

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Galactosamina influencia a percepção de aminoácidos, reduz a atividade de protease no intestino e aumenta a infecção de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por espécies de *Leishmania*

Tatiana Lima da Silva Fernandes

Belo Horizonte
2018

Tatiana Lima da Silva Fernandes

Galactosamina influencia a percepção de aminoácidos, reduz a atividade de protease no intestino e aumenta a infecção de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por espécies de *Leishmania*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Coorientador: Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo

Belo Horizonte

2018

AGRADECIMENTOS

O mundo da pesquisa é um mundo apartado, bem diferente do mundo em que vivia antes...é intrigante, desafiador, por vezes desanimador, mas nobre, muito nobre. Todos em busca de respostas, de produzir conhecimento para o bem comum, independente da área. Finalizar este trabalho não foi fácil. Muitas coisas aconteceram no meio do caminho...os desafios foram diversos, mas VENCI. E como cresci como pessoa, como profissional. E gostaria de agradecer primeiramente....

A Deus, pela vida, pela oportunidade de poder continuar estudando, e pelo cuidado, ao colocar pessoas especiais no meu caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, na pessoa do coordenador Prof. Ricardo Fujiwara.

À Sumara e Sibebe, pelo carinho e por não medirem esforços para nos ajudar.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, prof. Maurício, pesquisador altamente qualificado, pela humanidade, por todo ensinamento, firme orientação, compreensão e parceria desde a época do mestrado. Por ter acreditado no meu potencial e por ter me amparado nos momentos em que os motivos pessoais supervenientes surgiram. Tenho muito orgulho em citá-lo com um dos responsáveis pela minha formação acadêmica. O senhor é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Obrigada por preocupar não somente com a execução do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Perdão pelas vezes que falhei e pelas minhas limitações. Que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

Ao meu coorientador, prof. Nelder, chefe do laboratório, pessoa sensata, tranquila e sempre disponível. Pela agradável convivência e pelas ricas discussões. Por me tranquilizar nos momentos de desânimo e pela maneira peculiar que nos conduziu ao raciocínio, abdicando das respostas prontas. Dizer que sou aluna dele ou membro do laboratório, 'abriu várias portas'. A ele, minha admiração, meu respeito e gratidão.

Aos professores Ricardo Nascimento e Marcos Horácio, também professores do Laboratório, pela participação direta e indireta neste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos que tive o prazer de conhecer e conviver durante estes anos. Agradeço em especial à Monique, também doutoranda do Programa que contribuiu sobremaneira nos meus experimentos, me orientando e me auxiliando.

À turma do Naldo, pela parceria desde a época do mestrado, e que mesmo parecendo distante, sabia que poderia contar. Em especial à Dra. Débora Aloise, colega de turma, docente da UFRN, por compartilhar conhecimento, experiência e pela amizade.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Aos técnicos do laboratório: Márcia e César, sem os quais a condução das nossas pesquisas seria impossível.

À Fiocruz Minas (Instituto René Rachou), onde desenvolvi alguns experimentos que também foram importantes na conclusão deste trabalho.

À Dra. Ana Flávia, amiga de infância e ex-aluna do departamento, que continuou sendo uma grande incentivadora e motivadora.

A minha amiga do coração, irmã que eu escolhi, Leila. Sei também que ficará orgulhosa com o término de mais um trabalho e que independente de tudo sei que continua torcendo por mim. Mesmo distante, participa ativamente da minha vida e dos momentos importantes. Venci mais essa, amiga.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Alice, pelo amor e grande incentivo aos estudos, que se doaram e renunciaram aos seus sonhos para que eu e meus irmãos pudéssemos realizar os nossos. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. E graças à união de todos, os obstáculos foram transpostos, vitórias conquistadas e alegria divididas. Esse último ano não foi fácil. Agradeço pela paciência e compressão com minha ausência durante essa longa jornada. Amo vocês.

Aos meus irmãos Janaína e Carlos; meus cunhados Cícero e Viviane pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Cauan, Arthur e Thainá que são os xodós da família e por me encherem de alegria.

Ao meu marido, Heitor, por continuar sendo o melhor companheiro que eu poderia ter. Sem o seu amor, carinho e cuidado eu não teria conseguido finalizar mais este trabalho. Que, apesar da distância, esteve comigo em todos os momentos, desde o início me ouvindo, me incentivando e apoiando. Por cuidar da nossa filha para que eu pudesse estudar e por sempre me incentivar a melhorar. Quis desistir muitas vezes, e você não deixou. Te amo!

À minha AMADA filha Alice, luz da minha vida, que deu o ar da graça na metade deste trabalho. Foi minha parceira de experimentos e de madrugadas de estudo. Por inundar nossa vida de alegria e nos fazer tomar decisões importantes. Filha, eu renasci com sua chegada. Espero que tenha orgulho do trabalho da mamãe e de tudo que tenho feito por nossa família. Farei de tudo para lhe proporcionar uma boa formação humana e amplo acesso ao conhecimento.

Aos colegas docentes da Faculdade de Medicina da UNEMAT, o qual recentemente tive o prazo de integrar a equipe. Agradeço também aos meus alunos pela troca de experiências.

Aos meus amigos extra-UFMG e familiares que sempre me apoiaram e se orgulharam de mim, mesmo sem saber muito bem o que eu fazia no Doutorado.

A banca por ter aceitado nosso convite.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração e execução dessa Tese.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar”.

(Chico Xavier)

Dedico este trabalho aos meus amados pais.

Irmãos e demais familiares.

Ao meu marido, Heitor, pelo amor, dedicação, respeito e cuidado.

A minha filha, Alice, que deu um sentido especial a minha existência.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses.....	18
1.2 Agente etiológico	23
1.3 Flebotomíneos.....	24
1.4 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> nos hospedeiros.....	27
1.5 Papel da saliva de flebotomíneos e PSG no processo de estabelecimento da infecção de espécies de <i>Leishmania</i> em hospedeiros vertebrados;	31
1.6 Galactosamina como uma molécula manipuladora da fisiologia intestinal de flebotomíneos; 32	
1.7 Enzimas digestivas.....	33
1.8 Via TOR	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS INSETOS UTILIZADOS;	39
4.2 TRATAMENTO DE <i>L. longipalpis</i> COM ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;	39
4.3 AVALIAÇÃO DO USO DO INIBIDOR ESPECÍFICO DA VIA TOR, RAPAMICINA NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. longipalpis</i> ;	39
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS DAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;	40
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMINOPEPTIDASE NAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> ;.....	40
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -GLICOSIDASE NAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> ;	41
4.7 INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR COM IODETO DE PROPÍDIO;	41

4.8	AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;	42
4.9	AUMENTO DA QUANTIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> NO INTESTINO MÉDIO DE <i>L. longipalpis</i> APÓS SUPLEMENTAÇÃO DO REPASTO INFECTIVO COM GALACTOSAMINA; 42	
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA	46
7	RESULTADOS	47
7.1	TRATAMENTO DE <i>L. longipalpis</i> COM ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;	47
7.2	AVALIAÇÃO DO USO DO INIBIDOR ESPECÍFICO DA VIA TOR (RAPAMICINA) NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. longipalpis</i> ;	48
7.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS DAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;	49
7.5	INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR COM IODETO DE PROPÍDIO;	51
7.6	AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DAS FÊMEAS DE <i>L. longipalpis</i> PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;	51
7.7	AUMENTO DA QUANTIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> NO INTESTINO MÉDIO DE <i>L. longipalpis</i> APÓS SUPLEMENTAÇÃO DO REPASTO INFECTIVO COM GALACTOSAMINA; 53	
7.8	AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE N-ACETIL CISTEÍNA NO REPASTO INFECTIVO DE <i>L. longipalpis</i> COM <i>Leishmania</i> E A COMBINAÇÃO COM GALCTOSAMINA.	54
9	DISCUSSÃO	57
10	CONCLUSÕES	68
	PERSPECTIVAS	69
	ANEXOS	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Grau celsius

CFU – *Colony Forming Unit* (Unidade Formadora de Colônia)

DMSO – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

M – Molar

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mg – Miligrama

nm - Nanômetro

µL – Microlitro

MS – Ministério da Saúde

PBS – Solução salina fosfatada

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH – potencial de hidrogênio

PSG - Promastigote Secretory Gel

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

RCF – Relative Centrifugal Force (Força Centrífuga Relativa)

RNA – Ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

SFB – Soro Fetal Bovino

TOR – *Target of Rapamycin*

U – Unidade

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da Leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea no mundo.....	12
Figura 2: Proporção de casos de leishmaniose cutânea em menores de 10 anos e mortes por leishmaniose visceral nas Américas.....	13
Figura 3: Formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	15
Figura 4: Ciclo biológico dos flebotomíneos.....	18
Figura 5: Fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> durante o repasto sanguíneo.....	18
Figura 6: Desenho esquemático do ciclo biológico das leishmanioses.....	21
Figura 7: Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no intestino de uma fêmea de flebotomíneo.....	22
Figura 8: Complexo TOR em fungos e mamíferos	23
Figura 9: Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) por intestino.....	36
Figura 10: Rapamicina reduz a produção de tripsina do intestino médio de <i>L. longipalpis</i>	37
Figura 11: Sangue humano suplementado com Galactosamina reduz o número de ovos de <i>L. longipalpis</i> no interior do abdome das fêmeas.....	38
Figura 12: A Galactosamina reduz a atividade da aminopeptidase de <i>L. longipalpis</i> e aumenta a atividade da α -glicosidase.....	39
Figura 13: Galactosamina não induz a morte celular dos enterócitos de <i>L. longipalpis</i> quando adicionada à alimentação artificial.....	40
Figura 14: Galactosamina reduz a longevidade de <i>L. longipalpis</i> quando adicionada à alimentação artificial.....	41
Figura 15: A suplementação de um repasto infectante artificial com Galactosamina aumenta a carga parasitária e a prevalência de <i>L. longipalpis</i> com <i>L. mexicana</i>	42
Figura 16: A suplementação de um repasto infectante artificial com Galactosamina aumenta a carga parasitária e a prevalência de <i>L. longipalpis</i> com <i>L. infantum</i>	43
Figura 17: N-acetyl-cisteína aumenta a carga parasitária e a prevalência de <i>L. infantum</i> em <i>L. longipalpis</i>	44
Figura 18: A combinação de Galactosamina com N-acetyl-cisteína promoveu a infecção de <i>L. longipalpis</i> por <i>L. infantum</i>	45
Figura 19: Galactosamina reduz a produção de tripsina do intestino médio de <i>L. longipalpis</i>	46

Figura 20: Galactose, N-acetil-galactosamina e glucosamina não foram capazes de induzir a redução da atividade tripsinolítica no flebótomo <i>L. longipalpis</i>	47
Figura 21: Uma mistura de aminoácidos adicionada ao sangue humano anula o efeito da galactosamina de reduzir a atividade tripsinolítica no intestino de <i>L. longipalpis</i>	48
Figura 22: Modelo de trabalho de galactosamina.....	52

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças que constituem um problema de saúde pública, considerando sua alta mortalidade e ampla distribuição geográfica. São endêmicas em mais de 88 países, com uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de casos para as formas tegumentares e 500.000 novos casos de leishmaniose visceral. No Brasil, cerca de 28.000 e 3.000 casos de leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) são relatados por ano, respectivamente. A LV, que é a forma mais grave da doença, é causada por tripanosomatídeos da espécie *Leishmania infantum*, que acomete principalmente o fígado e o baço do hospedeiro vertebrado. *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *L. infantum* nos países americanos e pode ser encontrado desde o México até a Argentina. Machos e fêmeas se alimentam de carboidratos, mas as fêmeas precisam obter um repasto sanguíneo dos vertebrados para a maturação dos ovos. Como *Leishmania* se desenvolve exclusivamente dentro do intestino do vetor, durante a digestão do sangue os parasitos ingeridos terão que sobreviver ao ataque de proteases digestivas. Este estudo teve como objetivo compreender como a Galactosamina (uma hexose aminada) interfere na fisiologia digestiva do flebotômio. Usamos Galactosamina para manipular a fisiologia digestiva de *L. longipalpis* para investigar sua influência na digestão dos flebotomos e no desenvolvimento de *Leishmania* em seus insetos vetores. A Galactosamina foi capaz de reduzir atividade tripsinolítica de *L. longipalpis* de maneira dose-dependente. Este efeito foi específico para a Galactosamina, uma vez que outros açúcares semelhantes não foram capazes de afetar a produção de tripsina dos insetos. Um excesso de aminoácidos suplementado com o repasto sanguíneo mais 15 mM de Galactosamina foi capaz de anular a redução da atividade tripsinolítica causada pela Galactosamina, sugerindo que este fenômeno pode estar relacionado a um comprometimento da detecção de aminoácidos pelos enterócitos de flebotômios. A Galactosamina reduz a produção de ovócitos de flebotômios, causa impacto na longevidade dos flebotomos e reduz especificamente as proteases intestinais de flebotômios, enquanto que aumenta a atividade da α -glicosidase intestinal. Em uma tentativa de aumentar a infecção do intestino médio de *L. longipalpis* por duas espécies de *Leishmania* (*L. mexicana* e *L. infantum*) realizamos infecções artificiais. A administração de 15 e 30 mM de Galactosamina aumentou o número de formas promastigotas de *L. mexicana* e *L. infantum* em insetos tratados com Galactosamina em comparação com seus respectivos controles. Nossos resultados mostram que a Galactosamina influencia a detecção de aminoácidos, reduz a atividade

da protease intestinal e beneficia o crescimento de *Leishmania* dentro do intestino de *L. longipalpis*. Com estes resultados, seria possível desenvolvermos um protocolo de infecção experimental gerando flebotomíneos maçicamente infectados para serem utilizados em desafios de ensaios vacinais, oferecendo um método eficiente de desafio capaz de identificar antígenos vacinais promissores, eliminando formulações vacinais ineficazes antes do gasto com os dispendiosos e demorados testes de campo.

