Leishmania*. Os parasitos dessas espécies têm o seu desenvolvimento restrito ao intestino médio do vetor (Lainson & Shaw, 1979).



f = faringe; e = esôfago; c = cárdia; imt = intestino médio torácico; p = papo (*crop*); tm = túbulos de Malpighi; ima = intestino médio abdominal; pi = piloro; i = íleo; ar = ampola retal; r = reto.

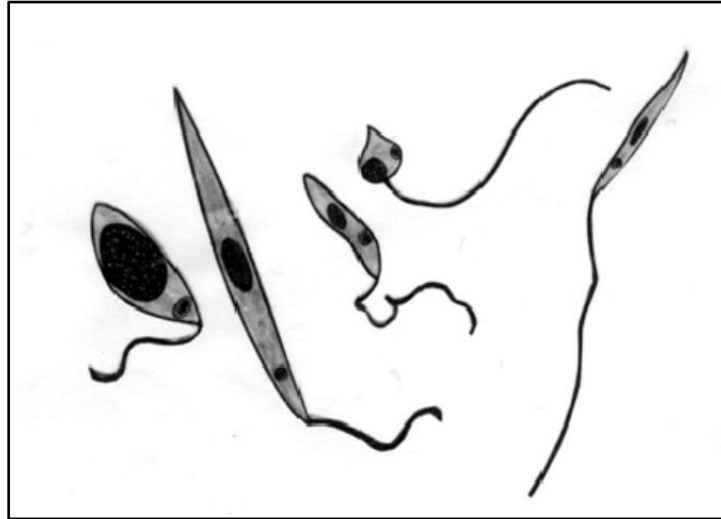
**Figura 1:** Classificação das espécies de *Leishmania* determinada pelo seu padrão de desenvolvimento no tubo digestório do vetor flebotomíneo (Modificado de Lainson & Shaw 1979).

#### 1.4 Interação do protozoário *Leishmania* com o flebotomíneo vetor

O processo de interação do parasito com o vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo está apta a se alimentar de sangue para o desenvolvimento dos seus óvulos. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea pode ingerir, juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado, os protozoários *Leishmania* na forma amastigota, presentes dentro de macrófagos ou em outros tipos de células fagocitárias mononucleares. Os parasitos e o bolo sanguíneo são rapidamente direcionados ao intestino médio do inseto e envoltos pela Matriz Peritrófica (MP), uma matriz quitino-protéica secretada pelo epitélio intestinal do inseto logo após a ingestão do sangue (Terra, 1990; Walters et al., 1993, 1995; Pimenta et al., 1997; Secundino et al., 2005). O ciclo de vida da *Leishmania* no flebotomíneo é

extracelular, ou seja, os parasitos se desenvolvem livres na luz do trato digestório (Nieves & Pimenta, 2000; Sacks, 2001).

Os parasitos enfrentam mudanças adversas durante a passagem do hospedeiro mamífero para o flebotomíneo (Killick-Kendrick, 1990; Bates & Rogers, 2004; Kamhawi, 2006). Para sobreviver a variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes e oxigênio, os parasitos precisam se diferenciar de amastigotas para promastigotas, formas altamente especializadas que se distinguem quanto ao seu requerimento nutricional, habilidade de se dividirem e também em sua morfologia (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; McConville & Handman, 2007; Besteiro et al., 2007). As promastigotas são formas altamente multiplicativas, alongadas, flageladas e extremamente móveis. Conforme a classificação de Lawyer e colaboradores (1990), os seguintes morfotipos podem ser encontrados dentro do vetor: promastigotas procíclicas (formas pequenas e volumosas com 3-12  $\mu\text{m}$  de comprimento e um flagelo geralmente curto), promastigotas nectomonas (formas longas, delgadas, medindo 12-19  $\mu\text{m}$  de comprimento e com flagelo longo), promastigotas paramastigotas (formas em forma de pêra ou ovalares com 3,5-9  $\mu\text{m}$  de comprimento, núcleo justaposto ao cinetoplasto e flagelo de comprimento variável), promastigotas haptomonas (formas largas com corpo celular pequeno medindo 5-12  $\mu\text{m}$  e flagelo de comprimento variável) e promastigotas metacíclicas (formas finas e curtas medindo 6-10  $\mu\text{m}$  e com flagelo longo) (Figura 2).



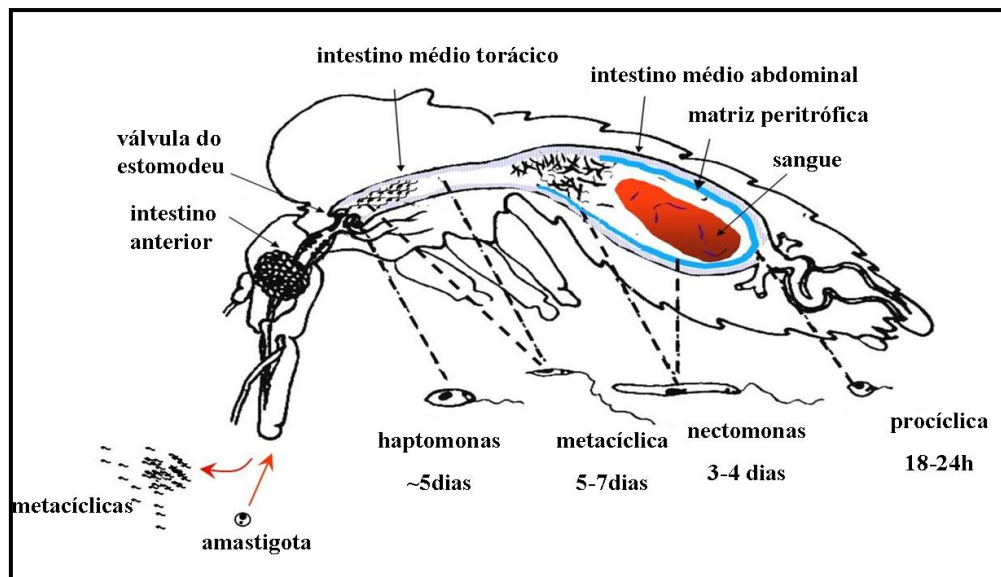
**Figura 2:** Desenho esquemático dos morfotipos de *Leishmania* conforme a classificação de Lawyer e colaboradores (1990). Da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica (Desenho de Paulo Pimenta).

O tempo necessário para que o parasito complete seu ciclo de vida no flebotomíneo é de aproximadamente 6 a 9 dias, dependendo da espécie (revisado por Kamhawi, 2006). Durante os primeiros dias (0 a 2 dias), o desenvolvimento do parasito ocorre no bolo sanguíneo, dentro do intestino abdominal. A diferenciação das amastigotas ingeridas em promastigotas se inicia entre 18 e 24 horas após o repasto, enquanto o sangue é envolvido pela MP (Lawyer et al., 1987, 1990; Secundino et al., 2005). Nesse período, as promastigotas procíclicas sofrem múltiplas divisões e entre 36-48 horas se diferenciam em nectomonas (Figura 3).

Posteriormente, de 2 a 5 dias após o repasto sanguíneo, os parasitos rompem a MP através da produção de quitinase (Sacks et al., 1994) e o conteúdo alimentar, parcialmente digerido, começa a ser eliminado. Uma intensa multiplicação das formas procíclicas e a completa transformação em nectomonas é observada durante esse período. Muitas nectomonas se aderem via flagelo, através de moléculas espécie-específicas de lipofosfoglicano (LPG) presentes na superfície do parasito, (Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994a) às microvilosidades do epitélio intestinal, evitando sua eliminação durante a liberação do bolo fecal. As nectomonas migram para região anterior do intestino médio e se diferenciam em formas denominadas haptomonas, as quais sofrem diversas

multiplicações e são embebidas por um gel produzido pelos parasitos chamado PSG (*Promastigote Secretary Gel*) (Rogers et al., 2002, 2004; Gossage et al., 2003). As haptomonas podem se ligar à válvula do estomodeu (Killick-Kendrick *et al.*, 1974b), provocando um grande acúmulo de parasitos nessa região ou, então, ligarem-se umas às outras formando um “plug” físico concêntrico (Lawyer et al., 1990; Sacks & Kamhawi, 2001).

Durante o estágio final (5 dias ou mais) um grande número de parasitos pode ser observado na válvula do estomodeu e, finalmente, as formas infectantes metacíclicas surgem. Diferente das outras formas de desenvolvimento, as metacíclicas não se dividem e são altamente móveis e livres. Essas formas migram ao longo do intestino anterior, alcançando a faringe e probólide, possibilitando, assim, a sua transmissão durante um novo repasto sanguíneo (Sacks & Kamhawi, 2001).



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

### 1.5 O mecanismo de transmissão

A transmissão é um momento chave no ciclo de vida dos parasitos. O flebotomíneo infectado tem de ser capaz de inocular os parasitos em um hospedeiro vertebrado durante a picada e, para que isso ocorra com sucesso, fatores como o dano físico e biológico provocados pelo parasito à válvula do estomodeu do inseto, o comportamento de sondagem dos flebotomíneos e a ação da saliva do vetor, influenciam e favorecem o mecanismo de transmissão. As fêmeas dos flebotomíneos usam suas peças bucais, que são relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, formando um pequeno poço de sangue no qual elas podem se alimentar (telmatofagia) (Ribeiro, 1987).

Em 1981, Killick-Kendrick e Molyneaux sugeriram que a forma metacíclica do parasito afeta diretamente as sensilas, peças do aparelho bucal responsável por controlar a sondagem e alimentação do inseto, influenciando a taxa e o direcionamento do material no canal alimentar, e promovendo, então, a liberação dos parasitos na pele do vertebrado. Posteriormente, outros estudos relacionaram a transmissão ao dano físico causado à válvula do estomodeu, provocado pela ação de quitinases produzidas pela *Leishmania* (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008). Esse dano físico dificultaria o repasto e favoreceria a regurgitação de promastigotas infectantes na pele do vertebrado.

Outros autores, entretanto, atribuem a transmissão ao bloqueio biológico, formado por massas de parasitos embebidos em uma matriz tipo gel, o PSG, na válvula do estomodeu. Esse gel secretado pelo parasito no intestino médio seria responsável por uma disfunção mecânica da válvula estomodeu, provocada pela pressão que a massa de parasitos exerce no local (Warburg et al., 1986; Lawyer et al., 1987, 1990; Walters et al., 1987, 1989; Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002; Bates, 2007). O bloqueio causado pelo PSG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, aumentando o número de tentativas de picada e o tempo de repasto (Killick-Kendrick et al., 1977b; Beach et al., 1985; Rogers et al., 2002; Rogers & Bates, 2007). Esse aumento na sondagem durante a alimentação, aumenta as chances de o inseto regurgitar os parasitos na pele do vertebrado.



A saliva também desempenha um papel importante na transmissão, intensificando e modulando o estabelecimento da infecção no local da picada no hospedeiro vertebrado (Ribeiro et al., 1995). A saliva dos flebotomíneos contém substâncias com diferentes atividades, tais como: anti-hemostática, vasodilatadora, anti-inflamatória, imunossupressora, anti-coagulante, anti-agregação plaquetária, fator de modulação da patogenicidade e fator indutor de infectividade de *Leishmania* para o vertebrado (Ribeiro, 1987; Titus e Ribeiro, 1990; Ribeiro, 1995; Warburg et al., 1994). Esse repertório de moléculas modulam as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro (Teixeira et al., 2005).

Vários estudos vêm demonstrando o papel importante da saliva na exacerbação da doença. Para diversas espécies de *Leishmania*, a co-injeção de parasitos com homogenados de glândula salivar de *Lu. (L.) longipalpis* ou *P. (P.) papatasi* produzem um aumento substancial no tamanho da lesão (Titus & Ribeiro, 1988; Theodos et al., 1991; Belkaid et al., 1998; Donnelly et al., 1998; revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; Norsworthy et al., 2004), quando comparados ao controle injetado somente com parasitos. Dentre as substâncias responsáveis por exacerbar a infecção, o maxadilan, presente apenas na saliva de *Lu. (L.) longipalpis*, é a mais estudada. A habilidade de o maxadilan exacerbar a infecção por *Leishmania* já foi demonstrada *in vivo*. No modelo murino, as injeções de maxadilan com *L. (L.) major* produziram lesões 2-3 vezes maiores que o controle e continham um número de parasitos até 400 vezes maior (Titus & Mbow, 1999). Além da exacerbação, a saliva pode estar envolvida em um possível mecanismo de bloqueio na transmissão da *Leishmania* e, até mesmo, na proteção do hospedeiro ao parasito (Samuelson et al., 1991; Lima & Titus, 1996; Donnelly et al., 1998; Valenzuela et al., 2001).

Na literatura, a maioria do conhecimento gerado acerca do processo de infecção e do estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado tem sido através da inoculação intradérmica ou subcutânea de parasitos. Os experimentos tradicionais e rotineiros utilizaram inóculos com quantidades variáveis de parasitos (Belkaid et al., 1998, 2000). Em 1986, Warburg & Schlein propuseram que *P. (P.) papatasi* era capaz de transmitir uma dose estimada de 0 a 1.000 parasitos de *L. (L.) major*. Em 2004, Rogers e colaboradores sugeriram que a quantidade de *L. (L.) mexicana* regurgitada por *Lu. (L.)*

*longipalpis* variava de 10 a 10.000 parasitos. Rogers e colaboradores, 2012 demonstraram que para *L. (L.) mexicana* a dose regurgitada é de 1.000 metacíclicas, *L. (L.) infantum* de 500 e para *L. (L.) major* é de 500 a 1.000 parasitos.

Um estudo de transmissão iniciado através da picada do inseto e utilizando a técnica de PCR em tempo real da orelha de camundongos demonstrou que *P. (P.) papatasi* infectado com *L. (L.) major* pode inocular pela picada de 100 a 100.000 parasitos. Cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 600 ou menos promastigotas, enquanto os demais liberaram mais de 1.000 células. Altas doses de infecção foram associadas a intestinos fortemente infectados, com mais de 30.000 parasitos (Kimblin et al., 2008).

No entanto, a frequência de transmissão e a dose parasitária regurgitada durante a transmissão, podem variar dentro e entre as populações de flebotomíneos. Um estudo realizado em 2011 por Stamper e colaboradores, mostrou que o número de parasitos adquiridos pelo inseto durante a infecção artificial pode influenciar o desenvolvimento da infecção e a transmissão. Infecções iniciadas com uma alta dose parasitária apresentaram insetos com uma maior dose de infecção, assim como, uma porcentagem maior de promastigotas metacíclicas no intestino médio e, também, um número maior de parasitos presentes em orelhas de camundongos expostos a picada do inseto infectado. Em 2012, Secundino e colaboradores demonstraram, através da quantificação por real time PCR de orelhas expostas a picada, que *Lu. (L.) longipalpis* é capaz de transmitir entre 10 a 10 000 *L. infantum chagasi* (média de: 1.002), sendo que 75% dos flebotomíneos foram capazes de transmitir mais de 300 parasitos durante a picada.

## **1.6 Competência Vetorial**

Para a incriminação de uma espécie de flebotomíneo como vetor de *Leishmania* sp. diversos critérios devem ser preenchidos. Segundo Killick-Kendrick (1990), os parâmetros que orientam a incriminação dos flebotomíneos, são: (1) o comportamento antropofílico, (2) a distribuição geográfica coincidente com a da doença, (3) a competência vetorial e a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana, (4) o grau de relacionamento com os reservatórios e

com o homem, (5) a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito, (6) a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório e (7) a capacidade desses insetos se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasita por meio da picada em modelos experimentais. Recentemente, após a revisão destes critérios, foi proposto a inclusão de novos parâmetros para a comprovação vetorial de uma espécie de flebotomíneo. Esses parâmetros incluem, uma modelagem matemática que demonstre que a espécie é fundamental para a manutenção da transmissão do parasito e também a verificação da diminuição da incidência da doença causada pela redução da densidade do vetor específico (Ready, 2013).

Estudos relacionados à interação parasito-vetor, sugerem que esses os flebotomíneos possam ser classificados em dois grupos: “Vetores Naturais” ou “Vetores Permissivos”. Algumas espécies de flebotomíneos vetores apresentam um comportamento refratário ao desenvolvimento da maioria das espécies de *Leishmania*, permitindo uma interação espécie-específica com o parasito. Essas espécies são denominadas de Vetores Naturais e apresentam como exemplares as espécies do Velho Mundo, *P. (P.) papatasi* e *P. (P.) sergenti* (Pimenta et al., 1994b; Kamhawi et al., 2000). Outras espécies, como por exemplo *Lu. (L.) longipalpis* (Walters et al. 1993), *P. (P.) argentipes* (Pimenta et al. 1994a), *P. (A.) halepensis* e *P. (A.) arabicus* (Sadlova et al., 2003), suportam ou permitem a manutenção e desenvolvimento da infecção por mais de uma espécie de *Leishmania*, recebendo a denominação de vetores permissivos (Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 1994a; Rogers et al., 2002, 2004).

A capacidade vetorial dos flebotomíneos é controlada pela habilidade das promastigotas de se ligarem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Essa adesão é determinada pelo polimorfismo espécie-específica de um lipofosfoglicano (LPG) presente no parasito. O LPG é o glicoconjugado majoritário na superfície de promastigotas de *Leishmania*, está localizado ao redor de todo o parasito, inclusive no flagelo, e é organizado como um glicocálice filamentosos (Pimenta et al., 1992; Turco & Descoteaux, 1995; Pimenta et al., 1994a; Mahoney et al., 1999; Sacks et al., 2000; Soares et al., 2002; Coelho-Finamore et al., 2011). Além de mediar a interação dos parasitos com o epitélio intestinal do vetor, a molécula de LPG parece proteger a superfície celular

das promastigotas de atividades líticas do intestino (Borovsky & Schlein, 1987; Schlein, 1993).

A habilidade de *P. (P.) papatasi* em transmitir somente *L. (L.) major* é atribuída ao se LPG composto por múltiplos resíduos de  $\beta$ -galactoses terminais, que permite a adesão dessa espécie específica de *Leishmania*, mas não de outras, uma vez que outras cinco espécies de *Leishmania*, que não contêm os mesmos resíduos, falharam em aderir ao intestino de *P. (P.) papatasi* ou em persistir no intestino após a defecação (Pimenta et al., 1994a). A ideia de que a adesão ao intestino é espécie-específica também é reforçada pelo trabalho de Kamhawi e colaboradores, 2000, que mostraram que intestinos de *P. (P.) sergenti* foram intensamente marcados após incubação com LPG purificado de *L. (L.) tropica*, mas não com o LPG de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*. Porém, acredita-se que o mecanismo de adesão do parasito ao intestino médio dos vetores permissivos não é dependente de LPG. Segundo Myskova e colaboradores em 2007, alguns flebotomíneos são facultativos para o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* e os fatores determinantes na interação com os parasitos não resultam de interações com lectinas e LPG (como proposto para o vetor natural). Desta forma o paradigma da "adesão" nos vetores permissivos pode ser entendido de forma diferente. Alguns autores demonstraram que N-acetilgalactosamina (GalNAc) estavam presentes nos insetos permissivos, mas não nos vetores específicos. O ancoramento do parasito, então, estaria relacionado à presença de GalNAc no intestino médio e à ocorrência de lectinas na superfície de *Leishmania*. (Myskova et al. 2007, Svárovská et al. 2010, Secundino et al. 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a competência vetorial do flebotomíneo *Lu. (L.) longipalpis* após a infecção com diferentes espécies de *Leishmania*, considerando diferentes concentrações de parasitos, a fim de compreender os aspectos determinantes da sua permissividade.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1. Caracterizar a infecção experimental do *Lu. (L.) longipalpis* por diferentes espécies de *Leishmania*;

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

2.2.3. Avaliar a competência de *Lu. (L.) longipalpis* em transmitir diferentes espécies de *Leishmania*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Parasitos

Foram utilizadas as seguintes cepas de parasitos: *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/70/BH46), *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/H2903), *Leishmania (L.) major* FV1 (MHOM/IL/80/ NP) e *Leishmania (L.) mexicana* (MNYC/BZ/62/M379). Tais parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), penicilina (100U/mL), streptomina (50 µg/mL), glutamina (12,5 mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) e 2,5 µg/mL hemina (todos provenientes da Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Os parasitos foram cultivados em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 26°C no Laboratório. Para a realização de todos os experimentos descritos a seguir foram utilizados somente parasitos de no máximo 10 passagens em cultura axênica.