Palavras-chave: Galactosamina, *Leishmania*, *Lutzomyia longipalpis*, infecção, Leishmaniose visceral.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a spectrum of neglected diseases that constitute a public health problem and are endemic in more than 88 countries, with an annual incidence of 1 to 1.5 million cases for the cutaneous forms and 500,000 new cases of visceral leishmaniasis. In Brazil, about 28,000 and 3,000 cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL) are annually reported, respectively. Zoonotic Visceral Leishmaniasis, which is the most severe form of the disease, is caused in the New World by *Leishmania infantum*, which affects the liver, bone marrow and spleen of their vertebrate hosts. *Lutzomyia longipalpis* is the main vector of *L. infantum* in American countries and can be found from Mexico to Argentina. Male and female sandflies feed on carbohydrates, but females need to get a blood meal from vertebrates for egg maturation. As *Leishmania* develops exclusively within the gut of sandfly vectors, during blood digestion ingested parasites will have to survive the onslaught of digestive proteases. This study aimed to understand how Galactosamine (an amino sugar) interferes with sandfly digestive physiology. We used Galactosamine to manipulate the digestive physiology of *L. longipalpis* to investigate its influence on sandfly digestion and *Leishmania* development within their insect vectors. Galactosamine was able to reduce *L. longipalpis* trypsinolytic activity in a dose-dependent manner. This effect was specific for Galactosamine as other similar sugars were not able to affect sandfly trypsin production. An excess of amino acids supplemented with the blood meal plus 15 mM of Galactosamine was able to abrogate the reduction of the trypsinolytic activity caused by Galactosamine, suggesting that this phenomenon may be related to an impairment of amino acid detection by sandfly enterocytes. Galactosamine reduces sandfly oviposition, causes impact on sandfly longevity and specifically reduces sandfly gut proteases while increasing sandfly gut α -glycosidase activity. In an attempt to increase *L. longipalpis* susceptibility to two *Leishmania* species (*L. mexicana* and *L. infantum*) we performed artificial infections. Administration of 15 and 30 mM Galactosamine increased the number of promastigote forms of *L. mexicana* and *L. infantum* in insects treated with Galactosamine compared to their respective controls. Our results show that Galactosamine influences the detection of amino acids, reduces intestinal protease activity and benefits the growth of *Leishmania* within the *L. longipalpis* gut. Collectively, these results will help us to develop an experimental infection protocol to generate massively-infected sandflies to be used in challenges during vaccine trials, as sandfly bite is the ideal challenge to identify

promising vaccine antigens, eliminating ineffective vaccine formulations before spending on the expensive and time consuming field tests.

Key-words: Galactosamine, *Leishmania*, *Lutzomyia longipalpis*, infection, Visceral leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças que constituem um problema de saúde pública, considerando sua alta mortalidade e ampla distribuição geográfica. São causadas por espécies de protozoários flagelados parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (OPAS 2015). Estão entre as vinte doenças mais negligenciadas no mundo e estão presentes principalmente nos países pobres ou em desenvolvimento.

É uma enfermidade em cujo ciclo de transmissão heteroxeno ocorre a interação entre seus insetos vetores, parasitos, reservatórios e hospedeiros. Além disso, os fatores ambientais, sociais, humanos e biológicos fazem essa enfermidade ainda mais complexa (OPAS 2013). As leishmanioses apresentam-se sob formas clínicas diferentes devido à variedade de espécies que acometem a população humana, sendo a Leishmaniose Tegumentar (LT) responsável pelas formas cutâneo e cutâneo-mucosa e a Leishmaniose Visceral (LV) pela forma visceralizante, afetando órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea dos hospedeiros. Esta última refere-se à manifestação clínica mais grave que, quando não diagnosticada e tratada precocemente, poderá evoluir para o óbito em até 90% dos casos (Chappuis, 2007;WHO 2016). O agente etiológico para LV no velho mundo é *Leishmania (Leishmania) donovani*, e *Leishmania (Leishmania) infantum* tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo.

As leishmanioses estão presentes nos cinco continentes e são endêmicas em 88 países. Há pelo menos doze milhões de casos de infecções em todo o mundo e trezentos e cinquenta milhões de pessoas estão em zona de risco de adoecimento (WHO 2016). O último relatório epidemiológico da Organização Mundial de Saúde relata uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de casos para as formas tegumentares; 500.000 novos casos de leishmaniose visceral; estimando-se uma prevalência de 14 milhões de casos e 20 mil óbitos no mundo (WHO 2016). Esses números ainda podem ser subestimados, se for considerado os problemas de notificação de cada país e da subnotificação, considerando que apenas 33 países adotam a notificação compulsória da doença (WHO 2016). A grande maioria (90%) dos casos de LV ocorre no Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (WHO 2016) (Figura 1). Do número global de casos de LC, mais de 70% ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e a República Árabe da Síria (WHO 2016).

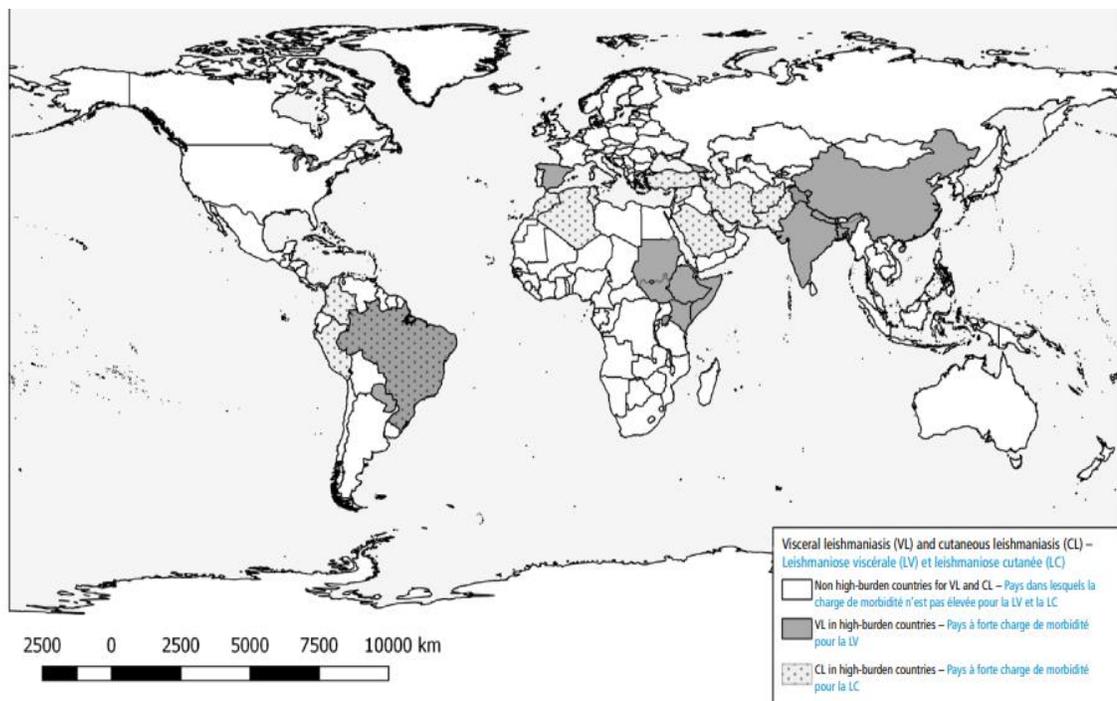


Figura 1: Mapa mostrando a situação de endemicidade das Leishmanioses visceral e cutânea no mundo.
Fonte: WHO, 2016.

Nas Américas, as leishmanioses são doenças com elevada incidência e ampla distribuição geográfica e continuam sendo um desafio para os programas nacionais e regionais porque requerem um grande esforço técnico, operativo e político para manter o desenvolvimento sistemático de ações de vigilância, prevenção e controle destas doenças (OPAS 2018).

Na 16ª Assembleia Mundial de Saúde (2007) emitiu-se a resolução WHA 60.13 sobre o controle das leishmanioses (WHA 2007). Algumas medidas foram recomendadas no sentido de reforçar os programas nacionais de controle, conduzir estudos epidemiológicos mais precisos, melhorar o intercâmbio de informações e ações entre países, para promover a vigilância e o controle da leishmaniose, e melhorar o diagnóstico e a prevenção. Na ocasião também foram indicadas algumas ações prioritárias como: desenvolvimento de novos medicamentos; reforço nas pesquisas para o controle de vetores, reservatórios e proteção do ser humano; melhoria dos métodos diagnósticos; e melhoria do acesso da população sob risco aos sistemas e saúde (Paes 2016). As leishmanioses, sobretudo a forma visceral, têm se expandido para novas regiões, e casos de Leishmaniose Tegumentar Americana e da doença visceral têm sido diagnosticados em visitantes de regiões onde a transmissão da doença é relatada (Alvar et al. 2012, Paes 2016).

Em 2017, os delegados dos países endêmicos, participantes da Reunião Regional de Leishmanioses, aprovaram o Plano de Ação de Leishmanioses nas Américas 2017-2022. O objetivo do plano é reduzir a morbidade e mortalidade por leishmanioses na região mediante o fortalecimento do diagnóstico, tratamento, reabilitação, prevenção, vigilância e controle. O mesmo possui 4 metas regionais que devem ser alcançadas até 2022: 1) reduzir a letalidade por leishmaniose visceral em 50%; 2) reduzir as mortes por leishmaniose cutânea/mucosa em 90%; 3) reduzir a proporção de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos em 50% e 4) reduzir a incidência de leishmaniose visceral, tendo em vista os diferentes cenários epidemiológicos dos países endêmicos (OPAS 2018).

Nas Américas, 96% dos casos de leishmaniose visceral são reportados no Brasil e destaca-se o aumento de mortes causadas desde 2012, período em que esta informação está disponível a nível regional, alcançando em 2016 uma taxa de letalidade de 7,9%, considerada a mais elevada quando comparada a outros continentes (OPAS 2018) (Figura 2).



Figura 2: proporção de casos de leishmaniose cutânea em menores de 10 anos e mortes por leishmaniose visceral nas Américas – 2016. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS.