#### 3.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos *Lu. (L.) longipalpis* foram capturados na Gruta da Lapinha, localizada nas imediações da cidade de Lagoa Santa, a 60 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'W; latitude 19°03'S), estado de Minas Gerais, Brasil. Os insetos foram capturados com armadilha luminosa tipo CDC (Center for Disease Control light trap) (Sudia & Chamberlain, 1962). Estas armadilhas foram colocadas no início da tarde (por volta das 14 horas) e retiradas no início da manhã do dia seguinte (por volta das 9 horas). Um espécime de *Gallus gallus domesticus* foi mantido no interior da gruta, servindo como fonte de atração para os flebotomíneos (Figura 4). Os experimentos de transmissão, via picada, e xenodiagnóstico foram realizados utilizando flebotomíneos provenientes de colônia. Os insetos adultos foram mantidos em recipientes de papel a 25°C e 75% de umidade relativa em um ciclo de luz/escuridão de 12 h.



**Figura 4:** Local de coleta de *Lu. (L.) longipalpis* - Gruta da Lapinha, Lagoa Santa/MG. (A) Vista geral da entrada da gruta (seta). (B) e (C) detalhe do local de coleta onde foram colocadas as armadilhas (Fonte: Vanessa Freitas).

### 3.3 Infecção Experimental

#### 3.3.1 Preparo do sangue

O sangue foi coletado diretamente por punção cardíaca em camundongos (*Mus musculus*) Balb/c. Os camundongos foram previamente anestesiados com Tiopental (Tiopental Sódico via intramuscular) e, após a retirada do sangue, o camundongo, ainda anestesiado, foi submetido à eutanásia por deslocamento cervical. O plasma foi colocado em “banho maria” a 57 °C por uma hora, para inativação do sistema complemento e as hemácias foram lavadas em PBS estéril por três vezes.

#### 3.3.2 Preparo dos parasitos

Cinco mililitros da cultura de cada cepa de *Leishmania* foram centrifugados (3200 rpm) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspenso em meio M199 (não suplementado com soro) e/ou em PBS estéril. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições anteriores. Ao novo “pellet” foi adicionado cerca de 1000µl de meio M199 e ou PBS estéril. Os parasitos foram contados em hemocitômetro (tipo câmara de Neubauer). Posteriormente, o sangue foi reconstituído (hemácias e plasma) e os parasitos foram adicionados nas concentrações de  $4 \times 10^7$  ou  $5 \times 10^6$  por mL de sangue. Também foram adicionados 30 µl de antibióticos, Penicilina-Streptomicina ( $1 \times 10^4$  U/mL Penicilina, 10 mg/mL Estreptomicina diluído em 0.9% Salina), por mL de sangue.

#### 3.3.3 Processo de Infecção Experimental

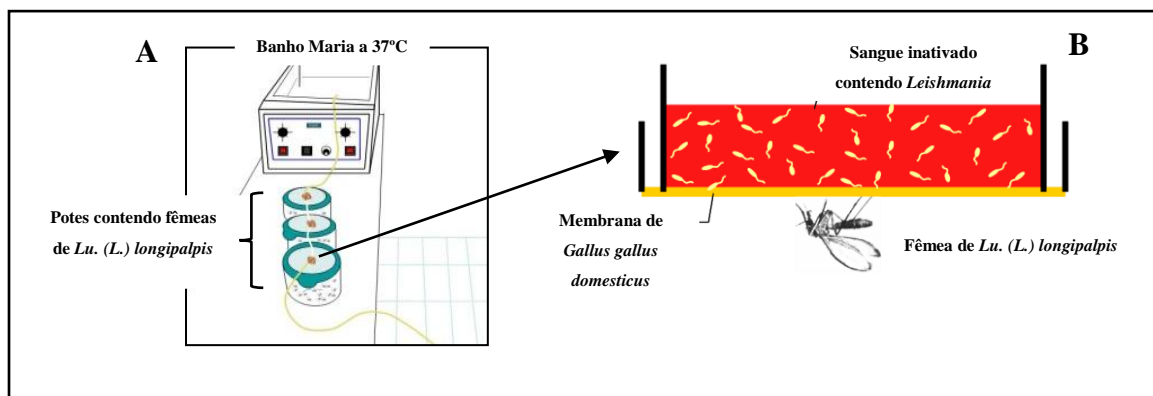
A infecção experimental dos insetos foi realizada por meio de um sistema artificial de alimentação que simula a temperatura de um hospedeiro vertebrado, no qual pequenos recipientes de vidro, semelhantes a funis invertidos com capacidade de 300-500 µl, foram conectados através de mangueiras finas (do tipo usado em aquário). Cada recipiente de vidro (alimentador) foi revestido, na parte inferior, com pele recém dissecada de *Gallus gallus domesticus* jovem e preenchido com sangue de camundongo



(*Mus musculus*) Balb/c heparinizado, contendo as concentrações de parasitos já descritas acima. O sistema de alimentação descrito pode ser observado na Figura 5.

O sangue foi mantido entre 37°C e o sistema foi conectado a um banho maria, no qual a água circulava através dos recipientes ligados às finas mangueiras, utilizando-se uma bomba do tipo aquário. A parte inferior do recipiente, revestida com a pele de *G. (g.) domesticus* jovem, foi colocada no orifício no tecido do tipo filó (localizada na parte superior da gaiola contendo os insetos), permitindo dessa forma, que os flebotomíneos fossem atraídos pelo calor e se alimentassem com sucesso. O tempo de repasto geralmente foi de 2-3 horas.

Após a alimentação experimental, as fêmeas engorgitadas foram separadas e mantidas no infectório, se alimentando com solução de sacarose 30% *ad libitum*. Diariamente os flebotomíneos mortos foram retirados dos potes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e uma média de 150 flebotomíneos, por espécies de *Leishmania*, foi utilizada em cada infecção experimental.



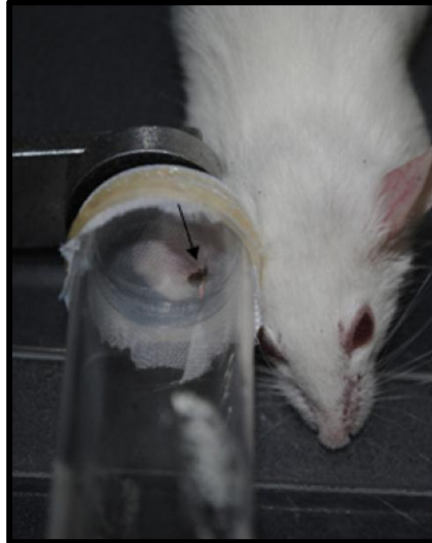
**Figura 5:** Esquema do processo de infecção experimental. (A) Vista geral do processo de alimentação e dos potes contendo os flebotomíneos. (B) Detalhe do alimentador artificial revestido por pele de *Gallus gallus domesticus* jovem contendo sangue e promastigotas de *Leishmania* (Esquema adaptado de Vanessa Freitas).

### 3.3.3 Dissecção do intestino médio

Fêmeas alimentadas foram anestesiadas no freezer (-20° C) por 5 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo PBS (pH 7,2) sobre gelo, de forma que os insetos ficassem imobilizados. As fêmeas foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de PBS (cerca de 30-40 microlitros) e com a ajuda de estiletos e sob um microscópio estereoscópio foram dissecadas. Cada intestino dissecado, individualmente, foi colocado em um tubo de 1,5 mL contendo 30 µl de PBS, em seguida foram macerados e o número de promastigotas em cada intestino foi quantificado através de contagem em câmara de Neubauer.

### 3.3 Transmissão

Para os experimentos de transmissão, além das doses de  $4 \times 10^7$  e  $5 \times 10^6$ , foi adicionada uma terceira concentração de parasitos ( $5 \times 10^5$ ). Quatorze dias após a infecção (14 d.p.i.), 15-20 flebotomíneos foram transferidas para frascos de plástico pequenos com um dos lados revestidos com malha, e colocadas nas orelhas de camundongos Balb/c (*Mus musculus*) por um período de 1-3 horas no escuro. Os camundongos expostos a picadas de flebotomíneos infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* foram mantidos no biotério por até três meses. Após esse período, a carga parasitária das orelhas expostas às picadas de *Lu. (L.) longipalpis* foi quantificada seguindo o protocolo descrito em Lima et al., 1997. Os camundongos expostos a picadas dos flebotomíneos infectadas com *L. (L.) infantum chagasi* foram eutanasiados imediatamente após a transmissão e as orelhas foram analisadas por qPCR (Qiagen), seguindo o manual do fabricante.



**Figura 6:** Processo de transmissão, no qual *Lu. (L.) longipalpis* infectados foram colocados na orelha de camundongos Balb/c (*Mus musculus*). Em destaque na seta está um flebotomíneo engorgitado (Fonte: Nágila Secundino).

### 3.4 Infecção dos camundongos e Xenodiagnóstico

Para realizar os experimentos de xenodiagnóstico, 1000 parasitos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) major* foram inoculados na pata esquerda de camundongos Balb/c (*Mus musculus*) e o progresso das lesões cutâneas foi acompanhado. Quando lesões cutâneas aparentes foram detectadas, 150-200 flebotomíneos naïve foram colocados para se alimentarem do local da lesão. Sete e quatorze dias após o xenodiagnóstico, grupos de flebotomíneos foram dissecados para determinar a carga parasitária. O intestino de cada flebotomíneo foi dissecado, individualmente e os parasitos quantificados seguindo o protocolo já descrito anteriormente.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism 7. Utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA) para análise estatística. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### **3.6 Comitê de Ética**

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do Manual de Uso de Animais (FIOCRUZ, Ministério da Saúde do Brasil, Decreto Nacional, Nr. 3179), aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Ministério da Saúde do Brasil, Nr. L-1715) e pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Animal Care and Use Committee, sob protocolo animal LMVR4E, e tratado de acordo com o Care and Use of Laboratory Animals and with the NIH OACU ARAC.

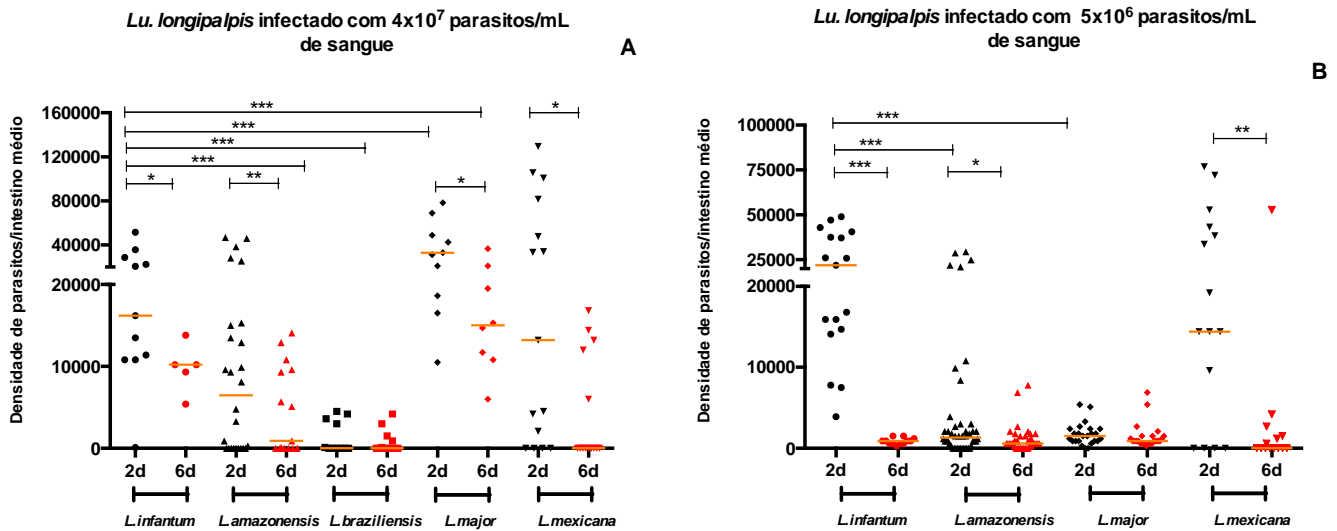
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Infecção experimental

A densidade parasitária, por flebotomíneo, foi analisada durante o desenvolvimento inicial da infecção (2 dias pós infecção – 2 d.p.i.), quando o sangue ainda está presente no intestino médio do inseto, e durante o desenvolvimento tardio (6 dias pós infecção – 6 d.p.i.), quando o sangue já foi totalmente digerido. O *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de manter a infecção por todas as espécies de *Leishmania* até o último dia analisado, quando a maior concentração de parasitos ( $4 \times 10^7$ ) foi usada. A densidade parasitária variou de acordo com as espécies de *Leishmania*.

Os flebotomíneos infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* apresentaram as maiores densidades parasitárias, nos dois dias analisados (média de parasitos: 2 d.p.i. = 37.100 e 50.372; 6 d.p.i. = 4.457 e 16.950, respectivamente). Os insetos infectados com *L. (L.) infantum chagasi* ou *L. (L.) amazonensis* apresentaram no 2 d.p.i. uma média de 20.191 e 11.065 parasitos, respectivamente. No 6 d.p.i, a densidade de parasitos dentro do vetor diminuiu para ambas as espécies (média: 9.780 e 4.566, respectivamente). *Leishmania braziliensis* apresentou as menores densidades de parasitos durante as infecções inicial e tardia (média de parasitos: 2 d.p.i. = 1.400 e 6 d.p.i. = 881) (Figura 7A).

Com a dose de  $5 \times 10^6$ , a média de parasitos durante as infecções inicial e tardia foi a seguinte: *L. (L.) infantum chagasi* = 24.970 e 875; *L. (L.) amazonensis* = 4.278 e 1.121; *L. (L.) major* = 1.737 e 1.462, e *L. (L.) mexicana* = 25.920 e 4.500. A *L. (L.) braziliensis* não foi analisada, uma vez que esta espécie só conseguiu se desenvolver bem na dose mais alta de parasitos, como mostrado acima. Ao comparar as infecções iniciais e tardias de *Lu. (L.) longipalpis* para cada espécie de *Leishmania*, houve diferenças significativas no número de parasitos em *L. (L.) infantum chagasi* ( $p < 0,001$ ), *L. (L.) amazonensis* ( $p < 0,001$ ) e *L. (L.) mexicana* ( $p < 0,001$ ). Observamos, também, uma diferença significativa entre *L. (L.) infantum chagasi* com *L. (L.) major* ( $p < 0,001$ ) e *L. (L.) amazonensis*, em ambos os dias ( $p < 0,001$ ). (Figura 7B)



**Figura 7:** *Lu. (L.) longipalpis* é capaz de sustentar o desenvolvimento inicial de todas as espécies de *Leishmania* na alta dose parasitária. *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* na concentração de  $4 \times 10^7$  (A) e  $5 \times 10^6$  (B) parasitos por mL de sangue. *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* mostraram um alto número de parasitos, enquanto *L. (V.) braziliensis* apresentou a menor carga parasitária. ( $4 \times 10^7$  – estimativa de 8.000 parasitos/flebotomíneo;  $5 \times 10^6$  – estimativa de 1.000 parasitos/flebotomíneo). As linhas horizontais indicam a mediana. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ ).

## 4.2 Transmissão

Com o objetivo de investigar fatores importantes que caracterizam uma infecção madura (número de parasitos, presença do “plug” parasitário e de formas metacíclicas), 13 dias após a infecção experimental, 5 insetos infectados por cada espécie de *Leishmania* foram dissecados e analisados. Todos os flebotomíneos infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* apresentaram um alto número de parasitos, presença do plug parasitário e de formas metacíclicas na região anterior do trato digestivo do vetor, em todas as doses utilizadas. Em contraste, os insetos infectados

com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* apresentaram baixo número de parasitos e não foi observado nenhum plug e, tampouco, a presença de parasitos metacíclicos na região anterior do intestino (Tabela 1).

**Tabela 1:** Condições importantes de uma infecção madura em *Lu. (L.) longipalpis* infectados com diferentes espécies de *Leishmania*.

Espécie	Número de parasitos						Plug			Metacíclica		
	Alto			Baixo			4x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	4x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>						
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x	x	x	x
<i>L. (L.) major</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x	x	x	x
<i>L. (L.) mexicana</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x	x	x	x
<i>L. (L.) amazonensis</i>	-	-	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-
<i>L. (V.) braziliensis</i>	-	-	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-

x = presença / - = ausência

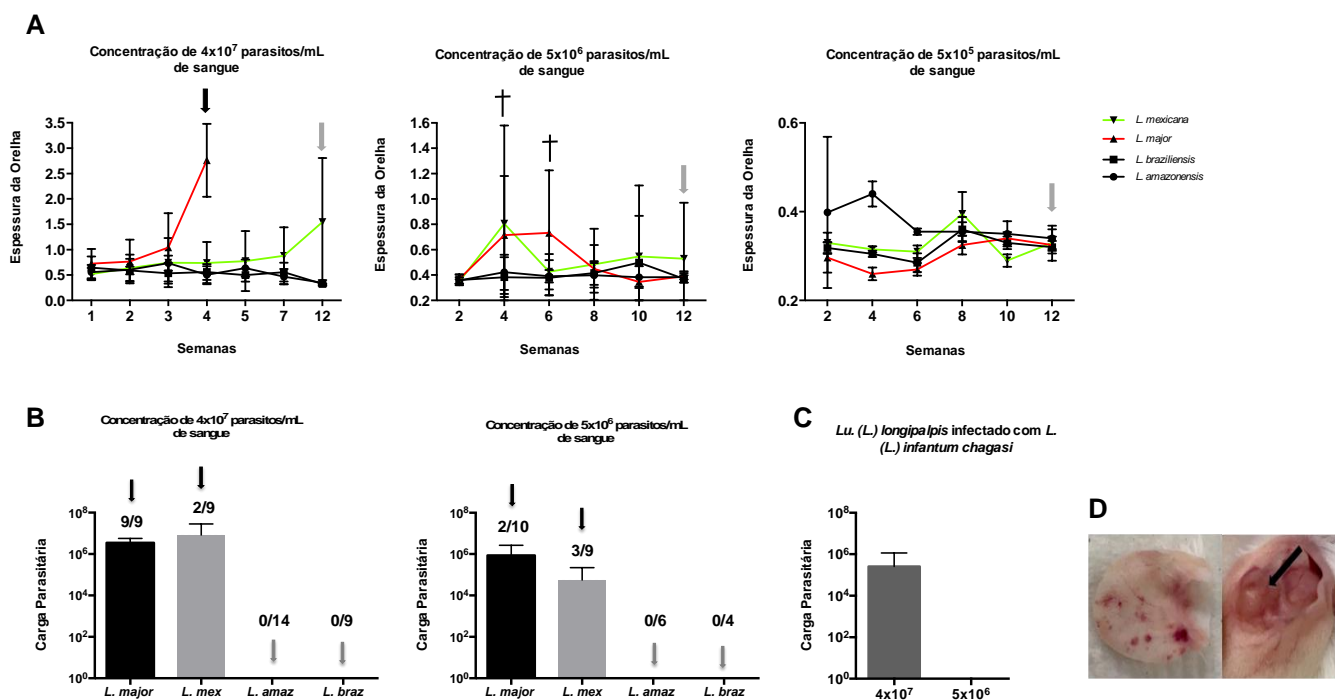
Os camundongos expostos às picadas de flebotomíneos infectados (dose: 4x10<sup>7</sup>) com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* mostraram um aumento na espessura das orelhas e as lesões aparentes foram observadas 3 semanas após a transmissão para *L. (L.) major* (Figura 8C) e 12 semanas para *L. (L.) mexicana*. Os camundongos expostos a picadas de flebotomíneos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* não apresentaram aumento na espessura das orelhas e nenhuma lesão aparente foi observada até 12 semanas após a transmissão (Figura 8A).

Os animais expostos a picada dos flebotomíneos infectados com a dose de 5x10<sup>6</sup> de *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* também apresentaram aumento na espessura das orelhas, porém, o contrário do que foi observado na dose mais alta, as lesões aparentes foram menores. Os camundongos expostos a picadas de flebotomíneos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* mais uma vez não apresentaram aumento na espessura das orelhas e nenhuma lesão aparente foi observada 12 semanas após a transmissão (Figura 8A).

Quando os flebotomíneos foram infectados com a menor dose parasitária, 5x10<sup>5</sup>, os insetos não foram capazes de transmitir nenhuma espécie de *Leishmania*. Os camundongos expostos a picadas de flebotomíneos infectados, por todas as espécies, não apresentaram aumento na espessura das orelhas e nenhuma lesão aparente foi observada até 12 semanas após a transmissão (Figura 8A). Aparentemente a dose de 5x10<sup>6</sup>, em

condições experimentais, é a dose limite para o *Lu. (L.) longipalpis* ser capaz de transmitir o parasito.

Após 12 semanas todos os animais foram sacrificados e a carga parasitária presente nas orelhas foi quantificada. Apenas os animais expostos a insetos infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* apresentaram parasitos na orelha. Os flebotomíneos infectados com *L. (L.) major* se mostraram mais eficientes na transmissão do parasito, na dose maior, uma vez que todas as orelhas analisadas e expostas às picadas foram positivas para *Leishmania* (Figura 8B).



**Figura 8: Leishmaniose cutânea (LC) causada por *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (A) Espessura das orelhas em animais expostos às picadas de flebotomíneos infectados com *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*. (B) Carga parasitária de 12 semanas após transmissão. As setas determinam o tempo em que a carga foi quantificada. (C) Carga parasitária de orelhas expostas às picadas de *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) infantum chagasi*. (D) Orelha com picadas de flebotomíneos (esquerda) após transmissão e lesões cutâneas (direita, seta) 3 semanas pós-transmissão por picada de *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) major* (dose  $4 \times 10^7$ ).**

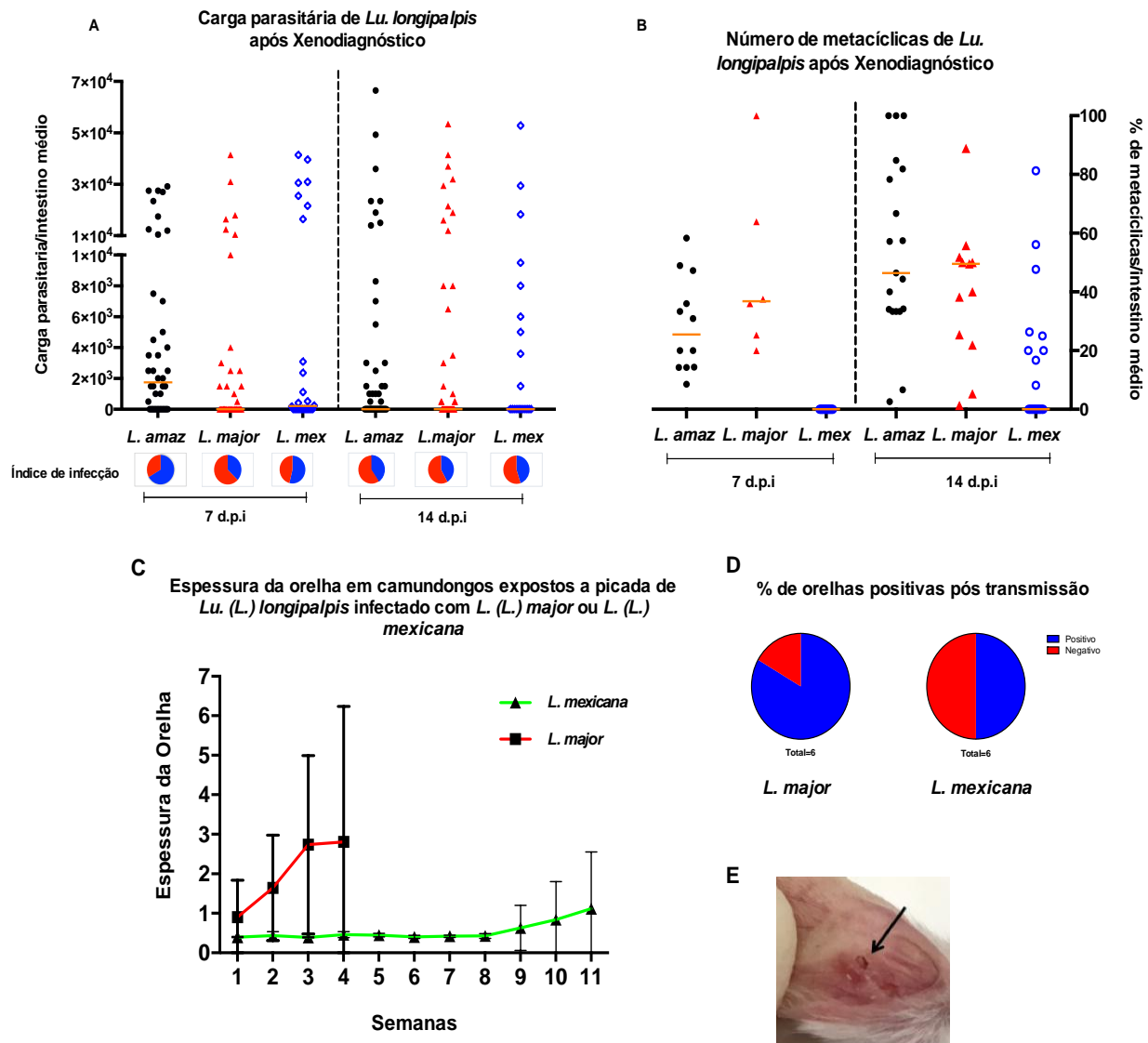


### 4.3 Xenodiagnóstico

O *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de se infectar, através da picada, com parasitos de lesões cutâneas em animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) major*. O vetor, também, sustentou a infecção por essas espécies por até 14 dias após a infecção (Figura 9A). As espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* apresentaram uma taxa de crescimento semelhante no vetor (intestinos médios infectados: 66% e 53%, respectivamente), enquanto a espécie *L. (L.) major* apresentou a menor porcentagem de intestinos positivos, 37%.

A presença das formas metacíclicas no intestino médio do vetor foi avaliada no 7º e 14º dias após a infecção. Todas as espécies de *Leishmania* foram capazes de se diferenciar pelo processo de metaciclogênese dentro de *Lu. (L.) longipalpis*, porém os insetos infectados com *L. (L.) mexicana* só apresentaram a forma metacíclica no 14º dia. A presença da forma infectiva ao hospedeiro vertebrado no vetor é essencial para o sucesso da transmissão (Figura 9B).

O *Lu. (L.) longipalpis* se mostrou ser um vetor competente, em condições experimentais, para *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*, se infectando de lesões cutâneas e transmitindo os demais parasitos a camundongos Balb/c naïves. Esses animais mostraram um aumento na espessura da orelha, lesões cutâneas aparentes e presença de parasitos na orelha (Figura 9C-E).



**Figura 9:** *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de se infectar de uma lesão cutânea causada por *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana* e transmiti-los a camundongos Balb/c naïves. (A) Intestinos médios de *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (B) Porcentagem de metacísticas presentes no intestino médio de *Lu. (L.) longipalpis*. (C) Espessura das orelhas de animais expostos às picadas do vetor infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*. (D) Porcentagem de orelhas positivas após exposição às picadas de insetos infectados. (E) Lesão cutânea, causado por *Lu. (L.) longipalpis* infectado com *L. (L.) major* em Balb/c.

## 5 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos que caracterizaram a interação do protozoário *Leishmania* com Vetores Permissivos foi desenvolvida com espécies do Velho Mundo e com altas doses parasitárias (Walters et al., 1993; Pimenta et al., 1994a, 1994b; Kamhawi et al., 2000; Sacks & Kamhawi, 2001; Sadlova et al., 2003; Myskova et al., 2007; Volf & Myskova, 2007; Svárovská et al., 2010, Secundino et al., 2010). As condições experimentais, principalmente o número excessivo de parasitos utilizados nas infecções experimentais, pode permitir um desenvolvimento “artificial” dos parasitos dentro do vetor. Até o momento, este é o primeiro estudo focalizando a competência vetorial de *Lu. (L.) longipalpis* utilizando, além de diversas espécies de *Leishmania*, diferentes concentrações de parasito ( $4 \times 10^7$ - estimativa de 8.000 parasitos/flebotomíneo alimentado;  $5 \times 10^6$ - estimativa de 1.000 parasitos/flebotomíneo alimentado e  $5 \times 10^5$  - 100 parasitos/flebotomíneo alimentados).

A história da epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Brasil tem mostrado um papel constante do *Lu. (L.) longipalpis* como um elo essencial na cadeia de transmissão, sendo o principal vetor da doença no país. A capacidade de se alimentar com frequência em animais domésticos e sinantrópicos, bem como sua antropofilia notável, favorecem o *Lu. (L.) longipalpis* em sua adaptação a ambientes modificados, permitindo a manutenção do ciclo de transmissão da Leishmaniose Visceral no meio rural e sua disseminação para áreas urbanizadas (Rangel et al, 2008). Consequentemente, é importante ressaltar a necessidade em acrescentar novos conhecimentos sobre a biologia de *Lu. (L.) longipalpis* para melhor entender os processos envolvidos na transmissão do parasito e na epidemiologia das Leishmanioses.

Nossos resultados demonstraram que quando usamos uma maior dose parasitária ( $4 \times 10^7$ ), dose similar a usadas na maioria dos estudos, todas as espécies de *Leishmania* foram capazes de se desenvolverem no *Lu. (L.) longipalpis*, corroborando com os diversos estudos que mostraram a capacidade desse vetor em se infectar, experimentalmente, por *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (Coelho et al., 1967a, b; Abdulrahman et al., 1998; Molyneux et al., 1975; Silva et al., 1990; Walters et al., 1993; Stierhof et al., 1999;

Rogers et al., 2002). No entanto, a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou um índice baixo de infecção nos dois dias analisados (média de parasitos: 2 d.p.i. = 1.400 e 6 d.p.i. = 881) e, quando diminuimos a concentração de parasitos, essa espécie não foi capaz de se desenvolver dentro do vetor. Acreditamos que esse fato pode estar atribuído ao diferente comportamento de colonização do trato digestório do flebotomíneo que o subgênero *Viannia* apresenta, visto que os parasitos inicialmente ficam restritas ao intestino posterior, principalmente o triângulo pilórico, e depois migram para a região anterior do intestino e se aderem ao epitélio intestinal (Lainson & Shaw, 1979). Em 2000, Nieves & Pimenta, ao estudar o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* em *Lutzomyia (L.) migonei*, observaram o típico comportamento peripilárico do parasito, com uma invasão de órgãos diferentes do intestino e dos tubos de Malpighi. Considerando esses fatos, acreditamos que *Lu. (L.) longipalpis* infectados com *L. (V.) braziliensis* não foram capazes de manter a infecção, pois essa espécie não conseguiu colonizar a parte anterior do trato digestório do vetor.

As demais espécies de *Leishmania* – *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* – foram capazes de desenvolverem no vetor mesmo quando a dose mais baixa foi utilizada, porém uma diminuição no número de parasitos presentes no intestino médio do vetor foi observada. Quando comparamos a capacidade de *Lu. (L.) longipalpis* em sustentar a infecção, utilizando  $4 \times 10^7$  e  $5 \times 10^6$ , foi possível ver uma drástica queda no número de parasitos (*L. (L.) major* - 2 d.p.i. = 37.100 para 1.737 e 6 d.p.i. = 4.457 para 1.462; *L. (L.) mexicana* - 2 d.p.i. = 50.372 para 25.920 e 6 d.p.i. = 16.950 para 4.500). Portanto, a habilidade de *Lu. (L.) longipalpis* em se infectar, experimentalmente, por diferentes espécies de *Leishmania* é dose dependente, sugerindo, então, que em altas cargas parasitárias o vetor desenvolve um “comportamento permissivo no laboratório” e esse perfil vai se perdendo à medida que essas doses vão simulando o número de parasitos que um flebotomíneo pode ingerir na natureza durante um repasto sanguíneo.

Um decréscimo no número de parasitos, quando comparamos o tempo inicial da infecção (2 d.p.i.) e o tempo tardio (6 d.p.i.), também foi observado. Esse decréscimo no índice da infecção é normal durante o processo de colonização do trato digestório do flebotomíneo, demonstrado também por Nieves & Pimenta, 2000 e Secundino et al.,

2005. A presença de parasitos seis dias após a infecção experimental, quando o sangue já foi totalmente digerido, sugere que as espécies de *Leishmania* foram capazes de se aderirem ao epitélio intestinal do *Lu. (L.) longipalpis* e não foram eliminadas após a digestão completa do bolo alimentar. Porém, alguns decréscimos no número de parasitos são observados, devido à eliminação daqueles parasitos que não conseguiram sobreviver a essa etapa do ciclo de vida. O alto índice de parasitos encontrados no segundo dia após a infecção experimental pode ser atribuído, principalmente, pela presença de sangue no intestino médio do vetor. O sangue, que não foi totalmente digerido, funciona como um meio de cultura e favorece o desenvolvimento dos parasitos.

Para ser considerado um vetor competente, o flebotomíneo deve ser capaz de se infectar com *Leishmania* e ser capaz de transmitir o parasita ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, através da picada. Na natureza, os flebotomíneos tornam-se infectados com doses diferentes de parasitos dependendo de seu comportamento alimentar, concentração de parasitos na lesão ou da fonte alimentar na qual os insetos se alimentam. Em 2011, Stamper e colaboradores observaram que os grupos de flebotomíneos infectados com doses iniciais maiores de parasitos, tinham infecções mais pesadas e maior probabilidade de transmiti-los durante uma segunda tentativa de alimentação, causando uma doença mais grave quando a transmissão era bem-sucedida. O mesmo foi observado por Kimblin e colaboradores (2008), em um estudo de transmissão utilizando picadas de flebotomíneos individualizados, no qual foi observado uma correlação direta entre a intensidade das infecções intestinais e da dose transmitida. Nossos dados de transmissão, utilizando insetos infectados com *L. (L.) major* ou *L. (L.) mexicana*, também comprovam essa correlação dose parasitária-transmissão sucedida. Os insetos infectados com maior carga parasitária foram mais eficientes na transmissão da *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado. Essa eficiência na transmissão foi se perdendo a medida que a carga parasitária foi diminuindo, demonstrando que altas cargas parasitárias favorecem as chances do vetor em transmitir o parasito, visto que o número de parasitos eliminados após a digestão completa do sangue é superado pelo número excessivo de parasitos utilizados nas infecções experimentais.

*Lutzomyia (L.) longipalpis* infectados, através de infecções experimentais ou através da picada em lesões cutâneas, com *L. (L.) amazonensis* não foram capazes de

transmitir o parasito durante a picada ao camundongo. Os flebotomíneos expostos às lesões cutâneas apresentaram números maiores de parasitos e uma boa porcentagem de metacíclicas no 14º dia após a infecção. Possivelmente fatores envolvidos na obtenção natural do parasito, tais como microbiota do vertebrado e componentes do sistema imune, podem ter influenciado o desenvolvimento desse parasito dentro do vetor. A falha na transmissão do parasito ao hospedeiro pode ser atribuída à algum erro durante a etapa de adesão ao epitélio do intestino médio, migração para o intestino anterior ou no processo de metaciclogênese. A presença de metacíclicas, localizadas predominantemente na porção posterior do intestino dos insetos infectados com *L. (L.) amazonensis*, sugere que essa espécie pode necessitar de um tempo maior para migrar para a região anterior do inseto ou, até mesmo, que o parasito sofra algum bloqueio físico ou biológico dentro do vetor que o impede de migrar e ser transmitido durante um novo repasto sanguíneo. Um estudo realizado por Nieves & Pimenta (2000), avaliando o desenvolvimento de *L. (L.) amazonensis* em *Lu. (L.) migonei* mostrou que o parasito apresentou uma taxa de infecção maior do que o par natural do vetor, *L. (V.) braziliensis*, e diferente dos nossos dados, o vetor foi capaz de transmitir o parasito ao vertebrado, sugerindo, então, que *Lu. (L.) migonei* possa ser vetor competente para essa espécie de *Leishmania*, que coexiste com o vetor nas mesmas áreas geográficas. Uma vez que os aspectos da interação *L. (L.) amazonensis*–*Lu. (L.) longipalpis* ainda não estão totalmente elucidados, estudos que aumente os conhecimentos dessa interação são fundamentais.

A capacidade de *Lu. (L.) longipalpis* de se infectar, experimentalmente, por *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* já foi demonstrada em outros trabalhos (Walters et al., 1993; Coelho et al., 1967; Abdulrahman et al., 1998; Stierhof et al., 1999; Rogers et al. 2002), no entanto, o nosso estudo é o primeiro a comprovar a competência do vetor em transmitir essas espécies ao hospedeiro vertebrado e de sustentar infecções iniciadas com baixa carga parasitária. O *Lu. (L.) longipalpis* foi capaz de se infectar, tanto através de infecções experimentais quanto pela picada em lesões cutâneas, por ambas as espécies de *Leishmania*. Embora essas espécies não sejam os pares naturais para o vetor na natureza, os parasitos conseguiram se desenvolver dentro do vetor, superando todos os obstáculos e completando o ciclo de vida do parasito. Possivelmente pressões seletivas devem atuar para favorecer a compatibilidade dessas espécies de *Leishmania* com o *Lu. (L.)*

*longipalpis*. A *L. (L.) mexicana*, assim como o par natural do vetor – a *L. (L.) infantum chagasi*, está presente nas Américas e pode sofrer pressões semelhantes, permitindo que *L. (L.) mexicana* ocupe o mesmo nicho parasitário. Por outro lado, o *Lu. (L.) longipalpis*, por não habitar os mesmos ambientes que a *L. (L.) major* não foi capaz de desenvolver mecanismos de defesa contra a infecção por essa espécie de *Leishmania*.

## 5. CONCLUSÕES

- I. O *Lutzomyia (L.) longipalpis* pode sustentar o desenvolvimento inicial de todas as espécies de *Leishmania* na alta dose parasitária ( $4 \times 10^7$ ) usada em nosso estudo;
- II. A menor dose utilizada ( $5 \times 10^6$ ) não permitiu altos índices parasitários no vetor *Lu. (L.) longipalpis*;
- III. A habilidade do *Lu. (L.) longipalpis* de se infectar, experimentalmente, por espécies de *Leishmania* foi dose dependente;
- IV. A presença de parasitos no intestino médio do *Lu. (L.) longipalpis* no 6º d.p.i, indicou a capacidade de sustentar uma infecção permanente;
- V. As espécies de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* infectaram o *Lu. (L.) longipalpis*, mas o vetor não foi capaz de transmitir essas duas espécies de *Leishmania* via picada para camundongos naïves;
- VI. O vetor foi capaz de transmitir *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* via picada para camundongos naïves;
- VII. Experimentalmente, foi demonstrado que o *Lu. (L.) longipalpis*, além de ser um vetor para *L. (L.) infantum chagasi*, é também um vetor competente para *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*.



## PARTE II

### RESUMO

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos pela pica da fêmea do flebotomíneo. No Novo Mundo, *Lutzomyia longipalpis* é o vetor mais importante da Leishmaniose Visceral e é o vetor comprovado para *Leishmania (L.) infantum chagasi* no Brasil. Durante toda a vida, o inseto é exposto a uma variedade diversificada de comunidades microbianas que contribuirá para formar a microbiota do intestino médio. A fêmea, durante o repasto sanguíneo, pode ingerir o parasito que é direcionado ao intestino médio do inseto, onde entra em contato com uma variedade de micro-organismos, como fungos e bactérias. A presença de bactérias no intestino médio dos flebotomíneos pode influenciar o desenvolvimento e sobrevivência do parasita. *In vitro*, a ação dessa microbiota sobre o parasito foi avaliada demonstrando a lise na parede celular de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *Leishmania (V.) braziliensis* causada por *Serratia marcescens*. A riqueza e a abundância bacteriana também podem ser moduladas pelo tipo de alimentação. Neste trabalho foi feita a identificação, por metagenômica, da microbiota de *Lu. longipalpis* capturados no campo em condições fisiológicas distintas (BF, UF, GR e BFI). O perfil metagenômico revelou 64 gêneros bacterianos e 46 famílias. Ao cruzar os táxons de cada condição experimental, um núcleo comum composto de 6 gêneros foi identificado (*Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* e *Chryseobacterium*). A natureza dinâmica observada da comunidade bacteriana expande os conhecimentos relativos às interações hospedeiro-microbiota-patógeno. Outros estudos abordando o modo como as comunidades coletadas em laboratório e em campo são necessários para desenvolver com sucesso estratégias de controle baseadas em simbiontes bacterianos e paratransgênese, como já foi testado em outros vetores artrópodes.

## ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania*, which are transmitted by the bite of phlebotomine sand flies. In the New World, *Lutzomyia longipalpis* is the most important vector of visceral leishmaniasis and is a proven vector for *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. Throughout the life, the insect is exposed to a diversity of microbial communities that contribute to form the microbiota of the midgut of the insect. The sandfly is able to ingest the parasite during the blood meal which is directed to the insect midgut where it interacts with a variety of microorganisms, such as fungi and bacteria. The presence of bacteria in the midgut of sand flies can influence the development and survival of the parasite. The microbiota activity over the parasite was evaluated *in vitro* demonstrating cell walls lysis of *Leishmania (L.) infantum chagasi* and *L. braziliensis* caused by *Serratia marcescens*. A richness and bacterial abundance can also be modulated by the type of feed. In this work, the bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*, under distinct physiological conditions, was identified by metagenomic. The bacteria-targeted metagenomic analysis revealed different community compositions between the distinct physiological stages of those tested (BF, UF, GR e BFI). The amplicon-oriented metagenomic profiling revealed 64 bacterial genera and 46 families. By crossing the taxa indices from each experimental condition a core composed of 6 genera was identified (*Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* and *Chryseobacterium*). The observed dynamic nature of the bacterial community expands the knowledge pertaining to the tripartite host-microbiota-pathogen interactions. Further studies addressing how laboratory and field collected communities differ are critical to successfully develop control strategies based on bacterial symbionts and paratransgenesis, as already tested in other arthropod vectors.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Microbiota dos flebotomíneos

Durante toda a vida, insetos são expostos a uma variedade diversificada de comunidades microbianas que contribuirá para formar a microbiota do intestino médio e, atualmente, é amplamente aceito que a microbiota intestinal é proveniente do ambiente ao redor, incluindo fontes de alimentação. Uma microbiota distinta pode ser encontrada em insetos em diferentes fases de vida como em larvas, recém-emergidos ou alimentados (revisado em Dillon & Dillon, 2004).

Estudos demonstram que a microbiota pode fornecer resistência contra inimigos naturais e parasitos (Oliver et al., 2003; Dillon et al., 2005), pode interferir em relações sociais (Dillon & Charney, 2002) e afetar a resposta imune do inseto hospedeiro (Hoffman & Reichhart 2002; Basset et al., 2003; Baton et al., 2009). Os micro-organismos do intestino tem a habilidade de se adaptarem rapidamente às mudanças na dieta do inseto, induzindo a ação enzimática e mudando a população da microbiota intestinal (revisado em Dillon & Dillon, 2004). Contudo, os insetos desenvolveram uma resposta imune inata, composta por componentes humorais e celulares, eficiente para combater a invasão de micro-organismos não simbiotes (Christophides et al., 2002; Osta et al., 2004; Hillyer & Christensen, 2005).

A maior parte dos estudos sobre microbiota associada aos insetos foi desenvolvida em mosquitos. No entanto, o número de estudos sobre a composição bacteriana de diversas espécies de flebotomíneos está crescendo a cada dia e vem contribuindo para o maior conhecimento dessa área na comunidade científica. Os dados gerados por esses estudos podem fornecer ferramentas importantes para a elaboração de estratégias de controle vetorial. Embora Schlein e colaboradores (1985) tenham demonstrado que o divertículo esofágico de *P. papatasi* apresenta atividade antibactericida e postulado que o intestino médio do inseto é livre de bactérias devido ao efeito destes inibidores presentes no divertículo, estudos recentes demonstram a presença de uma microbiota intestinal em flebotomíneos. Dillon e colaboradores (1996) mostraram

que o número de bactérias presentes no intestino médio de *P. (P.) papatasi* varia durante a vida da fêmea. Em 2002, Volf e colaboradores demonstraram que *P. (P.) duboscqi* apresentava bactérias imediatamente após a emergência do adulto, sugerindo, então, que essa microbiota deve ser proveniente da fase larvar. Hillesland e colaboradores (2008) isolaram e identificaram uma ampla diversidade de micro-organismos do intestino médio de *P. (P.) argentipes*. As espécies mais prevalentes encontradas nesse estudo foram: *Staphylococcus sp.*, *Bacillus megaterium* e *Brevibacterium linens*.

Estudos realizados em *Lu. (L.) longipalpis*, sob diferentes condições, mostraram que a composição bacteriana desse inseto inclui bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Yokenella*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Morganella* e *Weeksella* (Oliveira et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Gouveia et al., 2008; McCarthy et al., 2011; Sant'Anna et al., 2012; Fraihi et al., 2017).

Durante o desenvolvimento dentro do vetor, os parasitos podem interagir com essa variedade de micro-organismos, tais como fungos e bactérias. A presença de bactérias no intestino médio dos flebotomíneos pode influenciar o desenvolvimento do parasito competindo por nutrientes, pelo local de adesão no intestino e também alterando o pH intestinal do vetor. Estudos recentes vêm demonstrando que a microbiota do intestino médio dos flebotomíneos tem efeito sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de *Leishmania*. Experimentos *in vitro* mostraram que bactérias da espécie *Serratia marcescens* podem causar a lise da parede celular de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis* (Moraes et al., 2008; Moraes et al., 2009). Quando *Lu. (L.) longipalpis* foi pré-alimentado com *Pseudozyma*, *Asaia* ou *Ochrobactrum*, observou-se uma taxa de sobrevivência reduzida dos parasitos (Sant'Anna et al., 2014). Em 2016, Monteiro e colaboradores revelaram que a riqueza e a abundância bacteriana de *Lu. (L.) intermedia* são moduladas pelo estado fisiológico do inseto. Um resultado semelhante foi observado em *Lu. (L.) longipalpis* silvestre (Pires et al., 2017). A microbiota intestinal do *Lu. (L.) longipalpis* recentemente demonstrou ser essencial para a sobrevivência do parasito. Foi observado que a diminuição da microbiota do intestino médio, mediada por antibióticos,

prejudica a sobrevivência de *L. (L.) infantum* dentro do vetor, inibe o crescimento do parasito e, também, a diferenciação do parasito na forma metacíclica (Kelly et al., 2017).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Explorar a dinâmica da composição bacteriana do *Lu. (L.) longipalpis* silvestres em condições fisiológicas distintas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1. Descrever a composição bacteriana do *Lu. (L.) longipalpis* sob condições fisiológicas distintas;

2.2.2. Compreender o papel da microbiota intestinal durante a infecção;

2.2.3. Avaliar o distúrbio ecológico causado por *Leishmania* na microbiota do flebotomíneo adulto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de parasitos

*Leishmania (L.) infantum chagasi* (HMOM/BR/70/BH46) foi cultivada em Meio M199 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), penicilina (100U/mL), estreptomicina (50 µg/mL), glutamina (12,5 mM), Hêpes (40 mM), adenina (0,1 mM) e 2,5 µg/mL hemina (Sigma). Os parasitos foram cultivados em estufa BOD modelo347CD (FANEM, São Paulo-Brasil) a 26 °C no Laboratório.

#### 3.2 Coleta e manutenção dos flebotomíneos

*Lutzomyia longipalpis* silvestres foram coletados na Gruta da Lapinha, uma área não endêmica pra Leishmanioses, localizada nas imediações da cidade de Lagoa Santa, a 60 km de Belo Horizonte (longitude 43°57'W; latitude 19°03'S), estado de Minas Gerais, Brasil. As fêmeas não alimentadas foram separadas sob estereomicroscópio e mantidas com solução de sacarose 30% *ad libitum* no insetário (25°C e 75% de humidade) do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou por 3-4 dias antes dos experimentos de alimentação.

#### 3.3 Alimentação e Infecção Experimental

Fêmeas de *Lu. (L.) longipalpis* foram divididas em 3 grupos de 100 insetos cada e alimentadas por: (i) sacarose (“Blood Unfed” = UF); (ii) sangue não infectado (“Blood Fed” = BF); ou (iii) sangue infectado (BFI = “Blood Fed Infected”). Os insetos do grupo UF foram alimentados apenas em solução de sacarose 30% *ad libitum* e separados para extração do DNA (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A infecção experimental dos insetos foi realizada por meio de um sistema de alimentação artificial que simula a temperatura de um hospedeiro vertebrado, no qual pequenos recipientes de vidro, semelhantes a funis invertidos com capacidade de 300-500 µl, foram conectados através de mangueiras finas (do tipo usado em aquário). Cada

recipiente de vidro (alimentador) foi revestido, na parte inferior, com pele recém dissecada de *Gallus gallus domesticus* jovem e preenchido com sangue de camundongo (*Mus musculus*) Balb/c heparinizado. A alimentação sanguínea foi oferecida aos grupos BF e BFI, sendo acrescido ao sangue oferecido ao grupo BFI  $4 \times 10^6$  promastigotas/ml de *L. (L.) infantum chagasi*. As fêmeas engorgitadas foram separadas e mantidas alimentadas em solução de sacarose 30% *ad libitum* no infectório a 25 °C e 75% de umidade.

Três e sete dias após a infecção (3 d.p.i. e 7 d.p.i.), 10 insetos do grupo BFI foram anestesiados com CO<sub>2</sub> e mortos em solução de 5% detergente e, em seguida, lavados com PBS. Os intestinos foram dissecados, transferidos para tubos Eppendorfs contendo 30 µl de PBS e maceradas brevemente. Uma amostra de 10 µl desse macerado foi contada sob um hemocitômetro, para confirmar a presença de parasitos no intestino médio dos insetos. No 3º d.p.i., 30 insetos dos grupos UF, BF e BFI foram esterilizados com água destilada estéril, hipoclorito a 1% (1 min submerso), PBS estéril (3 lavagens) e dissecados sob um estereoscópio em uma cabine de biossegurança. O pool de cada grupo experimental foi armazenado a -20 °C para extração de DNA. No 7º d.p.i., 30 fêmeas do grupo BF foram separadas como descrito acima e renomeadas como grávidas (GR). Neste grupo, a condição fisiológica dos insetos foi confirmada através da observação dos ovários em desenvolvimento.

### **3.4 Extração de DNA**

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) seguindo o manual do fabricante.

### **3.5 Perfil bacteriano**

As amostras de DNA foram cuidadosamente embaladas em gelo seco e enviadas para Macrogen, Coréia do Sul. Estas amostras foram sequenciadas usando a plataforma Illumina MiSeq Next-Generation Sequencing (NGS) visando o gene 16S rRNA (300

pares de bases que cobrem a região hipervariável V3-V4) de acordo com as condutas internas de Macrogen, considerando: QC, Operational Taxonomic Unit (OTU) agrupada em um limite de similaridade de 97% (CD-HIT-OTU), riqueza da comunidade microbiana (Mothur v.1.33.0) e atribuição taxonômica (Silva rRNA Database e software classificador interno com 80% de valor de confiança mínimo). Para avaliar se a homogeneidade da comunidade (medida de diversidade alfa) foi modulada pela alimentação de sangue e presença de patógenos, utilizamos o Índice de Shannon (Shannon, 1948) para cada amostra.

### **3.6 Dendrograma filogenético**

A relação filogenética entre OTUs a nível de gênero (g-OTUs), descritos nos quatro grupos testados, foi explorada por meios ilustrativos usando o navegador de taxonomia NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>). A árvore do formato Philip foi visualizada e editada usando a ferramenta baseada na Web Interactive Tree of Life (iTOL).

### **3.7 Análise multivariada da ecologia microbiana**

As análises comparativas da diversidade da comunidade foram realizadas utilizando a matriz de dados de abundância bacteriana para avaliar um padrão biológico potencial ou perfis de assinaturas discriminando, comparativamente, os grupos de flebotomíneos analisados. As comparações da comunidade ecológica, com base na diversidade  $\beta$  foram realizadas em uma matriz que abrange os dados de abundância relativa de OTU bacteriana pertencentes às quatro condições testadas que foram explicadas anteriormente. Para realizar análises mais robustas, reduzindo o número de zeros na matriz de dados, optamos por trabalhar ao nível de família taxonômica, uma abordagem mais conservadora. A variação na estrutura da comunidade foi explorada por análises multivariadas com base nas distâncias entre os quatro grupos testados. Uma transformação estabilizadora de variância foi aplicada à matriz de abundância relativa para reduzir a dispersão expressando os valores como  $\arcsin\sqrt{x}$  (ver Ramette, 2007;

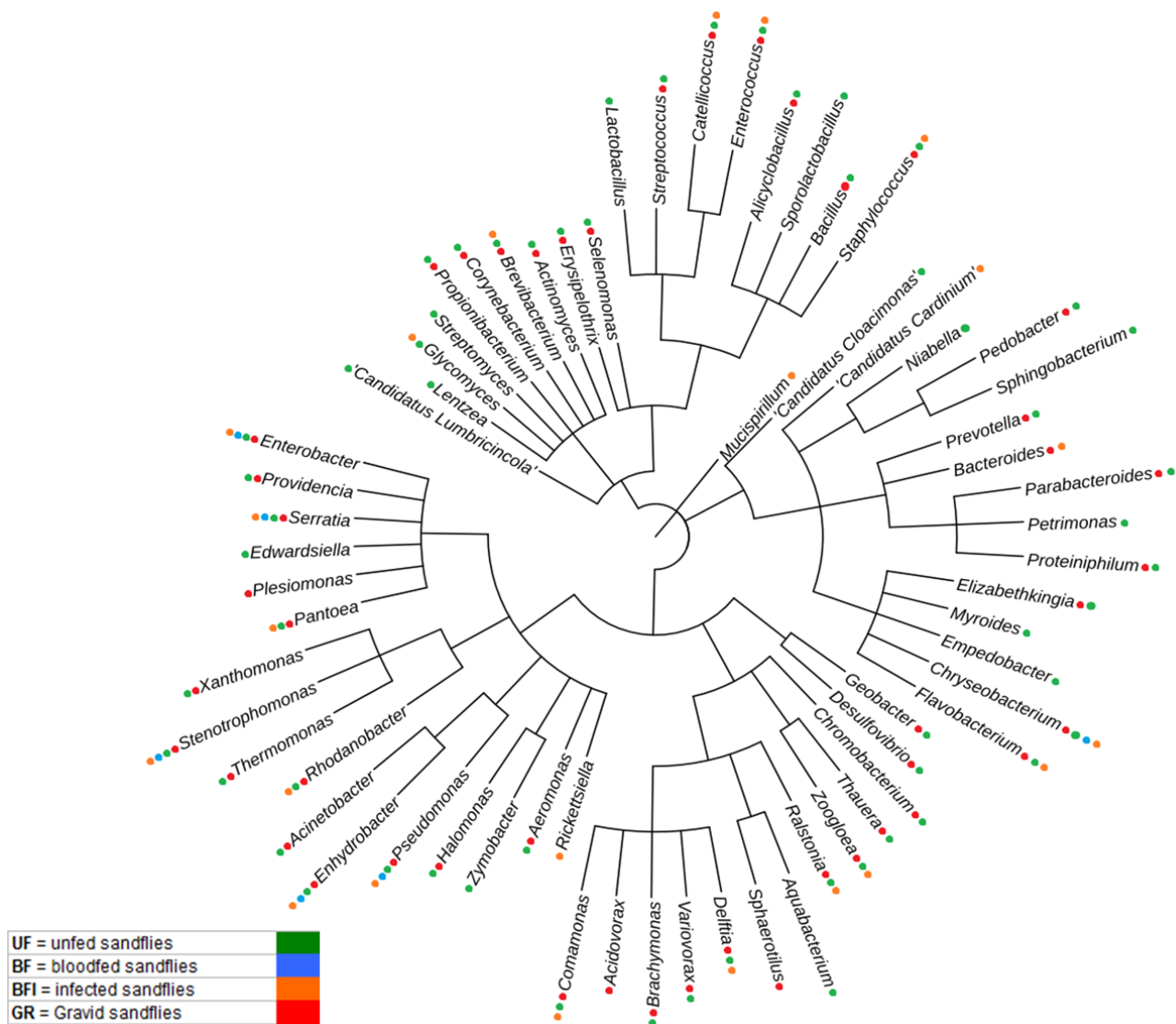


Mason et al., 2013). Um agrupamento hierárquico e avaliações de escala multidimensional não métricas (NMDS) do índice de similaridade Bray-Curtis (B-C) foram gerados usando o R-studio v.0.98.507. Para interpretar ainda mais os padrões biológicos e o agrupamento dos grupos experimentais, buscamos a correspondência f-OTU (com base na sua abundância relativa) com as condições biológicas que cada grupo representa. Uma análise de correspondência canônica (CCA) foi realizada usando uma matriz explicativa restritiva adicional, com variáveis binárias e referindo-se às seguintes condições biológicas: sangue presente no intestino médio, infecção por *Leishmania* e exposição prévia a sangue (para considerar o caso dos insetos do grupo GR). Ao restringir a análise, não só testamos a correspondência (ou a preferência ecológica) entre f-OTUs e os grupos baseando-se na fonte de alimentos, mas também exploramos como as variáveis explicativas que propusemos poderiam influenciar a variância dentro da matriz de abundância e a localização dos objetos no espaço de ordenação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Composição da comunidade bacteriana associada ao *Lu. (L.) longipalpis* silvestres

A análise metagenômica revelou diferentes composições comunitárias entre os diferentes estados fisiológicos testados. O sequenciamento revelou um total de 1.178.018 “reads” de alta qualidade, que foram agrupadas da seguinte forma: UF = 93.244; GR = 284.017; BF = 388.670 e BFI = 412.087. O perfil metagenômico revelou a presença de cinco filos (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Spirochaetes), 64 gêneros e 46 famílias. Ao considerar as g-OTUs previstas para cada uma das condições experimentais, o grupo UF albergou o maior número de OTUs com 57 gêneros, sendo 14 exclusivos (*Zymobacter*, *Aquabacterium*, *Empedobacter*, *Myroide*, *Petrimonas*, *Sphingobacterium*, *Niabella*, “*Candidatus Cloacimonas*”, *Sporolactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Lentzea*, “*Candidatus Lumbricincola*” e *Edwardsiella*); seguido pelo grupo GR = 46 gêneros, sendo 3 exclusivos (*Acidovorax*, *Plesiomonas* e *Sphaerotilus*), BFI = 22 gêneros, sendo 3 exclusivos (*Rickettsiella*, *Mucispirillum* and “*Candidatus Cardinium*”) e, finalmente, o grupo BF com 6 gêneros e nenhum exclusivo. Cruzando os táxons de cada condição experimental, foi observado um “core” (parte central/parte comum) composto de 6 gêneros (*Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* e *Chryseobacterium*) (Figura 1). Em termos de homogeneidade da comunidade entre os táxons bacterianos, cada um dos grupos apresentou os seguintes índices de Shannon: UF = 1.42; GR = 1.12; BF = 0.70 e BFI = 0.48.



**Figura 1: Dendrograma filogenético dos gêneros bacterianos identificados em cada uma das condições experimentais do *Lu. (L.) longipalpis* silvestre. As g-OTUs identificadas são mostradas seguidas de uma chave de cor que representa as condições fisiológicas das fêmeas de flebotomíneos: UF (verde); BF (azul); BFI (laranja) e GR (vermelho).**

## 4.2 Riqueza e abundância da comunidade bacteriana

A riqueza e a abundância das bactérias (f-OTU) associadas a *Lu. (L.) longipalpis* silvestres variaram entre os grupos estudados. Nos grupos UF e GR, a família *Pseudomonadaceae* foi a mais prevalente e representou 76.031 e 204.688 “reads” (81,60 e 72,23%), respectivamente. *Enterobacteriaceae* foi a família mais abundante nos grupos BF e BFI, representando 236.442 e 393.927 reads em cada grupo (60,83 e 95,60%), respectivamente.

Após a alimentação sanguínea, a abundância das bactérias aumentou quando os grupos UF e GR foram comparados. Isso foi concomitante com a perda de riqueza de f-OTUs. A presença de sangue no intestino médio modulou negativamente a abundância de *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* e *Flavobacteriaceae* no grupo BF, e *Enterobacteriaceae* e *Xanthomonadaceae* foram os táxons dominantes. No grupo BFI, a abundância de *Enterobacteriaceae* aumentou quando comparado com os demais grupos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Perfil taxonômico e abundância relativa de f-OTUs associadas a *Lu. (L.) longipalpis* sob diferentes condições fisiológicas.