No Brasil, o principal vetor de LV são flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* e o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico. Nos cães, o parasitismo é abundante nas vísceras e na derme, porém os cães infectados podem permanecer

assintomáticos por um longo período de tempo, servindo como fonte de infecção para o vetor (Laurenti et al. 2013)

A doença se estabeleceu em centros urbanos no Brasil desde o início da década de 80, principalmente devido a migrações internas, à elevada população de cães (reservatório urbano) e à alta adaptabilidade de *L. longipalpis* ao ambiente urbano (Harhay et al. 2011a). Por estes motivos, vem se tornando endêmica e epidêmica em grandes cidades brasileiras. O processo desordenado de ocupação urbana associado à migração, assentamentos urbanos não planejados e saneamento precário leva às condições precárias de vida e destruição ambiental, promovendo condições favoráveis para a reprodução do flebotômíneo. Outros fatores como destruição de habitats, mudanças no padrão demográfico das cidades, costumes, nível socioeconômico, qualidade dos serviços de saúde e educação isoladamente ou em associação, aproximam hospedeiros definitivos, intermediários, vetores e parasitos, determinando mudanças no nível endêmico ou epidêmico de doenças infecciosas (McMichael 2004).

O primeiro caso de leishmaniose visceral na região ocorreu em 1989, em uma criança de dois anos no município de Sabará, limítrofe a Belo Horizonte. E no mesmo ano ocorreu registro de cães soropositivos e presença do vetor (Genaro et al. 1990). Em 1994, foi registrado o primeiro caso autóctone humano de LV na cidade de Belo Horizonte, na regional leste da cidade a qual faz limite com a cidade de Sabará (Oliveira et al. 2001). Mesmo com diversos programas de controle epidemiológico no município, o número de casos humanos e caninos foram aumentando gradativamente. Atualmente, a LV humana ocorre em todo o município de Belo Horizonte de maneira desigual (de Araújo et al. 2013; SMSA-PBH 2016, Marques et al. 2016). Embora o número de casos começou a reduzir em 2008 (Figura 3), o número de óbitos continuou elevado, contribuindo para que as taxas de letalidade no município permaneçam altas quando comparadas a outros centros urbanos do Brasil (de Araújo et al. 2013; SMSA-PBH 2015). Este fato torna Belo Horizonte alvo de estudos que buscam compreender o porquê das elevadas taxas de letalidade.

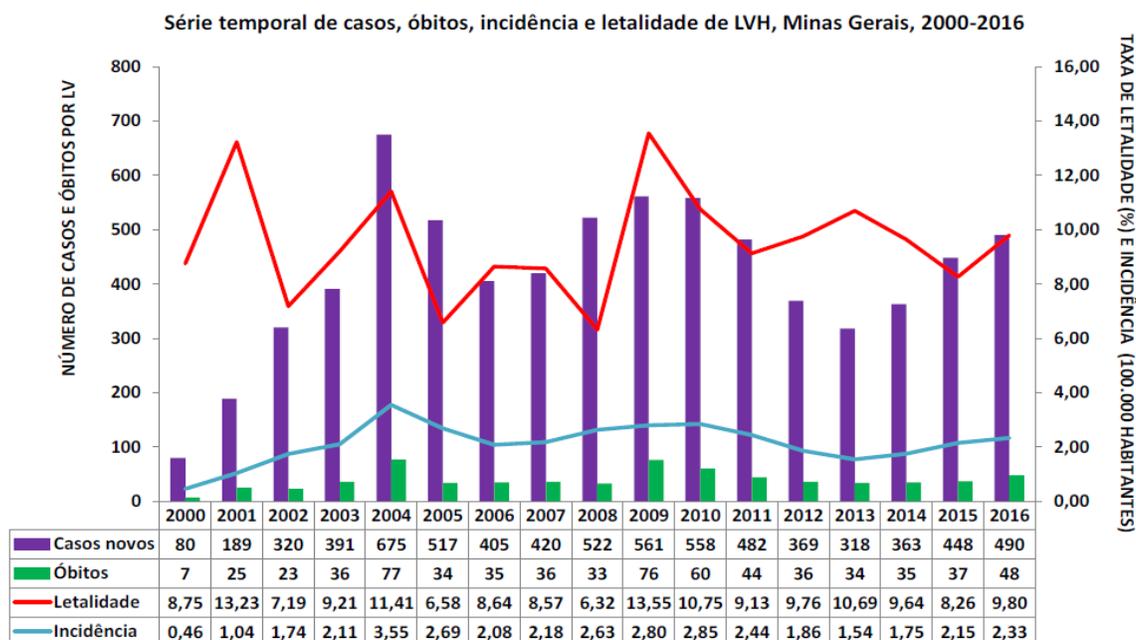


Figura 3: Série temporal de casos, óbitos, incidência e letalidade por LVH em Minas Gerais, 2000- 2016.
Fonte: SINAN/SES-MG

O crescimento do número de casos das leishmanioses nos últimos anos deve ser entendido como o resultado da adaptação dos flebotomíneos em ambientes alterados, onde humanos, animais domésticos e silvestres estão disponíveis como fontes de alimentação alternativas (Lainson & Rangel 2005). Além dos conhecidos fatores biológicos associados à transmissão das leishmanioses (vetor, hospedeiro e parasito) e os fatores fisiogeográficos (relevo, vegetação e clima), as condições socioeconômicas das populações que vivem em áreas de risco vêm assumindo papel importante. Entretanto, as ações antrópicas no ambiente destacam-se como fatores de igual magnitude. Os contínuos desmatamentos das florestas, a construção de empreendimentos hidrelétricos, as migrações, a implantação de grandes projetos agrícolas, as guerras civis e atividades militares são elementos que têm amplificado esse cenário. Alguns pesquisadores dizem que essa expansão geográfica ocorre devido ao “caos ecológico” causado e motivado pelas ações humanas, possibilitando assim um contato mais próximo e estreito com os vetores de patógenos humanos dentre eles, os flebotomíneos, vetores das leishmanioses. Este processo, relacionado com a expansão geográfica da doença em décadas passadas, fez com que as leishmanioses fossem consideradas como zoonoses emergentes ou, em algumas situações, reemergentes (Shaw 1999, Ashford 2000, Paes 2016).

1.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos de LV e LT são protozoários pertencentes à Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e se caracterizam por possuir em seu ciclo de vida duas formas evolutivas básicas: amastigotas e promastigotas (Figura 3). Nos hospedeiros vertebrados são encontradas as formas amastigotas (flagelo internalizado), arredondadas e imóveis (3-6 μm), que se multiplicam obrigatoriamente no interior das células do sistema monocítico fagocitário, principalmente macrófagos. Conforme vão se multiplicando, os macrófagos se rompem, liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. Nos insetos vetores, as formas promastigotas (15-23 μm) vivem no meio extracelular, na luz do trato digestório, onde as formas amastigotas, que foram ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas promastigotas (flagelo externalizado), que posteriormente serão regurgitadas na pele dos hospedeiros vertebrados durante a picada (Bates 2007a).

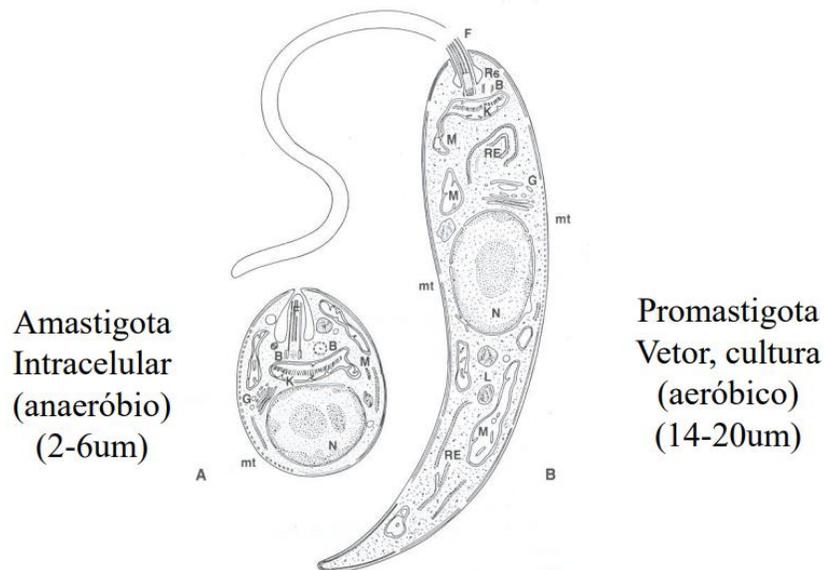


Figura 3: Formas evolutivas de *Leishmania*.

Fonte: <http://lineu.icb.usp.br>

Os agentes etiológicos apresentam uma gama de hospedeiros vertebrados mamíferos tais como canídeos, roedores, edentados (tatu, preguiça, tamanduá), marsupiais (gambás), primatas não humanos e o próprio homem (Brasil 2007). O gênero é subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, baseado no desenvolvimento dos parasitos no interior do aparelho digestório

do inseto vetor. O subgênero *Leishmania* engloba as espécies do Velho e Novo Mundo e o *Viannia* engloba espécies encontradas somente no Novo Mundo (Lainson & Shaw 1987). O desenvolvimento das espécies do subgênero *Leishmania* é restrito ao trato digestório médio e anterior, enquanto que o desenvolvimento das espécies do subgênero *Viannia* mostra uma fase que se passa no intestino posterior (Lainson et al. 1979, Lainson & Shaw 1987, Lainson 2010).

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* incluem cerca de 20 espécies que diferem em sua distribuição geográfica. Sendo que na Ásia, África e Europa, a LT é causada pela *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, e alguns zimodemos de *L. infantum*. Enquanto nas Américas, as espécies mais relacionadas à LT são: *L. braziliensis*, espécie mais prevalente, seguida por *L. guyanensis* (Shaw et al. 1972, Ashford 2000, Lindoso & Lindoso 2009).

É encontrado no Brasil pelo menos sete espécies de *Leishmania* de ambos os subgêneros que são agentes etiológicos de formas tegumentares (Lainson & Rangel 2005). Na região Amazônica encontra-se principalmente cinco espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* que causam lesão cutânea, sendo elas: *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenberg* (esta última mais raramente causa doença humana) e *L. braziliensis*, que apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, e em outros países da América Latina, causando úlceras cutâneas e mucosas, e sendo a espécie mais frequentemente encontrada parasitando o homem (Lainson & Rangel 2005). E no Brasil, *L. infantum* é o agente etiológico de LV.

1.3 Flebotomíneos

Os hospedeiros invertebrados de *Leishmania* são insetos da Ordem Diptera, Subordem Nematocera, pertencentes à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae, conhecidos como Flebotomíneos. Estes são insetos holometábolos, cujo desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estádios larvais e pelo estágio de pupa (Ward 1990, Killick-Kendrick 1999) (Figura 4). São insetos pequenos (geralmente 2 a 4 mm de comprimento), de coloração palha ou castanho e com o corpo coberto por cerdas finas (Figura 5). As pernas e as antenas são longas e finas, possuem voo saltado e quando em repouso mantêm as asas eretas em forma de “V” (Aguiar et al. 1987). As formas imaturas têm habitat terrestre; as larvas são pequenas (< 12mm), claras, vermiformes, possuem grande mobilidade; com capa cefálica escura e esclerotizada. Antes de se transformarem em pupas, as larvas param de se alimentar, excretam todo o conteúdo intestinal e procuram locais menos úmidos, onde se fixam a um substrato. Em seguida, assumem posição ereta, sendo fixadas

ao substrato pela extremidade posterior (Young & Duncan 1994). O ciclo de vida dos flebotomíneos, da fase de ovo até a emergência dos adultos, tem a duração aproximada de 40 dias, podendo variar dependendo das condições de criação. Rangel e colaboradores (1986), por exemplo, observaram um período de desenvolvimento que variou de 28 a 36 dias para *L. longipalpis* e *L. intermedia*, respectivamente, criados em condições de laboratório. A emergência dos adultos ocorre após 7 a 12 dias, com os machos geralmente emergindo antes das fêmeas (Rangel et al. 1986). O dimorfismo sexual entre machos e fêmeas é percebido nas diferenças estruturais da cabeça e genitália.