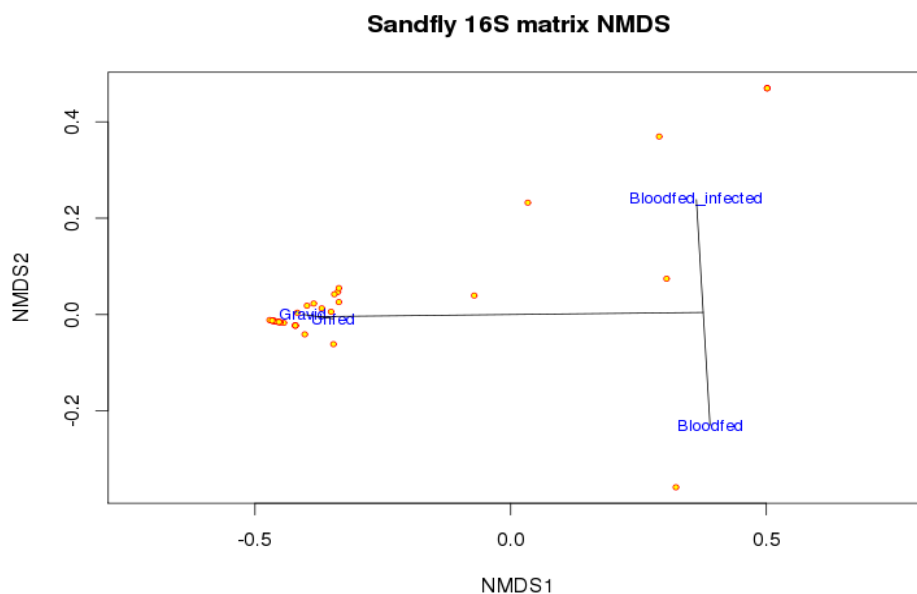
Famílias	UF	GR	BF	BFI
<i>Streptococcaceae</i>	0,02	0,02	0,00	0,00
<i>Bacillaceae</i>	0,06	0,11	0,00	0,00
<i>Deferribacteraceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,07
<i>Thermotogaceae</i>	0,03	0,01	0,00	0,00
<i>Actinomycetaceae</i>	0,02	0,02	0,00	0,00
<i>Planococcaceae</i>	0,06	0,02	0,00	0,00
<i>Neisseriaceae</i>	0,93	1,59	0,00	0,01
<i>Veillonellaceae</i>	0,03	0,04	0,00	0,00
<i>Pseudomonadaceae</i>	81,60	72,23	0,09	0,01
<i>Burkholderiaceae</i>	0,06	0,06	0,00	0,00
<i>Aeromonadaceae</i>	1,24	2,83	0,00	0,00
<i>Staphylococcaceae</i>	0,44	0,15	0,00	0,03

<i>Corynebacteriaceae</i>	0,38	0,27	0,00	0,00
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,07	0,04	0,00	0,00
<i>Sinobacteraceae</i>	0,11	0,06	0,00	0,00
<i>Lactobacillaceae</i>	0,00	0,06	0,00	0,00
<i>Mycoplasmataceae</i>	0,00	0,05	0,00	0,00
<i>Spirochaetaceae</i>	0,02	0,03	0,00	0,00
<i>Geobacteraceae</i>	0,07	0,03	0,00	0,00
<i>Halomonadaceae</i>	1,63	1,04	0,00	0,00
<i>Rikenellaceae</i>	0,21	0,29	0,00	0,00
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,05	0,06	0,00	0,00
<i>Alicyclobacillaceae</i>	0,52	0,16	0,00	0,00
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,06	0,17	0,00	0,00
<i>Brevibacteriaceae</i>	0,14	0,18	0,00	0,01
<i>Rhodocyclaceae</i>	0,43	0,35	0,00	0,01
<i>Flammeovirgaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,62
<i>Coxiellaceae</i>	0,00	0,00	0,00	0,10
<i>Moraxellaceae</i>	1,14	0,35	0,00	0,04
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,07	0,09	0,00	0,00
<i>Glycomycetaceae</i>	0,00	0,02	0,00	0,00
<i>Prevotellaceae</i>	0,04	0,02	0,00	0,00
<i>Xanthomonadaceae</i>	0,86	0,85	39,06	0,01
<i>Streptomycetaceae</i>	0,00	0,02	0,00	0,00
<i>Actinosynnemataceae</i>	0,00	0,02	0,00	0,00
<i>Bacteroidaceae</i>	0,08	0,00	0,00	1,17
<i>Comamonadaceae</i>	2,18	1,70	0,00	0,05
<i>Enterococcaceae</i>	0,37	0,68	0,00	2,23
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,74	14,14	60,83	95,59
<i>Flavobacteriaceae</i>	1,26	2,04	0,01	0,04
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0,08	0,16	0,00	0,00
<i>Sporolactobacillaceae</i>	0,00	0,01	0,00	0,00

---

### 4.3 Análises multivariadas que exploram os perfis bacterianos subjacentes

Inicialmente, métodos sem restrições foram aplicados para explorar como os perfis de abundância bacteriana (na classificação taxonômica familiar) pode atuar como uma "assinatura" capaz de discriminar entre os grupos experimentais em condições fisiológicas distintas e com base na influência do ecossistema interno em que se desenvolvem. Tanto o agrupamento hierárquico como o NMDS revelaram dois padrões biologicamente relevantes com base em uma matriz de distância B-C (Figura 2). Em primeiro lugar, uma clara semelhança entre a abundância bacteriana dos grupos GR e UF separou-os dos dois grupos alimentados por sangue (os grupos BF e BFI). Em segundo lugar, a presença da *Leishmania* pode modular a composição da comunidade bacteriana (diversidade e abundância) uma vez que o grupo BFI se separou de seu grupo homólogo BF.



**Figura 2: NMDS - Análise multivariada sem restrições de padrões biológicos.** A abundância bacteriana, ao nível de família (f-OTUs), pode ser discriminada entre os quatro grupos experimentais. Conforme observado em todas as dimensões do NMDS (1 e 2), os insetos dos grupos GR e UF apresentam perfis de abundância bacteriana semelhantes, ao passo que a alimentação sanguínea parece gerar duas assinaturas distintas

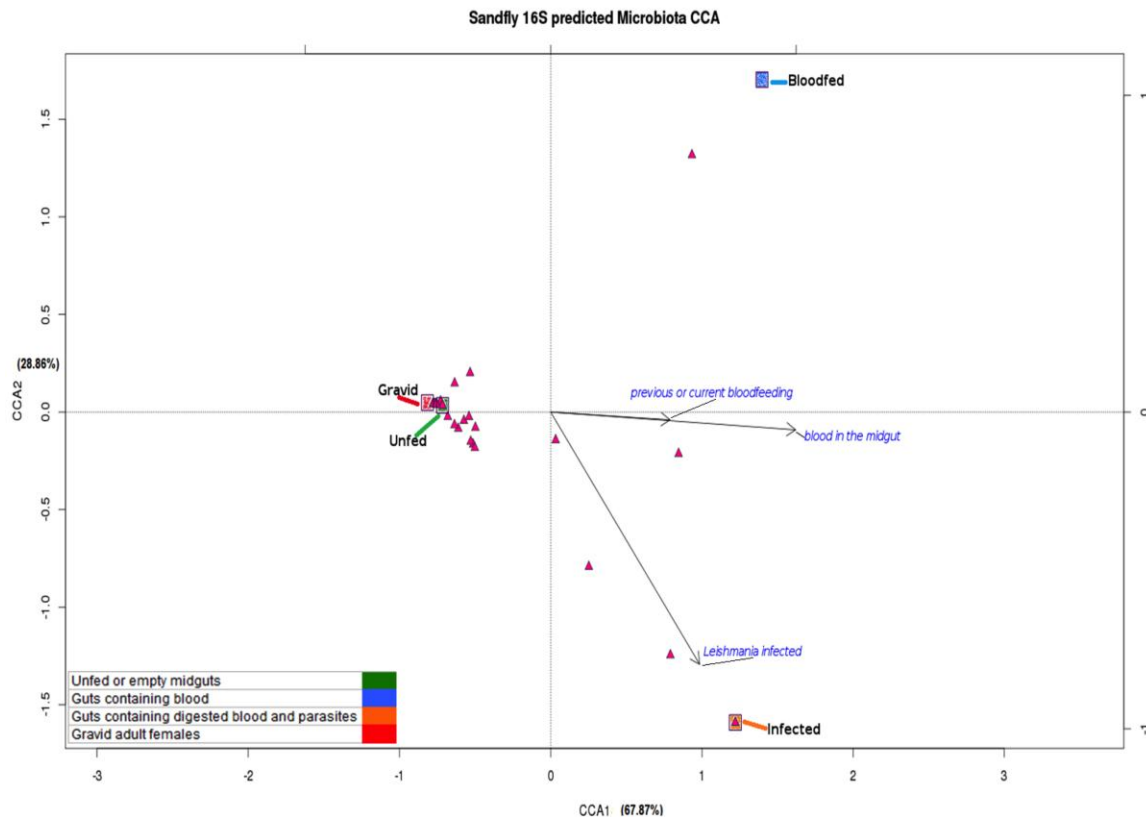
que explicam o agrupamento espacial e os padrões de ramificação em ambas as dimensões

Com base nos métodos exploratórios sem restrições, um CCA (escala 2: foco em variáveis de resposta) foi realizado seguindo as recomendações encontradas na literatura de ecologia microbiológica. A análise CCA permitiu a estimativa da proporção de variância explicada por cada eixo (CCA1 = 67,87% e CCA2 = 28,86%, Figura 3). Assim, abrangidos nestes dois eixos, foi encontrado 96,73% da variância total dentro da matriz de dissimilaridade. Ao longo do eixo CCA1, os grupos UF e GR se colocam e se separam de ambos os grupos alimentados por sangue (grupos BF e BFI). Ao longo do CCA2, observamos como a presença do patógeno modula o perfil bacteriano, direcionando o grupo BFI para o quadrante inferior direito do espaço das ordenadas. Ao restringir a análise, também foi possível avaliar o impacto das variáveis explicativas. Os vetores azuis, mostrados no quadrante inferior direito, indicam claramente a influência da alimentação sanguínea e da infecção pela *Leishmania* como forças motrizes que agruparam os grupos experimentais (o comprimento do vetor é indicativo do seu efeito sobre a distribuição espacial dos elementos).

Uma outra informação obtida deste método foi a preferência ecológica em relação a cada um dos estados nutricionais/fisiológicos que cada f-OTU mostrou e sua resposta aos vetores explicativos. Isso é avaliado por: sua localização dentro do espaço de ordenação e sua proximidade com cada um de seus "nichos ecológicos" ou do grupo de flebotomíneo e uma projeção em ângulo reto nas setas do vetor. A correspondência ecológica foi a seguinte: grupo BF = Xantomonadaceae; Grupo BFI = *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Coxiellaceae*, *Flameovirgaceae*, *Deferribacteraceae*, *Glycomycetaceae*; e "colocalizados" os grupos UF e GR = *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Thermotogaceae*, *Actinomycetaceae*, *Planococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Aeromonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Sinobacteraceae*, *Lactobacillaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Spirochaetaceae*, *Geobacteraceae*, *Halomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Chromatiaceae*,

*Rhodocyclaceae, Moraxellaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Xanthomonadaceae, Streptomycetaceae, Actinosynnemataceae, Comamonadaceae, Cytophagaceae, Flavobacteriaceae, Sphingobacteriaceae e Sporolactobacillaceae.*





**Figura 3: Análise multivariada restrita dos perfis de abundância bacteriana de *Lu. (L.) longipalpis* baseada na fonte alimentar.** Os eixos CCA1 e CCA2 explicam aproximadamente 97% da abundância bacteriana dentro da matriz. Os grupos UF e GR se localizam no quadrante superior esquerdo e estão separados, ao longo do CCA1, dos dois grupos alimentados com sangue (grupos BF e BFI). A presença do parasito afasta, ao longo do CCA2, o grupo BFI do seu contra-grupo BF. O comprimento dos vetores em azul corresponde à importância que cada uma das variáveis explicativas (restritivas) teve sobre o padrão de agrupamento. A preferência de cada um dos f-OTUs (vermelho) por um "nicho ecológico" pode ser atribuída à sua proximidade com cada um dos grupos experimentais.

## 5. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos que avaliam a microbiota dos flebotomíneos utilizaram técnicas microbiológicas clássicas, como a cultura bacteriana e o isolamento, que são limitados na sua capacidade de analisar amplamente a microbiota do inseto, uma vez que muitas bactérias não são cultiváveis (Zhou et al., 2015). Nosso estudo analisou a composição da microbiota de *Lu. (L.) longipalpis*, capturados na Gruta da Lapinha, através da metagenômica (alvo 16S rRNA), uma técnica que permite a detecção de um grande número de táxons bacterianos sem a necessidade do cultivo e isolamento.

O perfil meta-taxonômico revelou 64 OTUs bacterianas no nível de gênero associados aos grupos experimentais de *Lu. (L.) longipalpis*. A maioria desses gêneros inclui bactérias comumente associadas ao solo, à água e às plantas, as quais podem ser adquiridas durante os hábitos alimentares dos flebotomíneos, ou seja, o solo durante o estágio larval e a seiva das plantas durante a fase adulta (Hassan et al., 2014; Volf et al., 2002; Maleki-Ravasan et al. 2015; Peterkova-Koci et al., 2012). Em termos de números de g-OTUs, o grupo com maior diversidade foi o grupo UF (57 gêneros), seguido de GR (46 gêneros), BFI (22 gêneros) e BF (6 gêneros). Ao abordar a riqueza da comunidade em termos de uniformidade, as medidas dos índices de Shannon revelaram que as OTUs bacterianas são mais diversas e igualmente distribuídas nos flebotomíneos grávidas e alimentadas com açúcar, mas são distribuídas de forma menos homogênea nos grupos expostos ao sangue e/ou ao patógeno.

Nosso estudo de composição da comunidade pode ser contrastado com um estudo recente que também visou o perfil bacteriano da microbiota de flebotomíneo em diferentes condições fisiológicas (Monteiro et al., 2016; Kelly et al. 2017). O estudo metagenômico de Kelly e colaboradores (2017) também analisou a microbiota de *Lu. (L.) longipalpis*, levando em consideração o efeito da modulação da infecção por patógenos. Em seu estudo, *Acetobacteraceae* e *Enterobacteriaceae* foram as famílias mais abundantes nos grupos infectados e alimentados com sangue, e *Methylobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Shingomonadaceae*, *Alcaligenaceae* e *Brucellaceae* associadas aos seus grupos de testes. Também detectamos a predominância de *Enterobacteriaceae* nas mesmas condições, mas não detectamos *Acetobacteraceae*. A família *Xanthomonadaceae*

foi o f-OTU co-dominante no grupo alimentado por sangue. Estas divergências na diversidade para as mesmas espécies hospedeiras são plausíveis, uma vez que *Lu. (L.) longipalpis* silvestre e de colônia abrigam diferentes gêneros bacterianos, em termos de abundância e riqueza. Esse fenômeno já foi observado em outros insetos, como *Anopheles* (Boissière et al., 2012). Em um estudo recente, Fraihi e colaboradores (2017) demonstraram que a composição da microbiota mostra a diminuição da diversidade ao nível de espécie durante o curso do período de transmissão. Realizamos infecções experimentais com flebotomíneos de uma área não endêmica e, portanto, não analisamos o período de transmissão. No entanto, nosso grupo BFI também mostrou uma diminuição na composição da microbiota quando comparado com os grupos UF e GR. Juntos, esses dados sugerem que a invasão bem-sucedida e a transmissão desses parasitos são refletidas pelo distúrbio ecológico da comunidade bacteriana nativa no vetor. Esse fato já foi observado antes, no qual infecção por *Leishmania* causa exclusão competitiva, impactando na população bacteriana de *Lu. L. longipalpis* de mesma forma que a colonização do intestino do inseto vetor por bactéria impacta na colonização de *Leishmania* (Sant'Anna et al, 2014).

Um conjunto de OTUs bacterianos (principalmente nos níveis taxonômicos de gênero e família) permanece presente no ecossistema interno do inseto, em diferentes estágios de vida, diferentes condições fisiológicas e em diferentes partes do corpo. Os efeitos da biologia interna do vetor, tais como nutrição, resposta imune e idade, seriam então, responsáveis pela modulação desse grupo central de táxons, em termos de abundância relativa (Wang et al., 2011; Gimonneau et al., 2014; David et al., 2016; Segata et al., 2016). A sua importância dependeria do seu papel como fornecedor de nutrientes, funções genéticas nas principais redes metabólicas hospedeiro-simbionte (Engel et al., 2013; Gendrin et al., 2013; Minard et al., 2013; Coon et al., 2014) ou no seu envolvimento na homeostase redox relacionada aos insetos hematófagos (Champion et al., 2017).

Entre os táxons principais identificados, os gêneros *Enterobacter* e *Serratia* (família *Enterobacteriaceae*) foram descritos anteriormente em flebotomíneos do Velho e Novo Mundo, incluindo o *Lu. (L.) longipalpis* da Gruta de Lapinha (Dillon et al., 1996; Volf et al., 2002; Oliveira et al., 2000; de Oliveira et al., 2001; Gouveia et al., 2008;

Hillesland et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2012; Peterkova-Koci et al., 2012; Akhouni et al., 2012; Fraihi et al., 2017; Monteiro et al., 2016; Kelly et al., 2017). Este f-OTU é comumente reportado como um componente abundante na comunidade bacteriana em artrópodes hematófagos e prospera particularmente no intestino médio de anofelinos alimentados com sangue e infectados com *Plasmodium* (Wang et al., 2011; Boissière et al., 2012) e em outras fêmeas adultas de Culicídeos (Novakova et al., 2017). Curiosamente, em *Aedes aegypti*, os táxons desta família crescem significativamente mais em mosquitos alimentados com açúcar do que nos mosquitos alimentados com sangue (David et al., 2016), nos quais *Comamonadaceae* (Coon et al., 2014) e *Pseudomonadaceae* (David et al., 2016), são as famílias que proliferam predominantemente quando expostas ao sangue. Em nosso estudo, *Enterobacteriaceae* foi o mais abundante nos grupos BF e BFI.

Ao nível de gênero, *Stenotrophomonas* foi o mais prevalente no grupo BF. Este g-OTU foi anteriormente descrito em fêmeas do *Lu. (L.) longipalpis* silvestre (Oliveira et al., 2000; Gouveia et al., 2008; Fraihi et al., 2017) e alimentadas com sangue (Oliveira et al., 2000; Kelly et al., 2017), bem como em *P. duboscqi* (Volf et al., 2002). Conforme observado em *Anopheles gambiae* (Wang et al., 2011) um aumento da biomassa bacteriana (em termos de número de reads) em indivíduos alimentados com sangue foi devido à maior abundância de *Enterobacteriaceae*, que ocorre junto com uma redução nos números OTU. Esta desigualdade ecológica se reflete de forma concordante nos índices de Shannon estimados para os grupos de flebotomíneos expostos à alimentação sanguínea e é acentuado quando a alimentação infecciosa ocorreu.

O gênero *Pseudomonas* foi o mais prevalente nos grupos UF e GR, representando 76.031 e 204.688 reads respectivamente. Este g-OTU foi previamente identificado em *Lu. (L.) longipalpis* (Oliveira et al., 2000; de Oliveira et al., 2001; Chakravorty et al., 2007; Peterkova-Koci et al., 2012; Monteiro et al., 2016; Kelly et al., 2017), *P. argentipes*, *P. duboscqi*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi* e *P. sergenti* (Dillon et al., 1996; Volf et al., 2002; Gouveia et al., 2008; Hillesland et al., 2008; Maleki-Ravasan et al., 2015). Este é o primeiro relato de *Enhydrobacter* e *Chryseobacterium* em flebotomíneos, gêneros pertencentes às famílias *Moraxellaceae* e *Flavobacteriaceae*, respectivamente,

cuja presença em flebotomíneos foi relatada recentemente (Kelly et al, 2017). Ambos os gêneros foram mais abundantes nos grupos UF e GR do que nos grupos BF e BFI.

Ao explorar a beta diversidade, tanto pelo método de classificação (NMDS) como pelo método de restrição (CCA), observamos que a composição da comunidade dentro do flebotomíneo é modulada pelo tipo de alimentação, a presença ou ausência do parasito e à vitelogenese. A análise CCA revelou uma semelhança entre os perfis de abundância bacteriana dos grupos UF e GR. Ambos localizam-se ao longo do primeiro eixo (Fig. 2) que os separou dos dois grupos com presença de sangue no intestino médio presentes no sangue (BF e BFI). O efeito biológico da nutrição e a infecção do sangue, representado pelos vetores restritivos, conduzem claramente esses dois grupos de flebotomíneos para se localizar separadamente ao longo do eixo CCA2. A modulação dos perfis bacterianos por infecção de um patógeno protozoário, que é refletida pelo espaço de ordenação confinada, já havia sido relatada para o modelo de *An. gambiae-Plasmodium falciparum* usando o método RDA (Wang et al., 2011). Avanços recentes na área da ecologia microbiana indicaram a necessidade de estudar microbiomas sob a luz da ecologia comunitária.