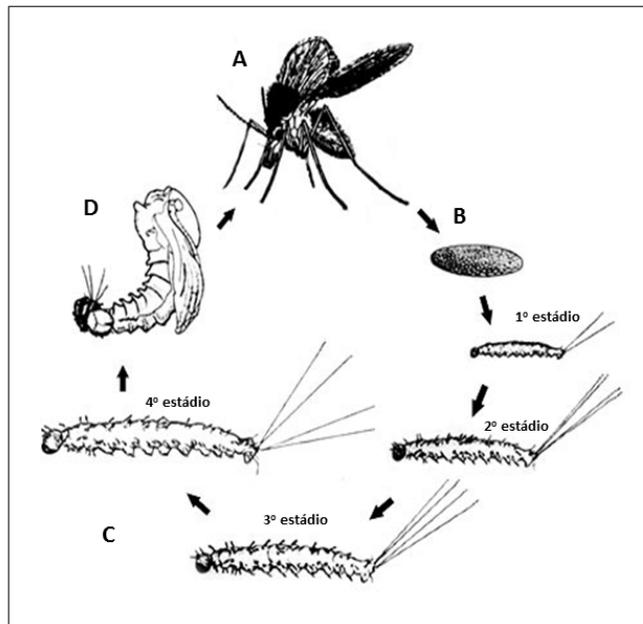


Figura 4 – Ciclo biológico dos flebotomíneos: A- Inseto adulto. B- Ovo com característica forma elíptica. C- 4 Estádios larvais. D- Pupa. Fonte: <http://www.infectionlandscapes.org/2011/05/leishmaniasis.html>



Figura 5: Fêmea de *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo. Foto cedida por Dr. Ray Wilson

Fonte: <https://www.vectorbase.org/image-gallery/Lutzomyia%20longipalpis>

Estes insetos são encontrados sob as mais diversas condições climáticas e de altitude, em ambientes silvestres, rurais e urbanos. São representados por mais de 900 espécies, das quais muitas são importantes vetoras de patógenos humanos (WHO 2010). Nas Américas o gênero *Lutzomyia* é o mais importante, com mais de 500 espécies identificadas, mas destas, pouco mais de 50 estão envolvidas na transmissão da *Leishmania* (PAHO) 2015). Para Galati (2003), além de *Lutzomyia*, são ainda vetores de *Leishmania* nas Américas os gêneros: *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Bichronomyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia* e *Trichophoromyia*. No Brasil, são conhecidas mais de 260 espécies de flebotomíneos, distribuídas em todas as regiões geográficas (Shimabukuro & Galati 2011), mas a maioria são encontradas na bacia amazônica e no nordeste brasileiro.

Além de serem vetores naturais de algumas espécies de *Leishmania*, os flebotomíneos são considerados potenciais vetores de bactérias do gênero *Bartonella* e arbovírus (Shaw et al. 2003). *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *L. infantum* nos países americanos e pode ser encontrado desde o México até a Argentina (Killick-Kendrick et al. 1977, Young & Duncan 1994). Tanto os machos como as fêmeas necessitam de se alimentar de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções açucaradas de insetos parasitos de plantas como fonte de energia (Chaniotis 1974a, Molyneux et al. 1991, Alexander & Usma 1994). A alimentação sanguínea é exercida apenas pelas fêmeas e esse tipo de dieta propicia nutrientes para a maturação do ovário e produção de ovos (Young & Duncan 1994). A digestão do sangue em flebotomíneos é realizada principalmente por serino proteases, como tripsinas e quimotripsinas. Em *L. longipalpis*,

2 tripsinas foram bem descritas: L1tryp2 é constitutivamente expresso, enquanto L1tryp1 é induzido pelo repasto sanguíneo (Telleria 2007). Estes insetos possuem a picada do tipo telmofágico, dilacerando a epiderme e a derme para formar o poço de alimentação constituído por sangue e células. Durante a picada em reservatório susceptível infectado por *Leishmania*, os flebotomíneos ingerem neutrófilos/macrófagos abarrotados com formas amastigotas destes parasitos.

Nos flebotomos, o desenvolvimento da *Leishmania* é restrito ao trato digestivo. Após um repasto infeccioso, os parasitos precisam superar várias barreiras naturais para desenvolver dentro de seus vetores, incluindo a presença da matriz peritrófica, o sistema imune inato dos flebotomos e a secreção de enzimas proteolíticas, principalmente tripsinas (Dostálová & Volf 2012). À medida que a digestão do sangue progride, os parasitos precisam se ligar ao epitélio do intestino médio para evitar a perda da infecção devido à excreção de sangue (Kamhawi 2006a, Dostálová & Volf 2012).

1.4 Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros

Durante a picada das fêmeas infectadas com uma espécie de *Leishmania*, as formas promastigotas metacíclicas, infectantes para os hospedeiros vertebrados são regurgitadas na pele durante a picada juntamente com a saliva do inseto vetor e uma matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos filamentosos denominada de PSG (do inglês “Promastigote Secretory Gel”) (Rogers et al. 2002, 2004). Acredita-se que estas formas promastigotas são rapidamente internalizadas por células fagocíticas. Estudos utilizando-se injeção de *L. major* em camundongos mostraram a capacidade dos neutrófilos de responder rapidamente e fagocitar eficientemente estes parasitos, sugerindo que estas células sejam alvos iniciais eficientes da infecção por *Leishmania* (Peters et al. 2009). Os pesquisadores acreditam que primeiramente os neutrófilos internalizam as formas de *Leishmania* que posteriormente chegariam aos macrófagos, não havendo evidências para a teoria de que os macrófagos contendo *Leishmania* se rompem e são fagocitados por outros macrófagos. Os neutrófilos infectados são posteriormente fagocitados por macrófagos, cronificando assim as infecções em hospedeiros vertebrados.

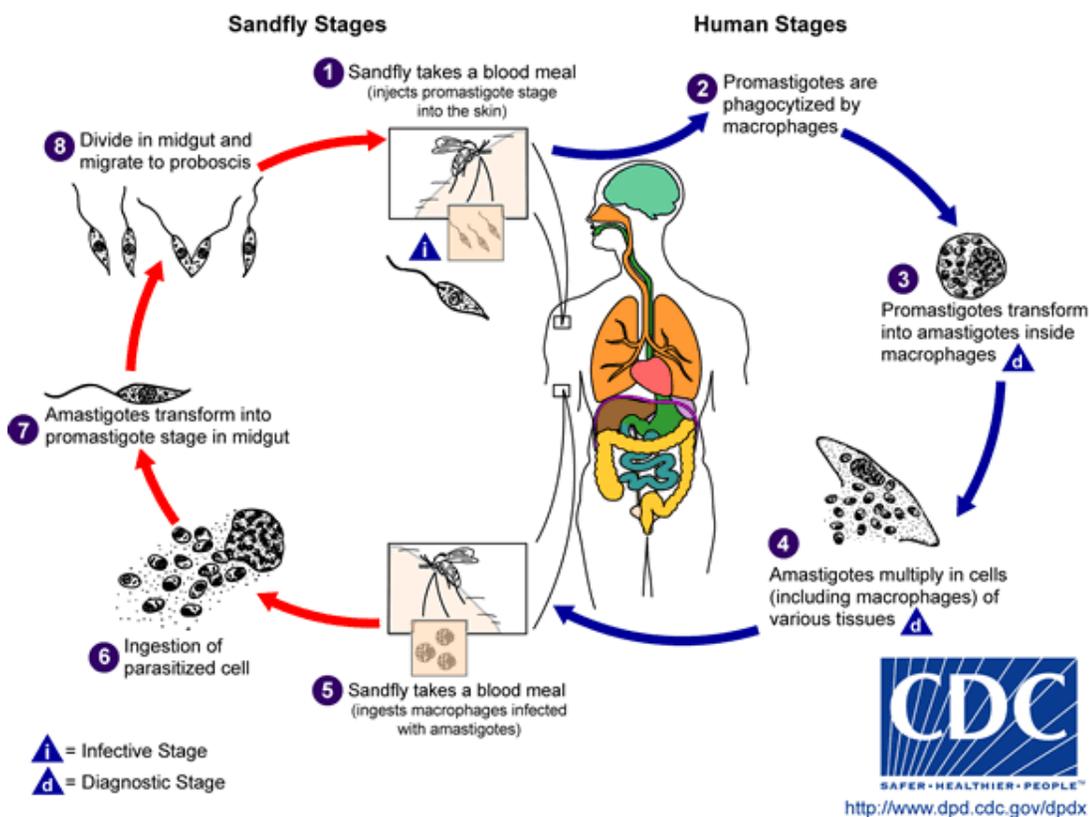


Figura 6: Desenho esquemático do ciclo biológico de *Leishmania* em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx.

O desenvolvimento no inseto vetor é iniciado quando fêmeas de flebotomíneos ingerem sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. A alteração das condições fisiológicas do intestino médio, como a diminuição da temperatura e aumento do pH induzem a transformação morfológica e iniciam o desenvolvimento do parasito no vetor (Dostálová & Volf 2012). As amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, as primeiras formas replicativas que se proliferam no bolo alimentar, sendo separadas do intestino médio do flebotomíneo por uma matriz peritrófica do tipo I (Lehane 2005). Cerca de 48-72 horas mais tarde, as formas promastígotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas longas (formas nectomonadas), as quais escapam do confinamento da matriz peritrófica pela expressão e secreção da enzima quitinase (Rogers et al. 2008), se ligam ao epitélio intestinal através do LPG (lipofosfoglicano) que cobre todo o corpo do parasito, para evitar que sejam expelidas durante a excreção de dejetos originários do final da digestão (Bates 2007b, Dostálová & Volf 2012). Espécies de *Leishmania* pertencentes ao Subgênero *Viannia* (como por exemplo a espécie *L. braziliensis*) diferenciam-se das espécies

pertencentes ao Subgênero *Leishmania* por migrarem primeiro para a região posterior do intestino e aí se ligarem após escaparem da matriz peritrófica. Posteriormente, ocorre a migração para o intestino médio anterior e colonização da válvula do estomodeu, fenômenos essenciais para uma transmissão eficaz (Bates 2007a). Uma vez que os parasitos secretam quitinases que causam danos à quitina que reveste esta válvula, a mesma perde sua função, que é de impedir o refluxo de sangue para o intestino anterior durante a hematofagia (Rogers 2012). Além disso, nesta região, os parasitos transformam-se em outro tipo morfológico denominado formas leptomonadas que, além de continuarem a replicação do parasito secretam uma matriz gelatinosa formada principalmente por proteofosfoglicanos filamentosos denominada de PSG (do inglês “promastigote secretory gel”) que obstrui a região torácica do intestino médio e intestino anterior, mantendo a válvula do estomodeu constantemente aberta (Rogers et al. 2004). Ao mesmo tempo em que ocorre a produção de PSG, a queda de pH e exaustão de nutrientes observados nesta etapa do ciclo evolutivo de *Leishmania* induz a transformação dos parasitos nas formas metacíclicas altamente móveis, com menor tamanho celular e um longo flagelo livre que é regurgitada e liberada na pele do hospedeiro vertebrado durante o novo repasto sanguíneo (Killick-Kendrick 1999, Dostálová & Volf 2012). O dano causado pela secreção de quitinase, aliado à obstrução do tubo digestivo pelo PSG são desta forma responsáveis pela transmissão de espécies de *Leishmania* por flebotomíneos aos hospedeiros vertebrados.

Este processo seria um dos componentes da hipótese batizada por Rogers (2012) de “teoria do bloqueio intestinal” (adaptado do inglês “blocked fly hypothesis”), na qual o bloqueio da porção anterior do tubo digestivo pelo acúmulo da matriz gelatinosa, juntamente com o dano da válvula do estomodeu pela expressão e secreção de quitinase por *Leishmania* seriam fatores determinantes para a dificuldade de fêmeas de flebotomíneos em se alimentar quando estão infectadas por *Leishmania*, ocasionando a regurgitação das formas infectantes na pele do hospedeiro vertebrado.

Os estudos de desenvolvimento de *Leishmania* em seus insetos vetores produzidos até o momento foram realizados a partir de infecções artificiais feitas em laboratório. Após o bloqueio das fêmeas de flebotomíneos pelo PSG, metaciclogênese e regurgitamento de formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, nosso conhecimento terminava neste ponto, uma vez que as formas promastigotas metacíclicas que não se dividem e que não foram regurgitadas em um repasto infectante, ficariam retidas dentro da fêmea do flebotomíneo. Recentemente, estudos feitos por Serafim e

colaboradores (Serafim et al. 2018) mostraram pela primeira vez que formas metacíclicas que não foram regurgitadas em um primeiro repasto infectante são capazes de se re-diferenciar em formas semelhantes às formas leptomonadas, nomeadas neste trabalho de formas retro-leptomonadas. Estas formas retro-leptomonadas são capazes de reassumir a divisão, produzir mais PSG e aumentar significativamente a carga parasitária e o poder de transmissão de *Leishmania* em um segundo repasto infectante. Este trabalho constitui-se, portanto, em um marco para entendermos o que acontece com os parasitos que não são regurgitados no momento da picada infectante e qual é seu desenvolvimento posterior no intestino do inseto vetor quando o mesmo alimenta-se de sangue posteriormente ao repasto infectante.

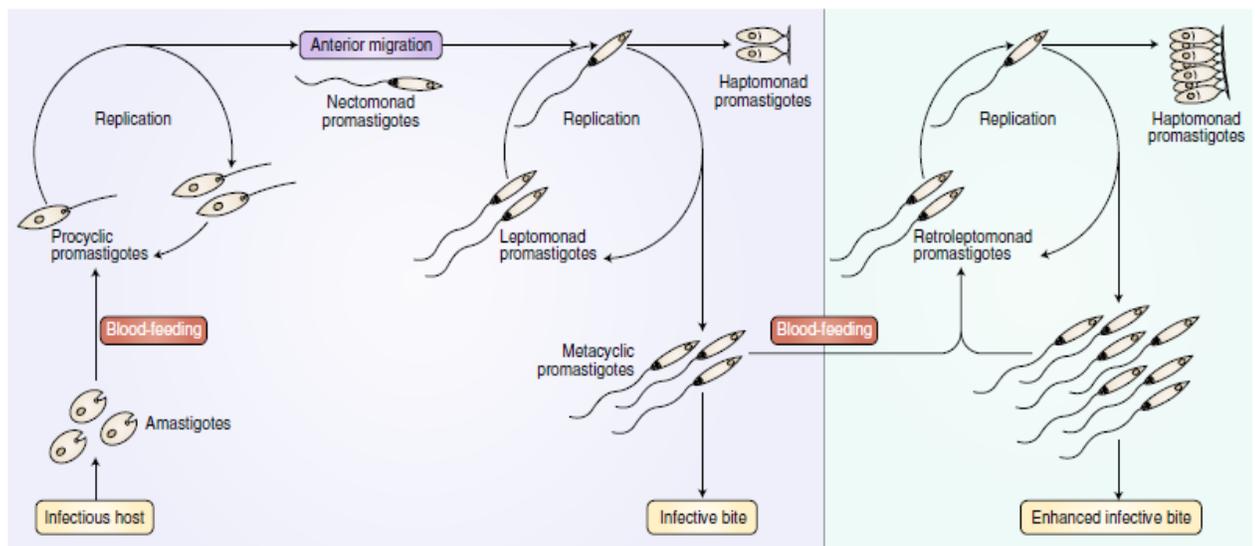


Figura 7: **Desenvolvimento de *Leishmania* no intestino de uma fêmea de flebotomíneo.** As formas amastigotas de *Leishmania* dentro de macrófagos são ingeridas junto com o sangue durante o repasto, sendo este envolto pela matriz peritrófica. As formas nectomonadas de *Leishmania* escapam da matriz peritrófica e se ligam no epitélio intestinal. Posteriormente, as formas nectomonadas migram para o intestino anterior, onde se ligam ao epitélio e colonizam a região anterior do intestino médio, danificando a válvula do estomodeu. Há produção da matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos (PSG) pelas formas leptomonadas e oclusão da porção anterior do intestino médio e intestino anterior. Logo depois, ocorre a metaciclogênese (diferenciação em promastigotas metacíclicos - forma infectiva para vertebrados). O novo ciclo envolvendo promastigotas retroleptomonadas é mostrado à direita, o qual ocorre após um repasto sanguíneo em flebotomíneos infectados, levando a uma população substancialmente aumentada de promastigotas metacíclicos e promastigotas haptomonadas, ambos contribuindo para o aumento da transmissão. Esquema reproduzido de Bates, 2018.

1.5 Papel da saliva de flebotomíneos e PSG no processo de estabelecimento da infecção de espécies de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados;

Atualmente, as medidas de controle para a maioria das doenças transmitidas por vetores concentram-se principalmente no uso de inseticidas de ação residual. Esta medida gera problemas decorrentes da seleção de populações de insetos resistentes a estes inseticidas. O desenvolvimento de vacinas seria uma boa alternativa para solucionar este problema. Parte importante no desenvolvimento e teste de qualquer antígeno vacinal consiste no desafio com parasitas vivos potencialmente capazes de gerar doença. No caso das leishmanioses, trabalhos anteriores mostraram que a presença de antígenos salivares injetados juntamente com formas metacíclicas de *Leishmania* são capazes de exacerbar a infecção por este parasito, quando comparados com desafios sem a presença de saliva (Oliveira et al. 2013). Interessantemente, Belkaid e colaboradores (1998) desenvolveram um “modelo natural” de infecção em que os mesmos foram capazes de tornar a cepa de camundongo C57BL/6, naturalmente resistente à infecção por *L. major*, infectada por este parasito através da injeção concomitante de parasitos com extrato de glândula salivar de *P. papatasi*.

Mbow e colaboradores (1998) associou esta mudança de virulência deste parasito neste hospedeiro ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, com redução na produção de IFN- γ , IL-12 e iNOS. Além disso, Rogers (2012) também discute como o regurgitamento de PSG (do inglês “Promastigote Secretory Gel”) produzido pelo parasita no intestino do vetor, juntamente com a saliva de *L. longipalpis*, pode exacerbar a infecção de hospedeiros vertebrados por espécies de *Leishmania*. Além disso, recentemente Giraud e colaboradores mostraram que o PSG regurgitado juntamente com a saliva e parasitos no sítio da picada é capaz de induzir a ativação alternativa de macrófagos, com indução de expressão da enzima arginase que degrada L-arginina (substrato para iNOS na produção de espécies reativas de nitrogênio que são deletérias para *Leishmania*) e indução da produção de poliaminas que são utilizadas por *Leishmania* em seu metabolismo (Giraud et al. 2018).

A importância da saliva dos flebotomíneos na implantação natural da infecção por diversas espécies de *Leishmania* poderia ser explicada pelo fato da presença de diversas moléculas imune moduladoras (Abdeladhim et al. 2014). De acordo com nossa hipótese, o efeito imune modulador da saliva de flebotomíneos provavelmente foi selecionado ao longo da evolução para evitar que os seus hospedeiros vertebrados desenvolvessem uma resposta

imunológica eficiente contra suas próprias proteínas salivares que os ajudam no processo de alimentação sanguínea, tais como as moléculas anticoagulantes e outras.

Atualmente, os experimentos de desafios vacinais são realizados com injeções de formas promastigotas de cultura. Vários trabalhos da literatura mostram que o curso de infecção de hospedeiros vertebrados desafiados sem saliva de flebotomíneos é muito diferente em comparação com a via natural de infecção onde há a presença de saliva e PSG (Belkaid et al. 1998, Kamhawi 2000, Rogers et al. 2010, Abdeladhim et al. 2014, Giraud et al. 2018). Assim, desafios por picada onde há a presença de saliva, PSG e de formas metacíclicas naturalmente infectantes é de grande importância para desafios experimentais de vacinas.

1.6 Galactosamina como uma molécula manipuladora da fisiologia intestinal de flebotomíneos;

Estudos de fisiologia digestiva de flebotomíneos realizados no passado mostraram que a administração do açúcar aminado Galactosamina juntamente com o repasto infectante para *P. duboscqi* aumentou a taxa de infectividade desta espécie de flebotomíneos por *L. major* (Volf et al. 1998). Os autores discutem neste trabalho que este açúcar aminado provavelmente inibe lectinas no intestino desta espécie de flebotomíneos que aglutinaria parasitos, facilitando o estabelecimento de *Leishmania* no intestino do inseto vetor. Posteriormente, Volf e colaboradores (2001) mostraram que a administração de Galactosamina em flebotomíneos causa mudanças drásticas no processo de digestão. Neste trabalho, a administração de altas doses de Galactosamina (50mM) foi capaz de bloquear a produção de tripsina no intestino de *P. duboscqi*. Esta redução da produção de proteases no intestino de flebotomíneos provavelmente favorece o estabelecimento de espécies de *Leishmania* no intestino do inseto vetor, uma vez que as formas de transição amastigota-promastigota são especialmente sensíveis às proteases digestivas (Pimenta et al. 1997). Entretanto, observou-se também uma alta taxa de mortalidade dos insetos ao se usar uma concentração alta do referido carboidrato, chegando a cogitar uma possível toxicidade do açúcar.

Neste sentido, após vários testes com diferentes concentrações de Galactosamina em *L. longipalpis*, observou-se que as concentrações de 15 e 30mM foram suficientes para reduzir a atividade tripsinolítica, sem, contudo, causar mortalidade excessiva (Lima-Silva 2015). Ainda nesse estudo, para confirmar se o efeito da inibição da atividade tripsinolítica observado para a Galactosamina era também observado para açúcares aminados semelhantes, comparou-se com os seguintes carboidratos: Glicosamina, Galactose, N-acetyl-Galactosamina. Foi concluído que o

efeito de reduzir a atividade tripsinolítica no intestino de flebotomíneos é exclusiva de Galactosamina (Lima-Silva 2015).

1.7 Enzimas digestivas

Durante seu ciclo evolutivo em flebotomíneos, *Leishmania* sofre sua primeira diferenciação ao transformar-se da forma amastigota para a forma promastigotas ainda no interior do bolo alimentar localizado intestino médio do inseto. Durante esta fase de transição os parasitos são sensíveis à ação de enzimas digestivas (Pimenta et al. 1997) e, devido a isto, se beneficiariam de uma redução na atividade proteolítica no intestino do inseto vetor. Como uma das principais funções destas enzimas, entre elas a tripsina, seria a digestão de sangue, um declínio na produção de proteases também levaria a um atraso no processo digestivo, fazendo com que os parasitos tenham mais tempo para acessar os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento.

Além disso, vários trabalhos publicados na literatura ao longo dos anos mostraram que espécies de *Leishmania* são capazes de regular a atividade tripsinolítica no intestino de flebotomíneos. *L. mexicana* foi capaz de modular negativamente a secreção de tripsina por *L. longipalpis* (Sant'anna et al. 2009, Telleria et al. 2010) e, aliado a isto, o número de formas promastigotas de *Leishmania* tendeu a aumentar quando a atividade da tripsina de *L. longipalpis* induzida pelo repasto sanguíneo foi reduzida por RNAi (Sant'anna et al. 2009). Em outro trabalho, a utilização de um inibidor de tripsina de soja (SBTI), aumentou a sobrevivência de *L. donovani* em *P. papatasi*, sugerindo que a redução da produção de tripsina pode favorecer o desenvolvimento dessa espécie de *Leishmania* (Borovsky D 1987). Outros trabalhos mostraram que a *Leishmania* é capaz de modular a atividade tripsinolítica do flebotomíneo. Uma infecção de *P. papatasi* por *L. major* reduziu as atividades de protease alcalina, aminopeptidase e tripsina no intestino do inseto em comparação com controles não infectados (Dillon & Lane 1993a). Em um outro estudo, *L. mexicana* foi capaz de modular negativamente a secreção de tripsina por *L. longipalpis* (Sant'anna et al. 2009, Telleria et al. 2010). Além disso, em *L. longipalpis*, a população de promastigotas de *Leishmania* tendeu a aumentar quando a atividade de tripsina 1 de *L. longipalpis* foi reduzida por RNAi (Sant'anna et al. 2009). Mais recentemente, a infecção de *L. longipalpis* por *L. infantum* reduziu a atividade tripsinolítica no intestino desses flebotomos em comparação com insetos não infectados (Santos et al. 2014).

1.8 Via TOR

A via TOR é considerada um importante sensor nutricional presente em eucariotos, sendo provavelmente uma via conservada em diversos organismos (Figura 8) (Miot 2014). Esta via que possui ramos de ativação distintos que podem ser por via hormonal (insulina) ou por aminoácidos, estimula o crescimento em resposta à disponibilidade de nutrientes. A disponibilidade e presença de aminoácidos direciona a molécula TORC1 para a superfície de lisossomos, local de ativação da via. A maneira como os aminoácidos se comunicam com TORC1 envolve um sistema de sinalização lisossomal composto por Rags (Ras-related GTPases), reguladores v-ATPase, GATOR (GAP activity towards Rags) e complexos de foliculina (FLCN) (Bar-Peled & Sabatini 2014). A ativação desta via estimula a tradução de proteínas através da fosforilação da proteína quinase ativadora RPS6-p70 (S6K) e da molécula repressora eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4E-BP) (Roy & Raikhel 2012).