O perfil bacteriano de f-OTU das fêmeas grávidas se assemelhou o grupo UF de acordo com sua co-localização no gráfico CCA. Essa assinatura baseada na diversidade implicaria que a montagem microbiana dentro do inseto mostra "resiliência da composição" quando se aborda o comportamento alimentar da perspectiva dos inquilinos de ecologia perturbadora (Christian et al., 2015). Nesse caso, a comunidade bacteriana reconquistaria o perfil de assinatura nutricional de carboidratos (UF) após o distúrbio de alimentação de sangue. A análise CCA, um método baseado na teoria do nicho ecológico (Ramette et al., 2007; Paliy et al., 2016), permitiu compreender a preferência que f-OTU exibe e prospera em condições biológicas particulares. Assim, sua resposta a efetores bióticos e abióticos revela perfis de assinatura que podem ajudar a elucidar as interações metabólicas entre o hospedeiro e a microbiota à medida que os abordamos como uma "unidade macrobiana", como foi sugerido de forma interessante ao estudar holobiont phylosymbiosis (Brooks et al., 2016).

## 6. CONCLUSÕES

- I. A riqueza e a abundância bacteriana do *Lu. (L.) longipalpis* silvestre são moduladas pelo tipo de alimentação e, também, pela presença ou ausência de *Leishmania* no intestino do vetor;
- II. O grupo UF apresentou a maior diversidade bacteriana, enquanto o grupo BF apresentou a menor diversidade;
- III. Uma clara divisão entre os grupos UF e GR (sem sangue presente no intestino) dos grupos BF e BFI (com sangue presente no intestino) foi observada;
- IV. A natureza dinâmica observada da comunidade bacteriana expande o conhecimento relativo às interações do hospedeiro-microbiota-patógeno.

## 7. ANEXOS

### 7.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### 7.1.1 Artigo 1

Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis.

**Autores:** Ana Clara Araújo Machado Pires, Luís Eduardo Martinez Villegas, Thaís Bonifácio Campolina, Alessandra Silva Orfanó, Paulo Filemon Paolucci Pimenta and Nágila Francinete Costa Secundino

## RESEARCH

## Open Access



# Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis

Ana Clara Araújo Machado Pires<sup>1,2</sup>, Luís Eduardo Martínez Villegas<sup>1</sup>, Thaís Bonifácio Campolina<sup>1</sup>, Alessandra Silva Orfanó<sup>1</sup>, Paulo Filemon Paolucci Pimenta<sup>1,2†</sup> and Nágila Francinete Costa Secundino<sup>1,2\*†</sup>

## Abstract

**Background:** The leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania*, which are transmitted by the bite of phlebotomine sand flies. In the New World, *Lutzomyia longipalpis* is the most important vector of visceral leishmaniasis and is a proven vector for *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. During development within the vector, *Leishmania* can interact with a variety of microorganisms such as fungi and bacteria. The presence of bacteria in the midgut of sand flies can influence the development and survival of the parasite.

**Results:** The bacteria-targeted metagenomic analysis revealed different community compositions between the distinct physiological stages of those tested. The amplicon-oriented metagenomic profiling revealed 64 bacterial genera and 46 families. By crossing the taxa indices from each experimental condition a core composed of 6 genera was identified (*Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* and *Chryseobacterium*).

**Conclusions:** The observed dynamic nature of the bacterial community expands the knowledge pertaining to the tripartite host-microbiota-pathogen interactions. Further studies addressing how laboratory and field collected communities differ are critical to successfully develop control strategies based on bacterial symbionts and paratransgenesis, as already tested in other arthropod vectors.

**Keywords:** Wild-caught, *Lutzomyia longipalpis*, Metagenomic analysis, Microbiota, *Leishmania*

## Background

Leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* Ross, 1903 [1], which are transmitted by the bite of phlebotomine sand flies. The diseases present different clinical manifestations, such as visceral leishmaniasis (VL) [2]. The World Health Organization estimates that 90% of global VL cases occurred in 6 countries: Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan and Sudan. In the New World, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva,

1912) is the most important vector of VL and is a proven vector for *Leishmania infantum chagasi* in Brazil [3].

The female sand fly can acquire *Leishmania* spp. parasites during blood feeding on an infected vertebrate. The *Leishmania* life-cycle within the insect vector is extracellular with parasite development restricted to the gut lumen [4, 5]. During development within the vector, the parasites can interact with a variety of microorganisms such as fungi and bacteria. The presence of bacteria in the midgut of sand flies can influence the development of the parasite by competing for nutrients and adhesion site in the gut of the vector, and by reducing the intestinal pH [6]. Studies have shown that microbiota from the sand fly's midgut have an effect on *Leishmania*

\* Correspondence: nagila@cpqrr.fiocruz.br

†Equal contributors

<sup>1</sup>Laboratório de Entomologia Médica, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Av. Pres. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



development and survival. Additionally, in vitro experiments have shown that *Serratia*, *Bacillus* and *Haemophilus parainfluenzae* induced lysis of promastigote forms [7–9].

The gut microbiome of the *Lu. longipalpis* colony was recently shown to be essential for survival of the parasite [10]. An antibiotic-mediated decrease in midgut microbiota impaired *L. infantum* survival in the sand fly, inhibited parasite growth, and differentiation to the infectious metacyclic form was observed [10]. Furthermore, when *Lu. longipalpis* was pre-fed with *Pseudozyma*, *Asaia* or *Ochrobactrum*, a reduced parasite survival rate was observed [11].

Microbiota can be modulated by blood meal. The number of bacteria within the midgut of *P. dubosqi* increases two days after a blood meal and decreases after blood meal digestion [12]. In addition to blood, which is required only by females for egg development, adult sand flies are also plant feeders [13]. The different food sources available during each sand fly life stage can influence the midgut microbiota. The insect is exposed to a diverse range of microbial communities during its lifespan that will contribute to form the midgut microbiota. The larval stages feed on animal feces and plant material and ingest microorganisms from the soil environment. Many of these microorganisms can be found in the gut of the adult immediately post emersion [12]. Adult sand flies have the opportunity to ingest bacteria from plants and vertebrate hosts that are used as a food source [6, 13, 14].

The composition of *Lu. longipalpis* microbiota includes bacterial taxa from the genera *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Yokenella*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Morganella* and *Weeksella* [15–18]. A metagenomic approach developed by McCarthy et al. [19] revealed the presence of sequences from bacteria, fungi, protist parasites, plants and metazoans in field-caught male and female *Lu. longipalpis*. Additionally, in a recent study of our group, the microbiota of field collected *Lutzomyia intermedia* was profiled by targeting 16S rRNA sequences representing midgut samples from unfed, blood-fed or gravid sand flies. The metagenomic analysis revealed that bacterial richness and abundance varied between the studied groups [20]. When considering the same model species, the community composition of the sand fly gut microbiota was modulated by the type of meal and by the presence or absence of *Leishmania* [10]. Our aim was to explore the dynamic bacterial community profiles of wild-caught *Lu. longipalpis* during distinct physiological conditions, including the ecological disturbance caused by *Leishmania* parasites upon the autochthonous adult host microbiota.

## Methods

### Parasite culture

*Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46) was cultured in M199 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), glutamine (12.5 mM), HEPES (40 mM), adenine (0.1 mM) and 2.5 µg/ml hemin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and kept in a BOD incubator (FANEM, model 347CD) at 26 °C in the laboratory.

### Sand fly collection and maintenance

Wild *Lu. longipalpis* sand flies were collected in the Lapinha Cave, which is a non-endemic leishmaniasis area located at Lagoa Santa, Brazil (19°3'S, 43°57'W) using CDC light traps. Unfed female sand flies were separated under stereomicroscopy and allowed to feed ad libitum on a 50% sucrose solution at 25 °C and 95% humidity. They were kept at the insectary of the Laboratory of Medical Entomology of the Centro de Pesquisas René Rachou for at least 3–4 days before the feeding experiments. The sand fly species was morphologically identified according to Young & Duncan, 1994 [21].

### Feeding and infection

Female *Lu. longipalpis* were divided into 3 groups of 100 insects each and allowed to feed on (i) sucrose (non-blood-fed, UF); (ii) uninfected blood-fed (BF); and (iii) infected blood-fed (BFI). Sand flies from the UF group were allowed to feed only on sucrose and separated for DNA extraction using (Qiagen, Hilden, Germany). The experimental infections were conducted as described [22]. Sand flies were fed through a membrane-feeding assay consisting of a glass-feeding device containing heparinized mouse blood (drawn intracardially from BALB/c mice) with heat-inactivated serum. The blood meal was offered to the BF and BFI groups, the BFI meal consisted of  $4 \times 10^6$  parasites/ml of *L. infantum chagasi* promastigotes. Fully engorged female *Lu. longipalpis* sand flies took a blood meal of approximately 0.2–0.3 µl each. Blood engorged flies were separated and maintained at 26 °C and 75% humidity and were provided 30% sucrose ad libitum. Three and seven days post-infection, 10 flies from the infected group were anesthetized with CO<sub>2</sub> and killed in 5% soup solution. The midguts were dissected and transferred to the tubes containing 30 µl of PBS. The guts were macerated briefly using a plastic pestle, and then spun twice at 800× rpm for 1 min to remove the debris. A 10 µl sample of the supernatant was counted under a hemocytometer (Additional file 1: Figure S1). In addition, 30 sand flies from UF, BF and BFI groups were dissected under a stereoscope in a biosafety cabinet and

separated into groups according to their physiological condition at the 3rd day after the blood feeding and stored in micro centrifuge tubes) at -20 °C for DNA extraction. Following the blood digestive process on the 7th day, 30 sand flies from BF group were separated as gravid (GR). This group was separated according their developing ovaries and verified to confirm the physiological condition and they were stored at -20 °C for downstream DNA extraction.

#### DNA extraction

Before the DNA extraction process, each pooled sample consisted of 30 sand flies from each experimental group and was surface sterilized by rinsing with distilled sterile water and then submerged for 1 min in 1% hypochlorite, washed three times with PBS [23] and dissected in a bio-safety cabinet (as described above). The genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's manual.

#### Amplicon-oriented metagenomic bacterial taxa profiling

The DNA samples were carefully packed on dry ice and shipped to Macrogen, Korea. They were sequenced using the Illumina MiSeq Next-Generation Sequencing (NGS) platform targeting the 16S rRNA gene (300 bp paired end reads covering the V3-V4 hypervariable region) in accordance with Macrogen's in-house pipelines accounting for: QC, Operational taxonomic unit (OTU) clustering at a 97% similarity threshold (CD-HIT-OTU), microbial community richness (Mothur v.1.33.0), and taxonomic assignment (Silva rRNA Database and in-house classifier software with an 80% minimum confidence value). To assess whether community homogeneity (alpha-diversity measure) was modulated by blood feeding and pathogen presence, we used the Shannon index [24] for each sample as it measures the evenness of the bacterial communities.

#### Phylogenetic dendrogram visualization

The phylogenetic relationship between the genus level OTUs (g-OTUs) predicted within the four tested groups was explored for illustrative means using NCBI's taxonomy browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>). The generated Philip format tree was visualized and edited using the Interactive Tree Of Life (iTOL) web-based tool [25].

#### Microbial ecology multivariate analyses

Comparative community diversity analyses were performed on the bacterial abundance data matrix to evaluate a potential biological pattern or signature profiles discriminating the compared sand fly groups. The ecological community comparisons, based on  $\beta$ -diversity

dissimilarity measurements, were performed on a matrix encompassing the bacterial OTU relative abundance data pertaining to the four tested conditions that were previously explained. Sequencing methods (considering elements such as the platform and primers), data QC processing, and the taxonomic profiling database used (among other factors) may bias community composition analyses, particularly if working at the species and genus ranks [26–29]. Thus, in order to perform more robust analyses by reducing the number of zeroes in the data matrix we opted to work at the taxonomic family level for a more conservative approach encompassing OTU counts at a higher rank. The variation in the community structure was explored by multivariate analyses based on pair wise distances between the four tested groups. A variance stabilizing transformation was applied to the relative abundance matrix to reduce the dispersion expressing the values as  $\arcsin\sqrt{x}$  (see Ramette [30], Mason et al. [31]). Exploratory multivariate analyses were performed on the transformed data set of the bacterial abundance profiles following suggested microbial ecology parameters [30, 32–34]. A hierarchical clustering and non-metric multidimensional scaling (NMDS) analyses of the Bray-Curtis (B-C) similarity index were generated using R-studio v.0.98.507. To further interpret the biological patterns and clustering of the experimental groups, we searched for the f-OTU correspondence (based on their relative abundance) with the biological conditions that each group represents. A detrended canonical correspondence analysis (DCA) was conducted to determine if a linear or unimodal ordination method could be applied to the data. The longest gradient obtained was larger than 3.0 SD units, which indicated that a unimodal model-based constrained method is a suitable test [30, 35]. Thus, a canonical correspondence analysis (CCA) was performed using an additional constraining explanatory matrix with “dummy” binary variables and referring to the following biological conditions: blood present in the midgut, infection with *Leishmania* parasites, and previous exposure to blood (to consider the case of gravid sand flies). By constraining the analysis, not only did we test for correspondence (or ecological preference) [30] between f-OTUs and the food source based groups, but also explored how the explanatory variables we proposed could influence the variance within the abundance matrix and the localization of the objects in the ordination space.

## Results

### Composition of the bacterial community associated with wild-caught *Lu. longipalpis*

The bacteria-targeted metagenomic analysis revealed different community compositions between the distinct

physiological stages of those tested. Sequencing revealed a total of 1,178,018 high quality reads, which were grouped as follows: UF, 93,244; GR, 284,017; BF, 388,670; and BFI, 412,087. The amplicon oriented metagenomic profiling revealed five phyla (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria and Spirochaetes), 64 bacterial genera and 46 families. When considering the predicted g-OTUs for each of the experimental conditions, the UF group harbored the highest number of OTUs with 57 genera and 14 exclusive (*Zymobacter*, *Aquabacterium*, *Empedobacter*, *Myroide*, *Petrimonas*, *Sphingobacterium*, *Niabella*, “*Candidatus* Cloacimonas”, *Sporolactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Lentzea*, “*Candidatus* Lumbricincola” and *Edwardsiella*); followed by the GR group with 46 genera and 3 exclusive (*Acidovorax*, *Plesiomonas* and *Sphaerotilus*), BFI (the infected group) with 22 genera, 3 exclusive (*Rickettsiella*, *Mucispirillum* and “*Candidatus* Cardinium”), and finally, the BF group with 6 genera and none exclusive. Crossing the taxa indices from each experimental condition, a core composed of 6 genera was identified (*Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* and *Chryseobacterium*).

In terms of the community homogeneity among the bacterial taxa, each of the groups presented the following Shannon indices: UF, 1.42; GR, 1.12; BF, 0.70; and BFI, 0.48. The color code used to show the presence (or absence) of the g-OTUs in each group (Fig. 1) led us to seek a potential biological pattern.

#### Comparisons of community richness and abundance

The bacterial f-OTU richness and abundance associated with wild-caught *Lu. longipalpis* varied between the studied groups. In the UF and GR groups, the family *Pseudomonadaceae* was the most prevalent and accounted for 76,031 and 204,688 HQ reads (81.60 and 72.23%, respectively). *Enterobacteriaceae* was the most abundant family in the BF and BFI groups and represented 236,442 and 393,927 HQ reads of each group (60.83 and 95.60%), respectively.

After the blood meal, bacterial abundance in terms of the raw reads increased when compared to the UF and GR groups. This was concomitant with the loss of f-OTU richness. Blood presence in the midgut negatively modulated the abundance of *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* and *Flavobacteriaceae* in the BF group, and *Enterobacteriaceae* and *Xanthomonadaceae* were the dominant taxa. In the BFI group, the abundance of *Enterobacteriaceae* increased drastically when compared with the rest of the groups (Additional file 2: Table S1).

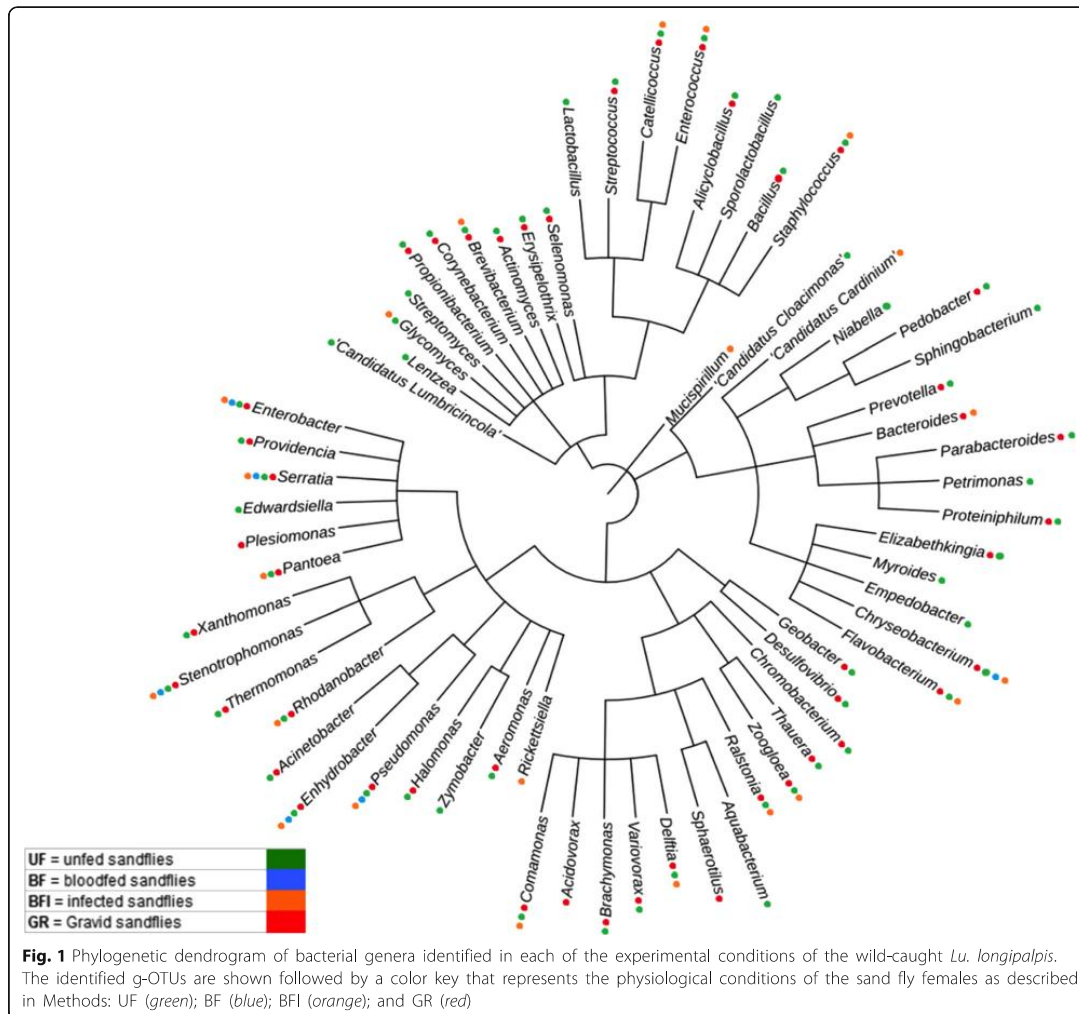
#### Multivariate analyses exploring the underlying bacterial profiles

Initially, exploratory unconstrained methods were applied to explore how the bacterial abundance profiles

(at the family taxonomic rank) may act as a “signature” capable of discriminating among the experimental groups under distinct physiological conditions and based on the influence of the inner ecosystem in which they develop. Both the hierarchical clustering and NMDS revealed two biologically relevant patterns based on a B-C distance matrix (Additional file 3: Figure S2). First, a clear resemblance between the bacterial abundance profiles of the sand flies from the GR and UF groups separated them from the two blood-fed groups (the BF and BFI groups). Secondly, the presence of *Leishmania* parasites may modulate the bacterial community composition (diversity and abundance-wise) because the sand flies from the BFI group clustered separately from its BF counterpart group.