Em insetos da subordem Nematocera, o envolvimento de TOR na transcrição e tradução de enzimas digestivas foi bem estudado em *A. aegypti*. Em um estudo realizado em nesta espécie de mosquito, a ingestão de aminoácidos por fêmeas induziu a síntese de tripsina concomitante com a fosforilação de duas proteínas pertencentes à via TOR (kinase p70S6 e 4E-BP) (Brandon et al., 2008). Neste artigo, os autores mostraram que a via de sinalização TOR é necessária para que ocorra a tradução do RNA de tripsina em resposta ao aumento da concentração de aminoácidos. No mosquito *A. aegypti*, a digestão do sangue ocorre em duas fases: uma fase que ocorre antes do repasto caracterizada pela transcrição do RNA mensageiro de tripsinas e uma fase mais tardia, caracterizada pela tradução de tripsinas pela ingestão de sangue ou aminoácidos (Brandon et al. 2008a). O início da tradução de tripsinas é pelo menos em parte controlado através da via TOR, que é importante na tradução de proteínas durante a vitelogênese no corpo gorduroso de mosquitos após repasto sanguíneo (Hansen et al. 2005, Park et al. 2006). Em mamíferos, o Class III PI3ks do tipo Vps34 são responsáveis pela ativação da via TOR, regulando a síntese de proteínas em resposta à elevação da concentração de aminoácidos (Backer 2008). É provável que em insetos hematófagos este mecanismo seja conservado e que moléculas como Vps34 reconheçam um aumento na concentração de aminoácidos no intestino, ativando a via TOR e estimulando a síntese de enzimas digestivas.

A via TOR é inibida especificamente por uma molécula chamada rapamicina (um antifúngico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*). A rapamicina é um potente inibidor de ativação da proteína quinase S6K (Chung et al. 1992), sendo utilizada no tratamento de algumas desordens metabólicas onde há ativação excessiva de TOR (Li et al. 2014).

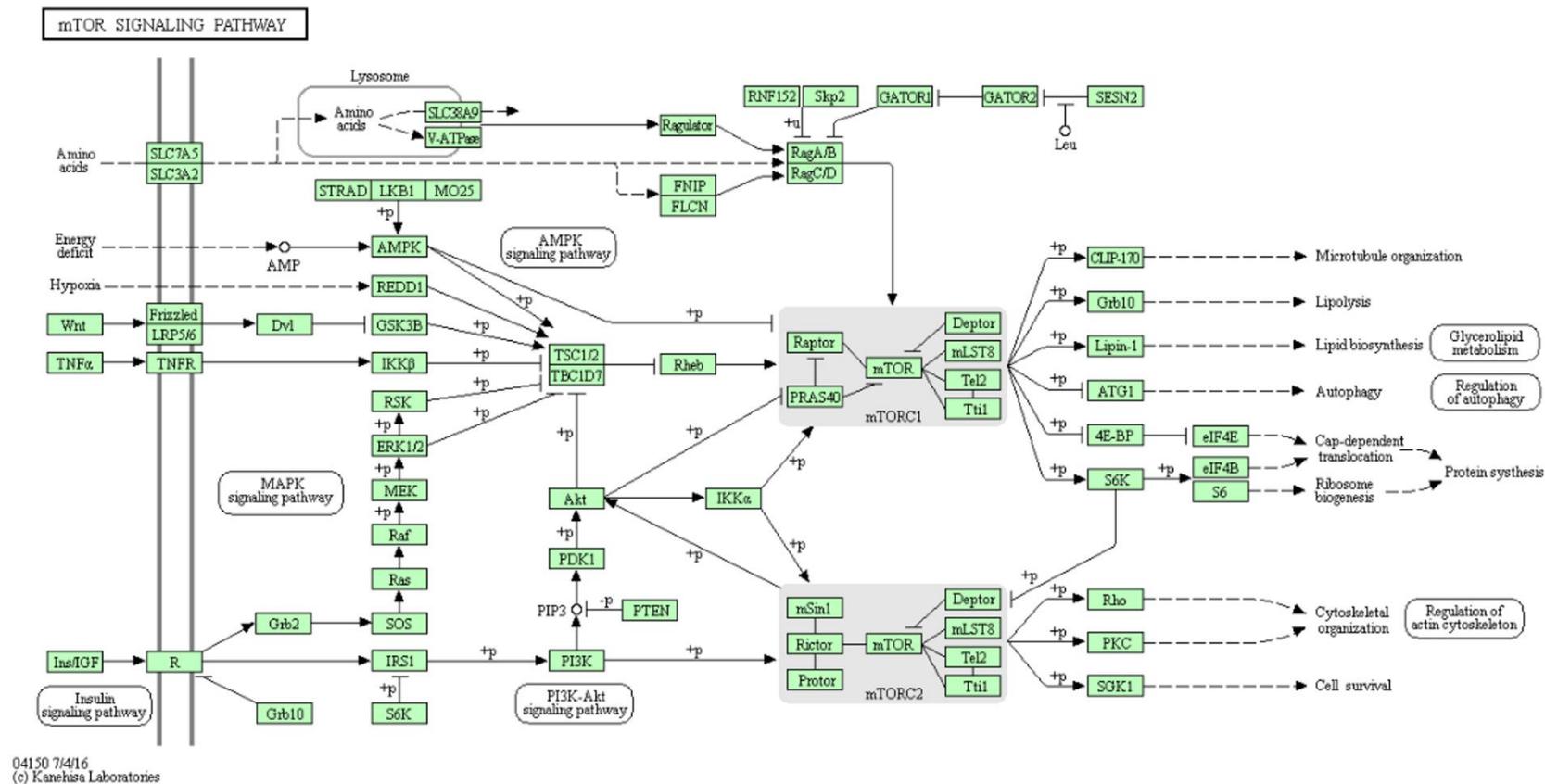


Figura 8: Complexo mTOR com todas as suas vias de sinalização. Fonte: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04150

2 JUSTIFICATIVA

Insetos hematófagos como mosquitos, flebotomíneos e triatomíneos (barbeiros) são vetores de doenças humanas de alta prevalência, tais como a dengue, malária, leishmaniose e a doença de Chagas. A maior parte da população brasileira vive sob risco de transmissão dessas doenças parasitárias transmitidas por estes insetos vetores. A Organização Mundial de Saúde aponta que uma das causas do insucesso no combate a essas doenças é o desconhecimento da biologia destes animais, que limita o desenvolvimento de novas estratégias de combate às populações destes artrópodes. Assim, uma maior compreensão dos diversos mecanismos que permitem a estes artrópodes obter grande sucesso na obtenção de sangue, sucesso reprodutivo e grande adaptação à competência vetorial poderá revelar novos alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle.

Vários trabalhos publicados na literatura têm demonstrado que infecções por *Leishmania* em hospedeiros vertebrados possuem evolução e gravidade muito diferente quando o inseto vetor regurgita o parasito juntamente com saliva e PSG (situação natural de infecção) em comparação com infecções iniciadas por injeção com parasitos resuspendidos em salina estéril ou PBS (Abdeladhim et al. 2014). A geração de flebotomíneos superinfectados com *Leishmania*, com alta proporção de formas metacíclicas (infectivas para hospedeiros vertebrados) seria de grande valia em experimentos de desafio em ensaios vacinais, onde a infecção por *Leishmania* através da picada desferida pelo inseto vetor seria muito mais apropriada. Atualmente, é muito difícil obter fêmeas de *L. longipalpis* infectadas por *L. infantum* em alimentador artificial que tenham um nível de infecção que permita o regurgitamento de formas metacíclicas no hospedeiro durante a picada. Usualmente o número de parasitos se desenvolvendo no intestino é muito baixo o que torna essas fêmeas insetos não transmissores. Considerando estes argumentos, tentamos entender em maior detalhe como o açúcar aminado galactosamina influencia a atividade de protease no intestino da espécie de flebotomíneo *L. longipalpis* (o principal vetor de *L. infantum* nas Américas) e como a suplementação de repastos sanguíneos infectivos com este açúcar aumenta a susceptibilidade desta espécie de flebotomíneo por espécies de *Leishmania*. Esta manipulação da fisiologia digestiva acarretando flebotomíneos com infecções mais exuberantes por *Leishmania* pode ser utilizada futuramente em um protocolo de infecção artificial para gerar flebotomíneos maciçamente infectados para serem utilizados em ensaios vacinais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Manipular a competência vetorial de *L. longipalpis*, principal espécie de flebotomíneo transmissora de *Leishmania infantum* nas Américas com intuito de produzir insetos altamente infectados e capazes de transmitir *Leishmania*.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Entender como a galactosamina interfere na atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*;
- 3.2.2 Avaliar se o inibidor específico da Via TOR (Rapamicina) interfere na atividade tripsinolítica em *L. longipalpis*;
- 3.2.3 Investigar a toxicidade atribuída à Galactosamina em *L. longipalpis*, bem como a influência deste açúcar na produção de ovócitos e sobrevivência do flebotomíneo;
- 3.2.4 Verificar se a redução da atividade tripsinolítica pela Galactosamina aumenta a quantidade de formas promastigotas de *Leishmania* no intestino médio de *L. longipalpis*;
- 3.2.5 Avaliar se a redução da produção de ROS no intestino de *L. longipalpis* facilita a colonização de *Leishmania* neste inseto vetor;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS INSETOS UTILIZADOS;

Em todos os experimentos foram utilizados flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* advindos de uma colônia fechada já estabelecida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG, desde 2008. Esta colônia é mantida em um insetário climatizado, sob condições semi-controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (maior que 80%) dentro de gaiolas de criação. A alimentação dos insetos foi realizada diariamente com solução de sacarose a 30% em algodão hidrófilo e mantidos em fotoperíodo, sendo 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. As fêmeas foram alimentadas semanalmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados com Xilazina e Ketamina (50 mg/mL), de acordo com as exigências determinadas pelo Comitê de ética animal do ICB-UFMG. Esta colônia estabelecida a partir de espécimes coletadas na cidade de Teresina-PI, área endêmica para leishmaniose visceral.

4.2 TRATAMENTO DE *L. longipalpis* COM ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;

Em todos os experimentos, antes da alimentação artificial, grupos de fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram alimentadas desde a eclosão com uma solução de sacarose (30% em água destilada) contendo Penicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), Streptomomicina (70 $\mu\text{g/mL}$) e Gentamicina (10 $\mu\text{g/mL}$). O tratamento dos insetos foi realizado durante quatro dias. Para avaliação da eficácia do tratamento e da redução da microbiota, foram feitas diluições seriadas de pools de 3 intestinos de insetos tratados e não tratados com a mistura de antibióticos; tratados com antibióticos sem Galactosamin e tratados com antibióticos suplementados com Galactosamina 15 mM, seguidas de plaqueamento em meio nutriente LB/ágar e incubação a 37°C por 24 horas. Os resultados foram expressos após a contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFUs) em todos os grupos.

4.3 AVALIAÇÃO DO USO DO INIBIDOR ESPECÍFICO DA VIA TOR, RAPAMICINA NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. longipalpis*;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparizado (0,4 microlitros

por mL). O segundo grupo foi alimentado com o inibidor específico da via TOR, Rapamicina, na concentração final de 10 mM, adicionada a sangue humano heparinizado. Após os respectivos tratamentos, os flebotomíneos foram dissecados em 24 e 48 horas após a alimentação e a atividade tripsinolítica foi medida através de ensaio em leitor de ELISA, utilizando-se o substrato sintético BApNA, solução estoque de 10 mM em DMSO, de acordo com metodologia descrita em Fazito do Vale e colaboradores (2007). Resumidamente: os insetos foram dissecados em salina 0.9% e os intestinos transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 50 µL de salina 0.9%. Em seguida, os intestinos foram homogeneizados por pipetagem e os tubos centrifugados a 14.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Logo após, adicionado o volume de 450 µL para um volume final de 500 µL. Foram utilizadas microplacas para ELISA, com 96 poços. Posteriormente, foram adicionados: 100 µL de tampão Tris 0.1 M pH 8.5; 50 µL do homogenato de intestinos individuais de *L. longipalpis*, 40 µL de salina 0.9% e 10 µL de BApNA 10 mM, para um volume total de 200 µL. Os ensaios foram feitos em duplicatas e as leituras realizadas em leitor de ELISA (Versamax®) a 30°C em modo cinético a 410 nm de 30 em 30 segundos durante 30 minutos com agitação prévia de 5 e 3 segundos entre cada leitura.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS DAS FÊMEAS DE *L. longipalpis* PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparinizado (0,4 microlitros por mL). O segundo grupo foi alimentado com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparinizado. Os intestinos das fêmeas foram dissecados no quinto dia após a alimentação artificial e os ovócitos foram contados e comparados em relação ao grupo controle não tratado.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMINOPEPTIDASE NAS FÊMEAS DE *L. longipalpis*;

A atividade da aminopeptidase do intestino foi medida de acordo com o Fazito do Vale (2007) com modificações. Resumidamente: foram dissecados pools de 5 intestinos de *L. longipalpis* 24 horas após o repasto suplementado ou não com 15 mM de Galactosamina em 500 µL de salina a 0,9% com 5 µL de Triton X100 1%. As amostras foram brevemente sonicadas e

centrifugadas a 4°C por 10 minutos. Para cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 100 µL tampão Tris / HCl 100 mM PH 8, 30 µL de água e 20 µL de 10 mM L-leucina P-NA (substrato da reação previamente dissolvido em DMSO). Após incubação a 30°C por 5 minutos em um leitor de ELISA, o ensaio começou pela adição de 50 µL de amostra (contendo 0,5 intestino), realizando-se um ensaio cinético feito a 415 nm com leituras realizadas a cada 30 segundos por 30 minutos.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -GLICOSIDASE NAS FÊMEAS DE *L. longipalpis*;

As amostras do intestino foram preparadas como descrito no item 4.5 para a atividade da aminopeptidase. Os ensaios foram realizados misturando em tubo Eppendorf 50µL do substrato p-Np- α -D-glucopiranosídeo na concentração de 4 mM dissolvido em água, 20 µL de tampão 0.1 M (MES / NaOH, pH 6), 20 µL H₂O e 10 µL de amostra (equivalente a 0.2 intestino médio). Os brancos foram preparados substituindo as amostras por solução salina 0,9%. As incubações foram realizadas durante 1 h a 30°C e as reações foram interrompidas pela adição de 200 µL de tampão 0,375 M de glicina, pH 10,5. Duzentos microlitros de cada tubo foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorção foi medida utilizando-se um leitor de ELISA a 400 nm. Neste ensaio tipo *endpoint*, utilizamos os intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue suplementado ou não com galactosamina (15 mM), além de um grupo controle extra que se constituiu de insetos apenas alimentados com sacarose 30% via algodão hidrófilo embebido e colocado dentro da gaiola dos insetos.

4.7 INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR COM IODETO DE PROPÍDIO;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparizado (2 U por mL). O segundo grupo foi alimentado com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparizado. O terceiro grupo foi alimentado com Galactosamina adicionada a sangue heparizado na concentração final de 30 mM. Cinco insetos de cada grupo foram dissecados 12, 24 e 36 horas após o repasto em solução salina 0,9%. Cada intestino foi incubado no escuro e em temperatura ambiente com Iodeto de Propídio, na concentração de 3,75 µM e logo após foram registradas 5 fotografias de cada intestino. A presença de células mortas foi monitorada em um Microscópio de fluorescência (Olympus U-PMTVC, Tóquio, Japão) a 590 nm. Os intestinos foram fotografados

utilizando objetiva 10 x e as imagens foram analisadas usando o programa de computador de domínio público feito em Java destinado a processamento de imagens Imagem J, desenvolvido pelo *National Institutes of Health* dos Estados Unidos (NIH). Os arquivos Tiff foram gerados usando a câmera Canon EOS 600D e o software EOS Utility. As imagens dos intestinos foram delineadas usando a ferramenta de seleção à mão livre do programa ImageJ e a intensidade média foi medida descontando-se a fluorescência de background de fundo seguindo a metodologia descrita em Diaz-Albiter e colaboradores (2012).

4.8 AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DAS FÊMEAS DE *L. longipalpis* PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparizado (2U por mL). O segundo grupo foi alimentado com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparinado. A mortalidade das fêmeas foi acompanhada durante trinta dias, e diariamente os insetos mortos eram retirados da gaiola, contados e registrados para posterior análise.

4.9 AUMENTO DA QUANTIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* NO INTESTINO MÉDIO DE *L. longipalpis* APÓS SUPLEMENTAÇÃO DO REPASTO INFECTIVO COM GALACTOSAMINA;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, elas foram alimentadas artificialmente em aparelho Hemotek com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) nas concentrações finais de 15 mM e 30 mM, adicionados ao sangue humano heparinado (2 unidades por mL) juntamente com *L. infantum* e *L. mexicana*. As infecções artificiais por *Leishmania* foram realizadas de acordo com (Diaz-Albiter et al. 2012) com algumas modificações. Resumidamente: os promastigotas de *L. infantum* (BH401) foram mantidos a 26°C em meio de cultura de células de insetos de Schneider e foram repicados até as culturas atingirem a fase de crescimento log. Os promastigotas foram então ressuspensos em 2,0 mL de sangue humano heparinado (2U por mL), reconstituído após a inativação do complemento sérico a 56°C por 30 minutos. Os promastigotas de *L. mexicana* (MNYC / BZ / 62 / M379) e *L. infantum*

(BH401) foram mantidos em crescimento exponencial inicial em meio Schneider (Sigma-Aldrich®) suplementado com soro fetal bovino a 10%, L-glutamina 200 µM, vitaminas BME (Invitrogen), Penicilina (20 UI/Microlitro) e Estreptomicina (0,02 mg/Microlitro). O sangue humano com parasitas foi oferecido as fêmeas na concentração de 4×10^6 parasitas/mL através de alimentadores de pele de pintinho utilizando o aparelho Hemotek® como descrito anteriormente. Os insetos controle receberam somente sangue heparinizado e *Leishmania* na mesma concentração. Após o repasto sanguíneo artificial, os insetos foram mantidos em gaiolas, sendo alimentados com solução de sacarose com antibióticos. No quinto e oitavo dia pós-infecção, os insetos foram dissecados e a contagem de parasitas foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer e a carga parasitária de insetos infectados com *Leishmania* com Galactosamina foi comparada com insetos controle infectados por *Leishmania* sem Galactosamina.

5.0 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE N-ACETIL-CISTEÍNA NO REPASTO INFECTIVO DE *L. longipalpis* COM *Leishmania*;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, as fêmeas foram alimentadas artificialmente em aparelho Hemotek com N-Acetil-Cisteína nas concentrações finais de 1 mM e 2 mM, adicionados ao sangue humano heparinizado (2 unidades por mL) juntamente com *L. infantum* na concentração de 4×10^6 promastigotas por mL de sangue. As infecções artificiais por *Leishmania* foram realizadas de acordo com Diaz-Albiter e colaboradores (2012), e conforme metodologia descrita no item 4.3. Os insetos controle receberam somente sangue heparinizado e *Leishmania* na mesma concentração do grupo experimental. Após o repasto sanguíneo artificial, os insetos foram mantidos em gaiolas, sendo alimentados com a mesma solução de sacarose com antibióticos. No oitavo dia pós-infecção, os insetos foram dissecados e a contagem de parasitas foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer e a carga parasitária de insetos infectados com *Leishmania* com N-Acetil-Cisteína foi comparada com insetos controle infectados por *Leishmania* sem N-Acetil-Cisteína.

5.1 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO ANTIOXIDANTE N-ACETIL-CISTEÍNA E GALACTOSAMINA NO REPASTO INFECTIVO DE *L. longipalpis* com *Leishmania*;

No quarto dia após o tratamento com antibióticos, as fêmeas foram alimentadas artificialmente em aparelho Hemotek. O grupo controle recebeu sangue humano

heparinizado e *Leishmania*, o segundo grupo recebeu sangue suplementado com Galactosamina na concentração de 15 Mm e o terceiro grupo recebeu Galactosamina 15 Mm mais N-Acetil-Cisteína na concentração final de 2 mM, juntamente com *L. infantum* na concentração de 4×10^6 promastígotas por mL de sangue. As infecções artificiais por *Leishmania* foram realizadas de acordo com Diaz-Albiter e colaboradores (2012), e conforme metodologia descrita no item 4.3. Os insetos controle receberam somente sangue heparinizado e *Leishmania* na mesma concentração do grupo experimental. Após o repasto sanguíneo artificial, os insetos foram mantidos em gaiolas, sendo alimentados com a mesma solução de sacarose com antibióticos. No oitavo dia pós-infecção, os insetos foram dissecados e a contagem de parasitas foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer e a carga parasitária de insetos infectados com *Leishmania* com foi comparada com insetos infectados por *Leishmania* com Galactosamina e Galactosamina mais N-Acetil-Cisteína.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o Graphpad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). A distribuição dos dados e a normalidade foram testadas usando o teste de normalidade omnibus de D'Agostino e Pearson. As comparações entre os grupos foram feitas usando ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey (dados com distribuição normal) ou Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn (dados com distribuição não normal). Comparações entre dois grupos com distribuição normal foram feitas usando o Teste t de Student. As análises de sobrevivência foram realizadas por meio do teste de Log-rank (Mantel-Cox) e a prevalência de *Leishmania* em flebotomíneos infectados em comparação com o grupo controle foi feita pelo Teste Exato de Fisher.

6 ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos utilizando animais experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e realizados de acordo com os regulamentos da UFMG (CEUA-UFMG # 121/2018).

7 RESULTADOS

7.1 TRATAMENTO DE *L. longipalpis* COM ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;

Para verificar se o tratamento com antibióticos seria eficaz na eliminação da flora intestinal de *L. longipalpis*, em todos os experimentos, os insetos foram submetidos previamente a um tratamento com uma solução de antibióticos de largo espectro, contendo Streptomicina, Gentamicina e Penicilina. Os antibióticos foram adicionados à solução de sacarose 30%, a qual foi fornecida aos insetos por 4 dias desde a eclosão. A administração de uma mistura de antibióticos de largo espectro juntamente com a solução açucarada foi bastante eficaz, eliminando quase que na totalidade as bactérias cultiváveis do intestino de fêmeas de *L. longipalpis* (figura 9).

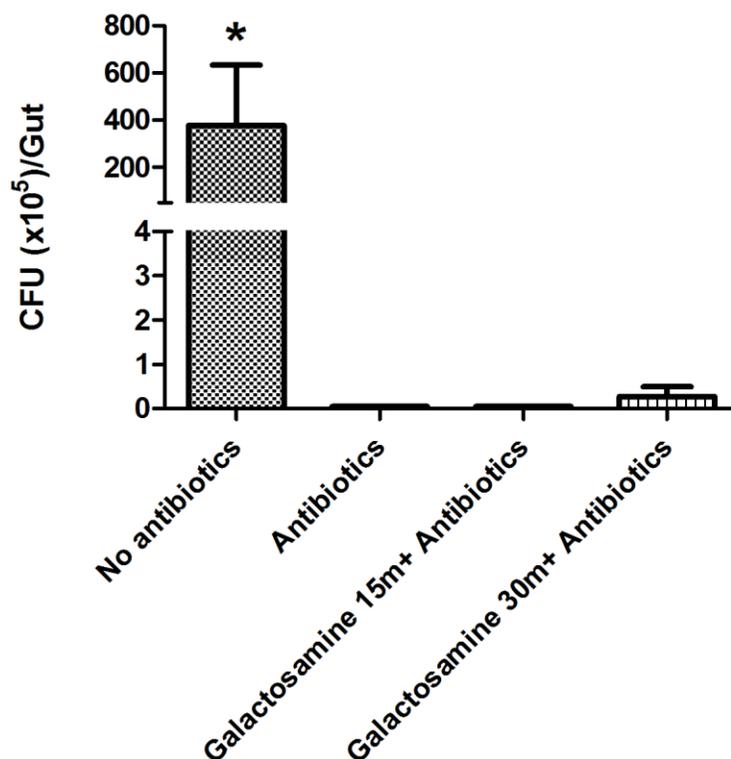


Figura 9: Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) por intestino, obtidas do pool de 3 amostras contendo 3 intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* não tratadas com antibióticos (controle) e insetos tratados com antibióticos, insetos tratados com antibiótico mais galactosamina (15mM) e insetos tratados com antibiótico mais galactosamina (30mM) * representa diferença estatística em $p \leq 0.0001$ (t-test).