Based on the exploratory unconstrained methods, a CCA (scaling 2: focusing on response variables) was executed following the recommendations found in the microbial ecology literature. This technique not only seeks a biological pattern driving the spatial distribution of the objects influenced by the OTU abundance profiles, but also inquires how each OTU responds to the explanatory variables. The CCA analysis coupled to the explanatory variables allowed us to obtain an estimate of the proportion of variance explained by each axis (CCA1 = 67.87% and CCA2 = 28.86%, Fig. 2). Thus, encompassed in these two constraining axes, we found 96.73% of the total variance within the dissimilarity matrix. As observed in the NMDS plot (and the hierarchical cluster plotted on top), a biological pattern based on a food source modulating the bacterial profile can be elucidated. Along the CCA1 axis, the UF and GR groups co-localize and separate from both blood-fed groups (BF and BFI groups). Along CCA2, we observed how the presence of the pathogen modulates the bacterial profile and draws this group apart from its counterpart and toward the lower right quadrant of the ordinate space (Fig. 2). By constraining the analysis, we were also capable of assessing the impact of the explanatory variables. The blue vector arrows shown in the lower right quadrant clearly indicate the influence of blood as a food source and infection as driving forces clustering the experimental groups (the length of the vector is indicative of its effect upon the spatial distribution of the elements).

The other layer of information obtained from this method is the ecological preference towards each of the nutritional/physiological states that each f-OTU showed and their response to the explanatory vectors. This is assessed by: their location within the ordination space and their proximity to each of their “ecological niches” or the sand fly group and a right-angled projection onto the vector arrows. The ecological correspondence is as follows: BF group = *Xanthomonadaceae*; BFI group =



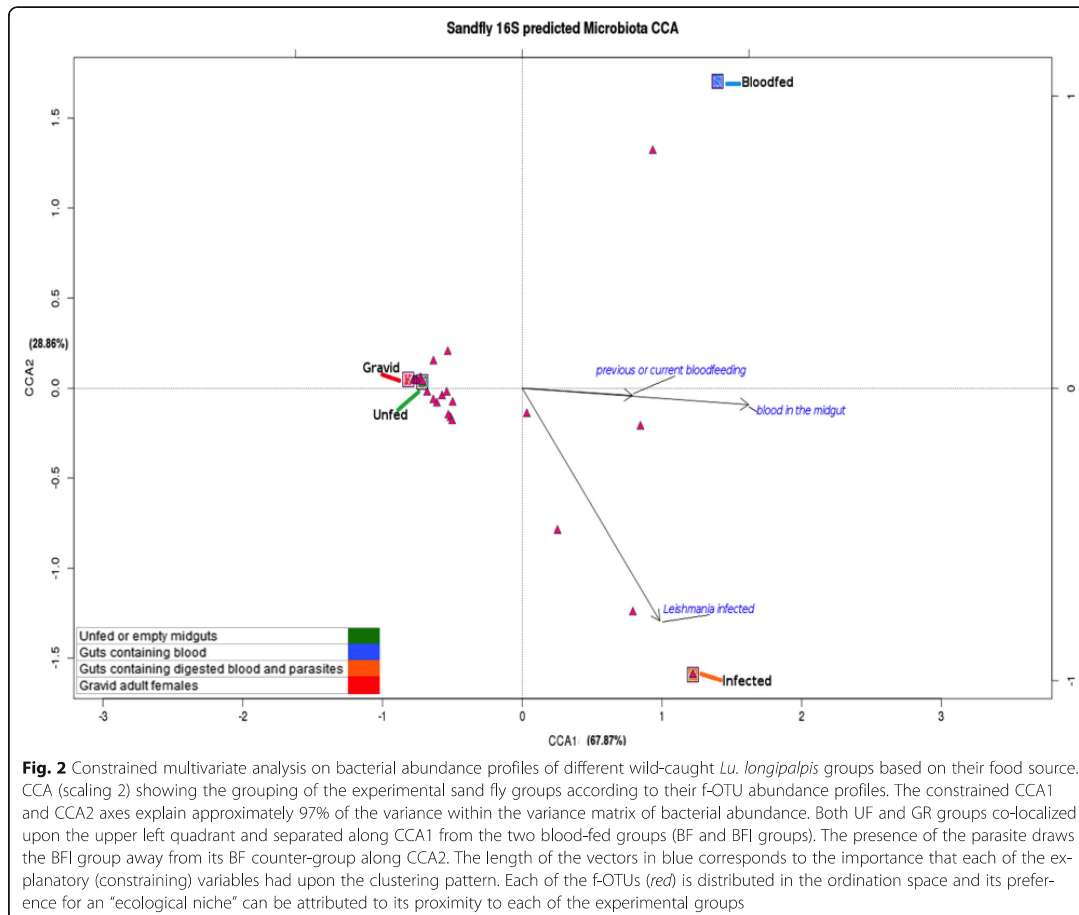
*Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Coxiellaceae*, *Flameovirgaceae*, *Deferribacteraceae*, *Glycomycetaceae*; and “co-localized” UF and GR groups = *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Thermotogaceae*, *Actinomycetaceae*, *Planococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Aeromonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Sinobacteraceae*, *Lactobacillaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Spirochaetaceae*, *Geobacteraceae*, *Halomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Chromatiaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Moraxellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Streptomycetaceae*, *Actinosynnemataceae*, *Comamonadaceae*,

*Cytophagaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* and *Sporolactobacillaceae*.

## Discussion

Most studies evaluating the microbiota of phlebotomines have used classical microbiological techniques such as bacterial culture and isolation, which are limited in their ability to broadly profile the insect’s microbiota since most bacteria have not been cultured to this date [36]. Our study analyzed the microbiota composition of wild-caught *Lu. longipalpis* from Lapinha Cave by 16S rRNA gene-oriented metagenomics through a technique that allows for the detection of a large number of bacterial taxa for which culture is not yet feasible.





Meta-taxonomic profiling revealed 64 unique bacterial OTUs at the genera level associated with the *Lu. longipalpis* groups. The majority of these genera include bacteria commonly associated with soil, water and plants, which can be acquired during the feeding habits of sand flies, i.e. soil during the larval stage and the sap of plants during the adult phase [9, 12, 14, 37]. In terms of g-OTU numbers, the group with the highest diversity was the UF group (57 genera), followed by GR (46 genera), BFI (22 genera) and BF (6 genera). When addressing community richness in terms of evenness, the measures of Shannon indices revealed that bacterial OTUs were more diverse and equitably distributed in gravid and sugar-fed sand flies, whereas the read abundances were less homogeneously distributed among the dominant taxa in the community when exposed to blood and the invading pathogen.

Our community composition study can be contrasted with a recent study that also targeted bacterial profiling

of sand fly microbiota in different physiological conditions [10, 20]. A metagenomic study by Kelly et al. [10] also targeted *Lu. longipalpis* microbiota by taking into account the modulation effect of pathogen infection as we did. In their study, *Acetobacteraceae* and *Enterobacteriaceae* were the most abundant families in the blood-fed and infected groups and *Methylobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Shingomonadaceae*, *Alcaligenaceae* and *Brucellaceae* associated with their tests groups. We also detected the predominance of *Enterobacteriaceae* in the same conditions. In contrast, we did not detect *Acetobacteraceae* in those groups and *Xanthomonadaceae* were the co-dominant f-OTU in the blood-fed group. These diversity divergences for the same host species are plausible and potentially because wild-caught and laboratory colonized *Lu. longipalpis* harbor different bacterial consortia both in terms of abundance and richness. Such a phenomenon has been observed before in other insects, such as

*Anopheles* [38]. In a recent study, Fraihi et al. [18] demonstrated that microbiota composition shows diversity decline at the species level during the time course of the transmission period. We performed experimental infection with sand flies from a non-endemic area and therefore we did not analyze the transmission period. However our BFI group also showed a decrease on the microbiota composition when compared with the UF and GR groups. Together, these data suggest that successful invasion and concomitant transmission of these vector-borne parasites is reflected by the ecological disturbance of the native bacterial community in the host.

Notwithstanding the shifting bacterial diversity profiles, a group of permanently associated taxa was present, in agreement with reports for other vectors. This core set of bacterial OTUs (mostly at the genus and family taxonomic level) remains present in the internal ecosystem through different life stages and between physiological conditions and in multiple body compartments. Inner vector biology effectors such as nutrition, immune response and age would then modulate this core group in terms of relative abundance [39–42]. Their importance would lie in their potential role as providers of nutrients, gene functions in key host-symbiont metabolic networks [43–46], or their involvement in hematophagy related redox homeostasis [47].

Among the core taxa identified, the genera *Enterobacter* and *Serratia* (*Enterobacteriaceae* family) have been previously described in Old and New World sand flies including in *Lu. longipalpis* from Lapinha Cave [6, 10, 12, 15–18, 20, 37, 48–50]. This f-OTU is commonly reported as an abundant component of the bacterial consortium in hematophagous arthropods and thrives particularly in the midgut of blood-fed and *Plasmodium*-infected anophelines [38, 39] and in other adult female culicids [51]. Interestingly, in *Aedes aegypti*, taxa from this family significantly thrive more in sugar-fed mosquitoes than blood-fed mosquitoes [41] in which *Comamonadaceae* [46] and *Pseudomonadaceae* [41] dominantly proliferate when exposed to blood. In our study, *Enterobacteriaceae* was the most abundant in both the BF and BFI groups.

At the genus level, *Stenotrophomonas* was the most prevalent in the BF group. This g-OTU was previously described in wild [15, 17, 18] and blood-fed female *Lu. longipalpis* [10, 15], as well as in *P. duboscqi* [12]. As observed in *Anopheles gambiae* [39], an increase of bacterial biomass (in terms of number of reads) in blood-fed individuals was due to the higher abundance of *Enterobacteriaceae*, which occurs along with a reduction in the OTU numbers. This ecological unevenness is reflected concordantly in the trend of the Shannon indices estimated for the sand fly groups exposed to blood feeding and is more acute when infective feeding occurred.

The genus *Pseudomonas* was the most prevalent in the UF and GR groups and accounted for 76,031 and 204,688 HQ reads. This g-OTU was previously identified in *Lu. longipalpis* [10, 15, 16, 20, 37, 52] *P. argentipes*, *P. duboscqi*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi* and *P. sergenti* [6, 12, 14, 17, 48, 53]. This is the first account of *Enhydrobacter* and *Chryseobacterium* in sand flies, genera belonging to the *Moraxellaceae* and *Flavobacteriaceae* families, respectively, whose presence in sand flies was reported recently [10]. Both genera were more abundant in the UF and GR groups than in BF and BFI groups.

By exploring the beta diversity both by a ranking method (NMDS) and a constraining method (CCA), we observed that the community composition within the sand fly holobiont is modulated by the type of meal, the presence or absence of *Leishmania* parasites, and vitellogenesis. The CCA analysis revealed a resemblance between the bacterial abundance profiles of the UF and GR sand fly groups. They both localize close along the first axis (Fig. 2) that separated them from the two blood-present midgut groups (BF and BFI). The biological effect of blood nutrition and infection, represented by the constraining vectors, clearly drive these two sand fly groups to localize separately along the CCA2 axis. Modulation of bacterial profiles by infection of a protozoa pathogen, which is reflected by constrained ordination space, had been already reported for the *A. gambiae-Plasmodium falciparum* model using the RDA method [39]. Recent advances in the area of microbial ecology indicated the need to study microbiomes under the light of community ecology.

The bacterial f-OTU profile of gravid females resembled that of the UF group according to their colocalization on the CCA plot. This diversity based signature would imply that the microbial assembly within the insect shows “composition resilience” when addressing the feeding behavior from the perspective of disturbance ecology tenants [54]. In this case, the bacterial community would reacquire the carbohydrate nutrition signature profile (UF) after the blood-feeding disturbance. The CCA analysis, a method based on the ecological niche theory [30, 34], allowed us to comprehend the preference that f-OTUs exhibit and thrives under particular biological conditions. Thus, their response to biotic and abiotic effectors reveals signature profiles that may aid to further elucidate the metabolic interactions between host and microbiota as we approach them as a “macrobial unit” [55] as interestingly proposed when studying holobiont phyllosymbiosis [55].

## Conclusions

We described the native microbiota of wild-caught *Lu. longipalpis* under distinct physiological conditions including a pathogen infected group. The observed

dynamic nature of the bacterial community expands the knowledge pertaining to the tripartite host-microbiota-pathogen interactions. It is important to further study how laboratory and field-collected communities differ in successfully developing control strategies based on bacterial symbionts so that it can be tested for other arthropod vectors.

### Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Parasite numbers in infected *L. longipalpis* (3 to 7 days after the infective blood meal). Flies were infected by membrane feeding; the midguts were dissected on the indicated days post-feeding. The parasite densities varied according to the post-infection day showing a median of 18,450 parasites on the 3rd day and 9650 on the 7th day. (PNG 743 kb)

**Additional file 2: Table S1.** Taxonomic profile and relative abundance of f-OTUs. Taxonomic profile and relative abundance of f-OTUs associated with different *Lu. longipalpis* experimental conditions (UF = unfed; GR = gravid; BF = blood-fed; and BFI = blood-fed infected). (PNG 1141 kb)

**Additional file 3: Figure S2.** Unconstrained multivariate analyses of biological patterns. NMDS plot and hierarchical clustering dendrogram showing how bacterial abundance signatures at the f-OTU level potentially discriminate between the four experimental groups. As observed across NMDS dimensions 1 and 2, sand flies from the GR and UF groups present a similar bacterial abundance profiles, whereas the blood meal seems to generate two distinct signatures that explain the spatial clustering and branching patterns along both dimensions. The NMDS analysis was plotted based on the results obtained when the stress of the meta MDS function approximated the zero value after 20 runs. (PNG 1454 kb)

### Abbreviations

BF: Uninfected blood-fed; BFI: Infected blood-fed; CCA: Canonical correspondence analysis; DCA: Detrended canonical correspondence analysis; f-OTUs: Family level operational taxonomic units; g-OTUs: Genus level operational taxonomic units; GR: Gravid; ITOL: Interactive Tree Of Life; NGS: Next-generation sequencing; NMDS: Non-metric multi-dimensional scaling; OUT: Operational taxonomic unit; UF: Non-blood-fed

### Acknowledgements

This study was partially funded by the following Brazilian agencies: Foundation of the Institute Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Program Science without Borders, INCT-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Entomologia Molecular and Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG).

### Funding

NFCS and PFPF are research fellows, supported by CNPq. ACAMP and TBC are students, supported by CAPES; LEMV and ASO are supported by CNPq.

### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this article. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

### Authors' contributions

ACAMP, LEMV, TBC and ASO carried out the infection experiments of the sand flies and parasite culture as well as DNA extraction and assisted with the qPCR analysis. ACAMP, LEMV, NFCS and PFPF analyzed the results and drafted the results, table, figures and manuscript. NFCS and PFPF conceived the study and coordinated it, and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Ethics approval

This study was conducted in accordance with recommendations from the Manual for the Use of Animals (FIOCRUZ, Ministry of Health of Brazil, National decree, Nr. 3179). The protocol was approved by the Ethics Committee for

the Use of Animals of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Ministry of Health of Brazil, Nr. L-1715).

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Publisher's Note

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

Received: 6 September 2017 Accepted: 13 December 2017

Published online: 29 December 2017

### References

- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J*. 1903;2:1261–2.
- World Health Organization. Leishmaniasis: background information. Available at: [www.who.int/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/en/). Accessed 7 June 2017.
- Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1912;4:84–95.
- Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Phlebotomidae). *J Med Entomol*. 2000;37(1):134–40.
- Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:453–83.
- Dillon RJ, el Kordy E, Shehata M, Lane RP. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996; 90(Suppl. 6):669–73.
- Moraes CS, Seabra SH, Castro DP, Brazil RP, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Exp Parasitol*. 2008;118(Suppl. 4):561–8.
- Moraes CS, Seabra SH, Albuquerque-Cunha JM, Castro DP, Genta FA, de Souza W, et al. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Exp Parasitol*. 2009;122(Suppl. 2):84–90.
- Hassan MI, Al-Sawaf BM, Fouda MA, Al-Hosry S, Hammad KM. A recent evaluation of the sand fly, *Phlebotomus papatasi* midgut symbiotic bacteria effect on the survivorship of *Leishmania major*. *J Anc Dis Prev Rem*. 2014; 2(Suppl. 1):110.
- Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*. 2017;8(1):e01121–16.
- Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Aguiar-Martins K, Al Salem WS, Cavalcante RR, Dillon VM, et al. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit Vectors*. 2014;7:329.
- Volf P, Kiewegova A, Nemeč A. Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboseqi* (Diptera: Phlebotomidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitol (Praha)*. 2002;49(Suppl. 1):73–7.
- Schlein Y, Jacobson RL. Sugar meals and longevity of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordan Valley. *Med Vet Entomol*. 1999;13:65–71.
- Maleki-Ravasan N, Oshaghi MA, Afshar D, Arandian MH, Hajikhani S, Akhavan AA, et al. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. *Parasit Vectors*. 2015;8:63.
- Oliveira SM, Moraes BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, D'Almeida JM, Asensi MD, et al. Prevalence of microbiota in the digestive tract of wild females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotomidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(Suppl. 3):319–22.
- de Oliveira SMP, de Moraes BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, Vilela ML, Brazil RP, et al. Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotomidae) from colonies feeding on blood meal and sucrose plus blood meal. *Cad Saude Publica*. 2001;17(Suppl. 1):229–32.
- Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SM. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Phlebotomidae). *Neotrop Entomol*. 2008;37(Suppl. 5):597–601.

18. Fraihi W, Fares W, Perrin P, Dorkeld F, Sereno D, Barhoumi W, et al. An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the western Mediterranean Basin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005484.
19. McCarthy CB, Diambra LA, Rivera Pomar RV. Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1304.
20. Monteiro CC, Villegas LEM, Campolina TB, Pires ACMA, Miranda JC, Pimenta PFP, Secundino NFC. Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasit Vectors*. 2016;9:480.
21. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst*. 1994;54:1–881.
22. Tesh RB, Modi GB. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg*. 1984;33:41–6.
23. Lacey LA, Brooks WM. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego: Elsevier Science; 1997.
24. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*. 1948;27:379–423.
25. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*. 2007;23(1):127–8.
26. Liu B, Gibbons T, Ghodsi M, Treangen T, Pop M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC Genomics*. 2011;12(Suppl. 2):S4.
27. Prakash T, Taylor TD. Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications. *Brief Bioinform*. 2012;13:711–27.
28. Sharma N, Tanksale H, Kapley A, Purohit HJ. Mining the metagenome of activated biomass of an industrial wastewater treatment plant by a novel method. *Indian J Microb*. 2012;52:538–43.
29. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci*. 2014;5:209.
30. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;62:142–60.
31. Mason MR, Nagaraja HN, Camerlengo T, Joshi V, Kumar PS. Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome. *PLoS One*. 2013;8:e77287.
32. Anderson MJ, Crist TO, Chase JM, Vellend M, Inouye BD, et al. Navigating the multiple meanings of beta diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecol Lett*. 2011;14:19–28.
33. Legendre P, De Caceres M. Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecol Lett*. 2013;16:951–6.
34. Paliy O, Shankar V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Mol Ecol*. 2016;25:1032–57.
35. Ter Braak CJ, Smlauer P. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). [www.canoco.com](http://www.canoco.com); 2002. Accessed 11 Apr 2017.
36. Zhou J, He Z, Yang Y, Deng Y, Tringe SG, Alvarez-Cohen L. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio*. 2015;6(1):e02288–14.
37. Peterkova-Koci K, Robles-Murguía M, Ramalho-Ortigao M, Zurek L. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors*. 2012;5:145.
38. Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8(Suppl. 5):e1002742.
39. Wang Y, Gilbreath TM III, Kukutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One*. 2011;6:e24767.
40. Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Boissiere A, Awono-Ambene PH, et al. Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infect Genet Evol*. 2014;28:715–24.
41. David MR, Santos LM, Vicente AC, Maciel-de-Freitas R. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:577–87.
42. Segata N, Baldini F, Pompon J, Garrett WS, Truong DT, et al. The reproductive tracts of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender- and swarm-enriched microbial biomarkers. *Sci Rep*. 2016;6:24207.
43. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37:699–735.
44. Gendrin M, Christophides GK. The *Anopheles* Mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - new insights into malaria vectors*. London United kingdom: INTECH; 2013.
45. Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*. 2013;6:146.
46. Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol*. 2014;23:2727–39.
47. Champion CJ, Xu J. The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017;105:79–85.
48. Hillesland H, Read A, Subhadra B, Hurwitz I, McKelvey R, Ghosh K, et al. Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(Suppl. 6):881–6.
49. Akhouni M, Bakhtiari R, Guillard T, Baghaei A, Tolouei R, Sereno D, et al. Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of phlebotomine sand flies collected in north-western Iran. *PLoS One*. 2012; 7(Suppl. 11):e50259.
50. Mukhopadhyay J, Braig HR, Rowton ED, Ghosh K. Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the old world. *PLoS One*. 2012;7(5):e35748.
51. Novakova E, Woodhams DC, Rodriguez-Ruano SM, Brucker RM, Leff JW, et al. Mosquito microbiome dynamics, a background for prevalence and seasonality of West Nile virus. *Front Microbiol*. 2017;8:526.
52. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(Suppl. 2):330–9.
53. Maleki-Ravasan N, Oshaghi MA, Hajikhani S, Saeidi Z, Akhavan AA, Gerami-Shoar M, et al. Aerobic microbial community of insectary population of *Phlebotomus papatasi*. *J Arthropod Borne Dis*. 2014;8(Suppl. 1):69–81.
54. Christian N, Whitaker BK, Clay K. Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Front Microbiol*. 2015;6:00869.
55. Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, van Opstal EJ, Bordenstein SR. Phyllosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol*. 2016;14:e2000225.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





### 7.1.2 Artigo 2

Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing.

**Autores:** Carolina Cunha Monteiro, Luís Eduardo Martinez Villegas, Thais Bonifácio Campolina, Ana Clara Araújo Machado Pires, Jose Carlos Miranda, Paulo Filemon Paolucci Pimenta and Nágila Francinete Costa Secundino

## 7.2 Doutorado Sanduíche – Ciências Sem Fronteiras (CAPES)

Durante o período de maio de 2016 a abril de 2017 realizei parte do meu doutorado no Laboratory of Malaria and Vector Research - NIAID, no National Institute of Health (NIH) em Bethesda/Maryland - Estados Unidos, sob a supervisão do Dr. Fabiano Oliveira e Dr. Jesus Valenzuela.

## 7.3 Participações em Congressos

7.3.1 Internacional Symposium on Phlebotomine Sandflies (ISOPS VIII), Misiones/Argentina, 2014. Study of the susceptibility of *Lutzomyia (L.) longipalpis* with different species of *Leishmania* – **APRESENTAÇÃO ORAL**;

7.3.2 65th Annual Meeting - American Society of Tropical Medicine & Hygiene, 2016, Atlanta. **ASTMH**, 2016. *Lutzomyia longipalpis* vector competence to different species of *Leishmania*. **Ana Clara Araújo M. Pires**, Fabiano Oliveira, Jesus G. Valenzuela, Paulo F. P. Pimenta, Nágila F. C. Secundino – **APRESENTAÇÃO DE POSTER**;

7.3.3 **GRC - Gordon Research Conference** on Tropical Infectious Diseases, Galveston – Texas/Estados Unidos, 2017. *Lutzomyia longipalpis* vector competence to different species of *Leishmania*. **Ana Clara Araújo M. Pires**, Fabiano Oliveira, Jesus G. Valenzuela, Paulo F. P. Pimenta, Nágila F. C. Secundino - **APRESENTAÇÃO DE POSTER**;

7.3.4 **GRS - Gordon Research Seminars** on Tropical Infectious Diseases, Galveston – Texas/Estados Unidos, 2017. *Lutzomyia longipalpis* vector competence to different species of *Leishmania*. **Ana Clara Araújo M. Pires**, Fabiano Oliveira, Jesus G. Valenzuela, Paulo F. P. Pimenta, Nágila F. C. Secundino - **APRESENTAÇÃO DE POSTER**;

7.3.5 XXI Encontro Anual do Grupo Arthromint, Ilha Grande – Angra dos Reis/RJ, 2017- *Lutzomyia longipalpis* vector competence to different species of *Leishmania* - **APRESENTAÇÃO ORAL;**

7.3.6 7º International Congress Society Vector Ecology – Palma de Maiorca/Espanha, 2017. Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of Visceral Leishmaniasis) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. **Ana Clara Araújo M. Pires;** Luís M. Villegas; Thaís B. Campolina; Alessandra A. Orfanó; Paulo F. P. Pimenta and Nágila F. C. Secundino - **APRESENTAÇÃO DE POSTER;**

### 7.3 Participação em Simpósio

Palestra no I Simpósio de Entomologia Médica do Sudoeste da Bahia: Estudos Integrados de Estratégias e Inovações Biológicas e Sociais, Vitória da Conquista/Bahia, 2017. ‘Aspectos da permissibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* a diferentes espécies de *Leishmania*. ‘

### 7.4 Participação em banca de conclusão de curso

**PIRES, A. C. A. M.;** MELO, F. F.; BEZERRA, J. M. T. Participação em banca de Thaís Bonifácio Campolina. Estudo da microbiota intestinal do *Lutzomyia longipalpis*. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

### 7.6 Colaboração em Capítulo de Livro

#### **The biology of the *Leishmania*-sand fly interaction**

Authors: Paulo Filemon Paolucci Pimenta, Vanessa Cabreira de Freitas, Carolina Cunha Monteiro, **Ana Clara Araújo Machado Pires** and Nágila Francinete Costa Secundino.

## 8. REFERÊNCIAS

Abdulrahman, YI; Jeremy, CG; Molyneux, DH; Bates, P. Transformation, development and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(3), 1998, pp. 421–425. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Akhoundi M, Bakhtiari R, Guillard T, Baghaei A, Tolouei R, Sereno D, et al. Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of phlebotomine sand flies collected in north-western Iran. PLoS One. 2012; 7(Suppl. 11): e50259.

Ashford, RW. A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. Parassitologia JJ 1991.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med 2004; 4:601-9.

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

Beach, R; Kiilu, G; Leeuwenburg, J. Modifications of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:278-82.

Basset, A; Tzou, P; Lemaitre, B; Boccard, F. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. EMBO reports. 2003 ,4(2):205–9.

Baton, LA; Robertson, A; Warr, E; Strand, MR; Dimopoulos, G. Genome-wide transcriptomic profiling of *Anopheles gambiae* hemocytes reveals pathogens specific

signatures upon bacterial challenge and *Plasmodium berghei* infection. *BMC Genomics* 2009, 10: 257-270.

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

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

Besteiro S, Eilliams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007; 37:1063-75.

Boissière, A; Tchioffo, MT; Bachar, D; Abatem L; Marie, A; Nsango, SE; Shahbazkia, HR; Awono-Ambene, PH; Levashina, EA; Christen, R; Morlais, I. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): e1002742.

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

Brazil, PP & Brazil, BG. *Biologia de flebotomíneos neotropicais*. In: Rangel, E. F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; pp. 257– 274.

Brooks, AW; Kohl, KD; Brucker, RM; van Opstal, EJ; Bordenstein, SR. Phylosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol.* 2016;14: e2000225.

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(Suppl. 2):330–9.

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

Champion, CJ; Xu, J. The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017; 105:79–85.

Christian N, Whitaker BK, Clay K. Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Front Microbiol*. 2015;6:00869.

Coelho, MV; Falcão, AR; Falcão, AL. Development of species of the genus *Leishmania* in Brazilian species of sandflies of the genus *Lutzomyia franca*, 1924. II. Life cycle of *L. tropica* in *L. longipalpis* and *L. renei*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1967a Jul-Aug;9(4):192-6.

Coelho, MV; Falcão, AR; Falcão, AL. Development of species of the *Leishmania* genus in Brazilian species of phlebotomus of the *Lutzomyia franca* type, 1924. 3. Life cycle of *L. mexicana*, *L. longipalpis* and *L. renei*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1967b Sep-Oct;9(5):299-303.

Coelho-Finamore, JM; Freitas, VC; Assis, RR; Melo, MN; Novozhilova, N; Secundino, N F; Pimenta, PF; Turco, SJ; Soares, RP. *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International Journal for Parasitology*, v. 41, n. 3-4, p. 333-342, 2011.

Coon, KL; Vogel, KJ; Brown, MR; Strand MR. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol*. 2014; 23:2727–2739.

Christian, N; Whitaker, BK; Clay, K. Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Front Microbiol.* 2015; 6:00869.

Christophides, GK; Zdobnov, E; Barillas-Mury, C; Birney, E; Blandin, S; Blass, C; Brey, PT; Collins, FH; Danielli, A; Dimopoulos, G; Hetru, C; Hoa, NT; Hoffmann, JA; Kanzok, SM; Letunic, I; Levashina, EA; Loukeris, TG; Lycett, G; Meister, S; Michel, K; Moita, LF; Müller, HM; Osta, MA; Paskewitz, SM; Reichhart, JM; Rzhetsky, A; Troxler, L; Vernick, KD; Vlachou, D; Volz, J; von Mering, C; Xu, J; Zheng, L; Bork, P; Kafatos, FC. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002. 5591 159-165.

David, MR; Santos, LM; Vicente, AC; Maciel-de-Freitas, R. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111:577–587.

Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ, Beverley SM. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 1995; 269: 1869-72.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

Dillon, RJ; el Kordy, E; Shehata, M; Lane, RP. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Dec; 90(6):669-73.

Dillon, R; Charnley, K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* 2002, 153:503–9.

Dillon, RJ; Dillon, VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2004, 49:71-92.

Dillon, RJ; Vennard, CT; Buckling, A; Charnley, AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol Letters* 2005, 8: 1291–1298.

Donnelly, K; Lima, H; Titus, RG .Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *Journal of Parasitology* 84: 97-103, 1998.

Elnaiem, DEA; Schorscher, J; Bendall, A; Obsomer, V; Osman, ME; Mekkawi, AM. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2003; 68(1): 10-17.

Engel, P; Moran, NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37:699–735.

Fraih, W; Fares, W; Perrin, P; Dorkeld, F; Sereno, D; Barhoumi, W, et al. An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the western Mediterranean Basin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(3): e0005484.

Feliciangeli, MD. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford. v.18, p. 7061-1067, 2004.

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



Forattini, OP. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública 1953; 7: 158-167.

Gendrin, M; Christophides, GK. The *Anopheles* Mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - new insights into malaria vectors. London United kingdom: INTECH; 2013.

Gimonneau, G; Tchioffo, MT; Abate, L; Boissiere, A; Awono-Ambene, PH; et al. Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. Infect Genet Evol. 2014; 28:715–724.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol 2003; 33: 1027-34.

Gouveia, C; Asensi, MD; Zahner, V; Rangel, EF; Oliveira, SMP. Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated to Different Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Neotrop Entomol 2008, 37:597-601.

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

Hassan, MI; Al-Sawaf, BM; Fouda, MA; Al-Hosry, S; Hammad, KM. A recent evaluation of the sand fly, *Phlebotomus papatasi* midgut symbiotic bacteria effect on the survivorship of *Leishmania major*. J Anc Dis Prev Rem. 2014;2 (Suppl. 1):110.

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

Hillesland, H; Read, A; Subhardra, B; Hurwitz, I; Mckelvey, R; Ghosh, K; Das, P; Durvasula. Identification of aerobic bacteria from the Kala Azar vector, *Phlebotomus*

argentipes: A platform for potential parastransgenic manipulation of sand flies. *Ann.J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 881-886.

Hillyer, JF; Christensen, BM. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *J Histochem Cytochem.* 2005, 53:689-98.

Hoffman, JA; Reichhart, JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol* 2002, 3: 121-126.

Kamhawi, S; Yasmine, B; Modi, G; Rowton, E; Sacks, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351- 1354, 2000.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22 (9): 439-45.

Kelly, PH; Bahr, SM; Serafim, TD; Ajami, NJ; Petrosino, JF; Meneses, C, et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio.* 2017;8(1): e01121–16.

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

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

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

Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan. 1990.

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

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

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

Lainson, R & Shaw, JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds.), *Topley & Wilson's microbiology & microbiol infections*, 9th ed., vol. 5, Parasitology, Arnold, London 1998; p. 242-266.

Lainson, R & Rangel, EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-27.

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

Lawyer, PG; Young, DG; Butler, JF; Akin, DE. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1987; 24:347-55.

Lima, H; Titus, RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. Infection and Immunity 64: 5442-5445, 1996.

Lima,HC; Bleyenbergh, JA ;Titus,RG. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. Parasitol. Today, 13 (1997), pp. 80-82

Madeira, MF; Uchoa, CMA; Leal, CA; Silva, RMM; Duarte, R; Magalhães, CM. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 551-555.

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

Maleki-Ravasan, N; Oshagh,i MA; Afshar, D; Arandian, MH; Hajikhani, S; Akhavan, AA; Yakhchali, B; Shirazi, MH; Rassi, Y; Jafari, R; Aminian, K; Fazeli-Varzaneh, RA; Durvasula, R. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. Parasit Vectors. 2015 Jan 29; 8():63.

Mason, MR; Nagaraja, HN; Camerlengo, T; Joshi, V; Kumar, PS. Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome. PLoS One. 2013;8: e77287.

McCarthy, CB; Diambra, LA; Pomar, RVR. Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, using an unbiased High-Throughput Approach. PLoS Negl Trop Dis. 2011 5(9): e1304.

McConville MJ, Handman E. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. Int J Parasitol 2007; 37:1047-51.

Minard, G; Mavingui, P; Moro, CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. Parasit Vectors. 2013.

Ministério da Saúde, 2018.  
[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_vis\\_ceral\\_1edicao.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_vis_ceral_1edicao.pdf). Acesso em 02 de fevereiro de 2018.

Monteiro, CC; Villegas, LEM; Campolina, TB; Pires, ACAM; Miranda, JC; Pimenta, PFP; Secundino, NFC. Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. Parasit Vectors. 2016; 9:480.

Moraes, CS; Seabra, SH; Castro, DP; Genta, FA; Brazil, RP; de Souza, W; Garcia, ES; Azambuja, P. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. Experimental Parasitology 2008, 118 561–568.

Moraes, CS; Seabra, SH; Albuquerque-Cunha, JM; Castro, DP; Genta, FA; de Souza, W; Brazil, RP; Garcia, ES; Azambuja, P. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. Experimental Parasitology 2009, 122 84–90.

Mukhopadhyay J, Braig HR, Rowton ED, Ghosh K. Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the old world. PLoS One. 2012;7(5): e35748.

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

Neves, DP; Melo, AL; Linardi, PM; Vitor, RWA. *Parasitologia Humana*. Atheneu 2011. 12 ed. 377-85.

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

Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* Infection by modulating Interleukin-10 production. *Infect Immun* 2004; 1240-7.

Novakova, E; Woodhams, DC; Rodriguez-Ruano, SM; Brucker, RM; Leff, JW; et al. Mosquito microbiome dynamics, a background for prevalence and seasonality of West Nile virus. *Front Microbiol*. 2017; 8:526.

Oliver, KM; Russell, JA; Moran, NA; Hunter, MS. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003, 100:1803–7.

Oliveira, SMP; Moraes, BA; Gonçalves, CB; Giordano-Dias, CM; d’Almeida, JM; Asensi, MD; Mello, RP; Brazil, RP. Prevalence of the microbiota in the digestive tract of wild caught females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Psychodiade. *Revista da Sociedade brasileira de Medicina tropical* 2000, 33(3): 319-322.

Oliveira, SMP; Moraes, BA; Gonçalves, CA; Giordano-Dias, CM; Vilela, ML; d’Almeida, JM; Asensi, MD; Mello, RP. Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) Diptera: Psychodiade feeding in blood meal and saccharose plus blood meal. *Cadernos de Saúde Publica do Rio de Janeiro*, 2001, 17(1) 229-232.

Osta, MA; Christophides, GK; Vlachou, D; Kafatos, FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J Exp Biol.* 2004;2551-63.

Paliy O, Shankar V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Mol Ecol.* 2016; 25:1032–57.

Pessoa, FAC; Medeiros, JF; Barrett, TV. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 593-599.

Peterkova-Koci, K; Robles-Murguia, M; Ramalho-Ortigao, M; Zurek, L. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors.* 2012 Jul 24; 5():145.

Pimenta, PFP; Turco, ST; McConville, MJ; Lawyer, PG; Perkins, PV; Sacks, DL. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256: 1812-1815.

Pimenta, PFP; Saraiva, EM; Rowton, E; Mogi, GG; Garraway, LA; Beverley, SM; Turco, S; Sacks, DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994a; 91: 9155-9.

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

Pimenta, PFP; Modi, GB; Pereira, ST; Shahabuddin, M; Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolitic activities of the sandfly midgut. *Parasitol.* 1997.115: 359-369.

Pires, ACAM; Villegas, LEM; Campolina, TB; Orfanó, AS; Pimenta, PFP; Secundino, NFC. Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis *Parasit Vectors.* 2017; 10: 627.

Queiroz, MFM; Varjão, JR; Moraes, SC; Salcedo, GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev, Soc. Bras. Medicina Tropical* 2012; 45(3): 313-317.

Ramette, A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007; 62:142–60.

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

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

Ready, PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, v. 58, p. 227-250, 2013.

Reis, LLD; Balieiro, AADS; Fonseca, FR; Gonçalves, MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Sep-Oct;50(5):638-645.



Ribeiro, J. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Annu Rev Entomol* 32: 463-478, 1987.

Ribeiro, J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143- 152, 1995.

Rogers, ME; Chance, ML; Bates, PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002; 124:498-507.

Rogers, ME & Bates, PA. *Leishmania* Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. *PLoS Pathogens*, 3(6), e91. 2007.

Rogers ME. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Front Microbiol.* 2012 Jun 28;3:223.

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

Sacks, DL; Saraiva, EM; Rowton, E; Turco, SJ; Pimenta, PFP. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 1994; 108: S55:62.

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

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

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

Samuelson, J; Lerner, E; Tesh, R; Titus, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by co injection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173: 49-54, 1991.

Sangiorgi, B; Miranda, DN; Oliveira, DF. Natural Breeding Places for Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Semiarid Region of Bahia State, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*. 2012; 2012:124068.

Sant'Anna, MRV; Darby, AC; Brazil, RP, et al. Investigation of the Bacterial Communities Associated with Females of *Lutzomyia* Sand Fly Species from South America. Moreira LA, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(8): e42531.

Sant'Anna, MR; Diaz-Albiter, H; Aguiar-Martins, K; Al Salem, WS; Cavalcante, RR; Dillon, VM; et al. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit Vectors*. 2014; 7:329.

Schlein, Y; Polacheck, I; Yuval, B. Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*. 1985, (1) 57-66.

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

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

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

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

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

Segata, N; Baldini, F; Pompon, J; Garrett, WS; Truong DT, et al. The reproductive tracts of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender- and swarm-enriched microbial biomarkers. Sci Rep. 2016; 6:24207.

Shannon, CE. A mathematical theory of communication. Bell Syst Tech J. 1948; 27:379–423.

Soares, RP; Macedo, ME; Ropert, C; Gontijo, NF; Almeida, IC; Gazzinelli, RT; Pimenta, PF; Turco, SJ. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 121, n. 2, p. 213-224, 2002.

Soares, RP; Turco, SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. An Acad Bras Cienc. 2003 Sep;75(3):301-30. Epub 2003 Aug 25. Review. Erratum in: An Acad Bras Cienc. 2003 Dec;75(4):441.

Stamper, LW; Patrick, RL; Fay, MP; Lawyer, PG; Elnaiem, DE; Secundino, N; Debrabant, A; Sacks, DL; Peters, NC. Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. PLoS Negl Trop Dis. 2011.

Stierhof, YD; Bates, PA; Jacobson, RL; Rogers, ME; Schlein, Y; Handman, E. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. Eur J Cell Biol 1999; 78:675-89.

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

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

Teixeira, CR; Teixeira, MJ; Gomes, RB; Santos, CS; Andrade, BB; Raffaele-Netto, I; Silva, JS; Guglielmotti, A; Miranda, JC; Barral, A; Brodskyn, C; Barral-Netto, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8346-53.

Terra, WR, 1990. Evolution of digestive systems of insects. Ann. Rev. Entomol. 35, 181-200.

Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect on sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infect Immun 1991; 59:1592-8.

Titus, R; Ribeiro, J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science 239: 1306-1308, 1988.

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

Titus R, Mbow M. The vasodilator of *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary glands exacerbates infection with *Leishmania major* in mice. *FASEB J*, 1999; 13(Pt 2, Suppl S): A970.

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

Valenzuela, J; Belkaid, Y; Garfield, M; Mendez, S; Kamhawi, S; Rowton, E; Sacks, D; Ribeiro, J. Toward a defined anti- *Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342, 2001.

Volf P, Kiewegova A, Nemeč A. Bacterial colonization in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica* 2002, 49: 73-77.

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

Zhou, J; He, Z; Yang, Y; Deng, Y; Tringe, SG; Alvarez-Cohen, L. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio*. 2015;6(1): e02288–e02214.

Walters, LL; Modi, GB; Tesh, RBM; Burrage, T. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36 (2): 294-314.

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

Walters, LL; Irons, KP; Guzman, H; Tesh, RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1995; 32:711-25.

Wang, Y; Gilbreath, TM; III Kukutla, P; Yan, G; Xu, J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. PLoS One. 2011;6:e24767.

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

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

World Health Organization, 2017. Leishmaniasis: background information. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/en/). Acesso em 07 de dezembro de 2017.