7.2 AVALIAÇÃO DO USO DO INIBIDOR ESPECÍFICO DA VIA TOR (RAPAMICINA) NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. longipalpis*;

Para avaliar o possível envolvimento da via TOR na atividade tripsinolítica de flebotomíneos, fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram alimentadas com sangue humano heparizado ou com o inibidor específico da via TOR, Rapamicina, na concentração final de 20 μM , adicionada ao sangue humano heparizado. Após os respectivos tratamentos, os insetos que se alimentaram com sangue heparizado suplementado com Rapamicina (20 μM) apresentaram atividade tripsinolítica significativamente menor do que os insetos que se alimentaram somente com sangue em ambos os tempos avaliados após o repasto sanguíneo artificial (24 e 48 horas) (Figura 10).

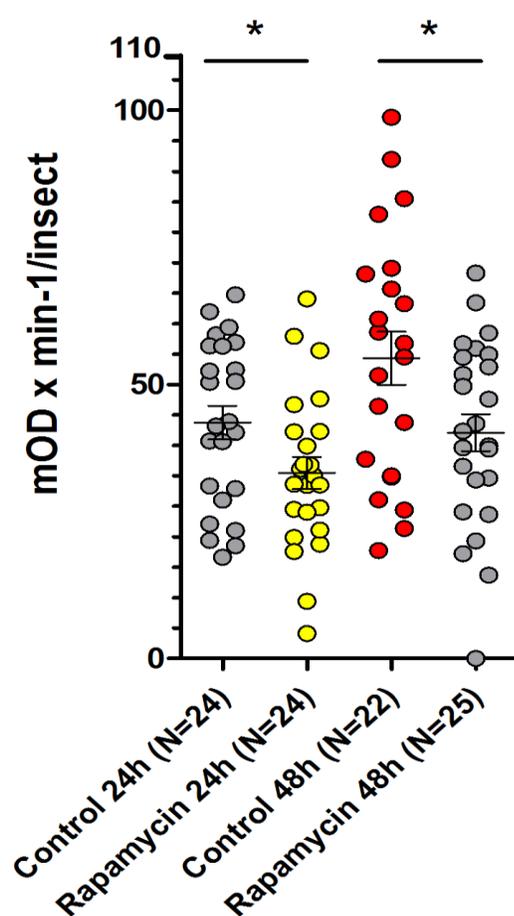


Figura 10: **Rapamicina reduz a atividade tripsinolítica no intestino médio de *L. longipalpis*.** Cada ponto no gráfico indica a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ / inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados às 24 ou 48h após os diferentes tratamentos. Insetos controle foram alimentados somente com sangue humano heparizado. A variabilidade dos dados está representada pela média \pm SEM. * indica diferença estatística em $p \leq 0,05$; (Teste T de Student). Os resultados representam a soma de 2 experimentos independentes.

7.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS DAS FÊMEAS DE *L. longipalpis* PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;

Dois grupos foram selecionados para investigar o efeito da Galactosamina na produção de ovos de *L. longipalpis*. No quarto dia após tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparizado. O segundo grupo foi alimentado com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparizado. Os intestinos das fêmeas foram dissecados no quinto dia após a alimentação artificial e os ovócitos foram contados e comparados. A Galactosamina reduziu o número de ovócitos de *L. longipalpis* quando comparado com insetos controle alimentados apenas com sangue heparizado (figura 11).

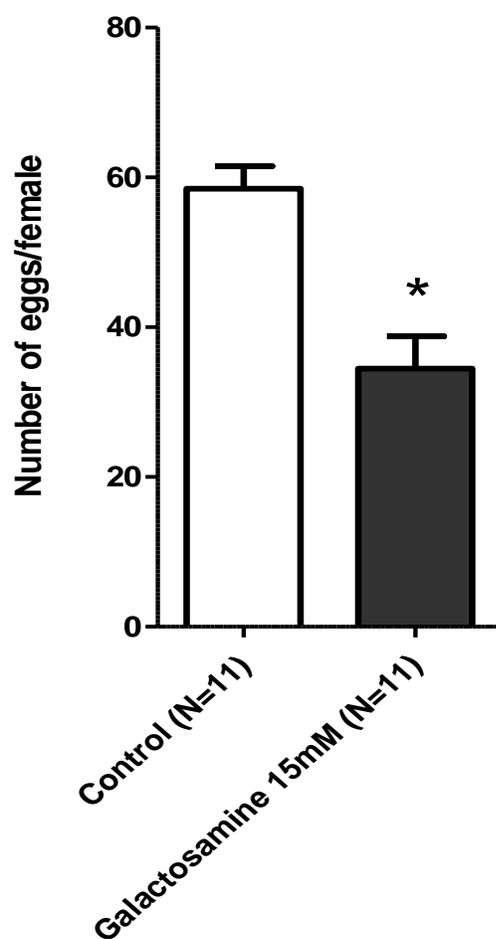


Figura 11: Sangue humano suplementado com Galactosamina reduz o número de ovos de *L. longipalpis* no interior do abdome das fêmeas. A variabilidade dos dados está representada pela média ± SEM *indica diferença estatística em $p \leq 0.05$ (Teste t de Student).

7.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMINOPEPTIDASE E α -GLICOSIDASE NAS FÊMEAS DE *L. longipalpis*;

Para investigar se a galactosamina induz toxicidade inespecífica no intestino de fêmeas de *L. longipalpis*, escolhemos avaliar as atividades de mais uma protease (aminopeptidase) e de uma enzima envolvida na digestão de açúcares (alfa-glicosidade). Os flebotomíneos foram alimentados com sangue humano suplementado com galactosamina e após 24 horas, medimos as atividades de aminopeptidase e α -glicosidase em comparação com controles alimentados com sangue. A galactosamina reduziu significativamente a atividade de aminopeptidase (Figura 12A) da mesma forma observada para tripsinas (Lima-Silva, 2015) enquanto que esta hexose aminada aumentou a actividade de α -glicosidase em comparação com insetos controles alimentados com sangue (Figura 12B).

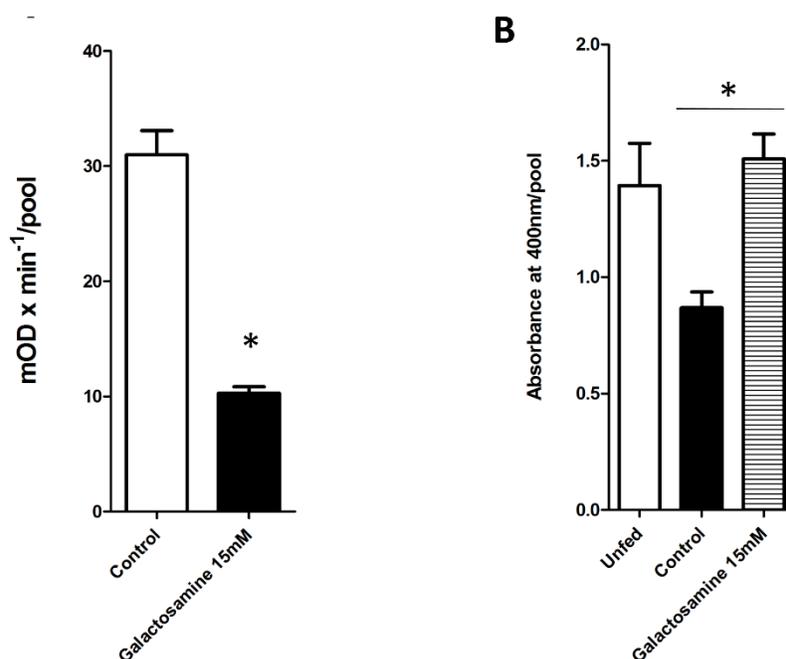


Figura 12: **A galactosamina reduz a atividade da aminopeptidase de *L. longipalpis* e aumenta a atividade da α -glicosidase.** (A) Suplementação de sangue humano heparinizado com 15 mM de galactosamina reduziu a atividade da aminopeptidase em fêmeas de flebotomíneos em comparação com o grupo controle sem galactosamina. (B) A suplementação de sangue humano heparinizado com 15 mM de galactosamina aumentou a atividade da α -glicosidase na fêmea de flebotomíneo em comparação com o grupo controle sem galactosamina. A variabilidade dos dados está representada pela média \pm SEM * indica diferença estatística a $p \leq 0,05$ (Student t-test). Os resultados representam a soma de 2 experimentos independentes.

7.5 INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE CELULAR COM IODETO DE PROPÍDIO;

Para investigar se a Galactosamina exerce alguma toxicidade para os enterócitos de *L. longipalpis*, verificamos se esse açúcar aminado aumentou a mortalidade celular no intestino de insetos tratados em comparação aos controles sem galactosamina. A suplementação da alimentação artificial de sangue com 15 mM de Galactosamina não resultou em mortalidade celular significativa observada através da análise do número de pixels obtidos a partir da análise de imagem no programa ImageJ após a incubação de intestinos de flebotomíneos com o marcador fluorescente de mortalidade celular Iodeto de Propídio (figura 13).

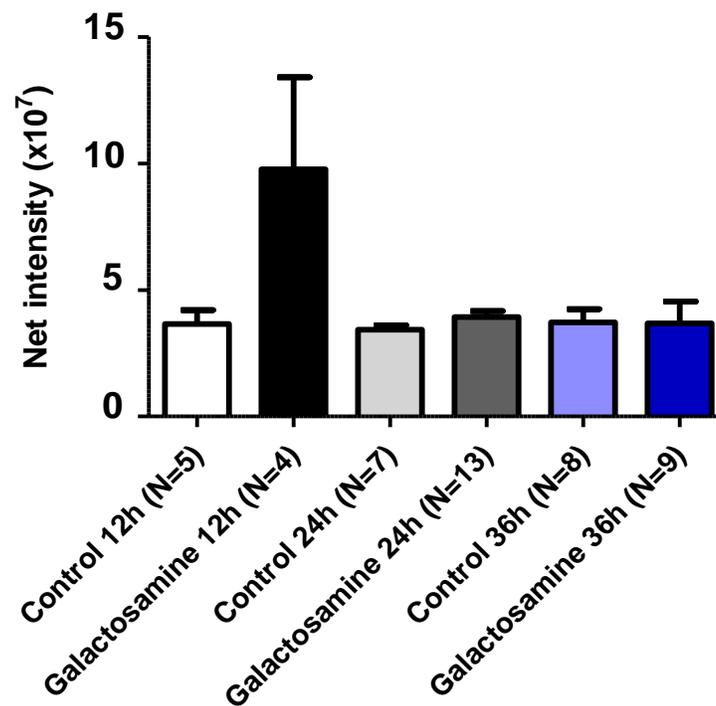


Figura 13: Galactosamina não induz a morte celular dos enterócitos de *L. longipalpis* quando adicionada à alimentação artificial. As barras horizontais significam o número médio de pixels vermelhos observados na imagem capturada em microscópio de fluorescência após incubação dos intestinos tratados ou não com galactosamina em 12, 24 e 36 horas após incubação com o marcador de morte celular iodeto de propídio.

7.6 AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DAS FÊMEAS DE *L. longipalpis* PARA INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ATRIBUÍDA À GALACTOSAMINA;

Para avaliar se a Galactosamina teria alguma interferência na taxa de mortalidade das fêmeas de *L. longipalpis*, dois grupos de fêmeas de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram selecionados. No quarto dia após tratamento com antibióticos, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparinado. O segundo grupo foi alimentado com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparinado. A mortalidade das fêmeas foi acompanhada durante trinta dias, e diariamente os insetos mortos eram retirados da gaiola e contados. Foi observado que a Galactosamina teve um impacto na sobrevivência dos flebotomíneos. Os insetos que foram alimentados artificialmente com sangue humano heparinado suplementado com 15 mM de Galactosamina tiveram uma sobrevivência média de 24 dias em comparação com 28 dias dos insetos controle que foram alimentados somente com sangue humano heparinado (Figura 14).

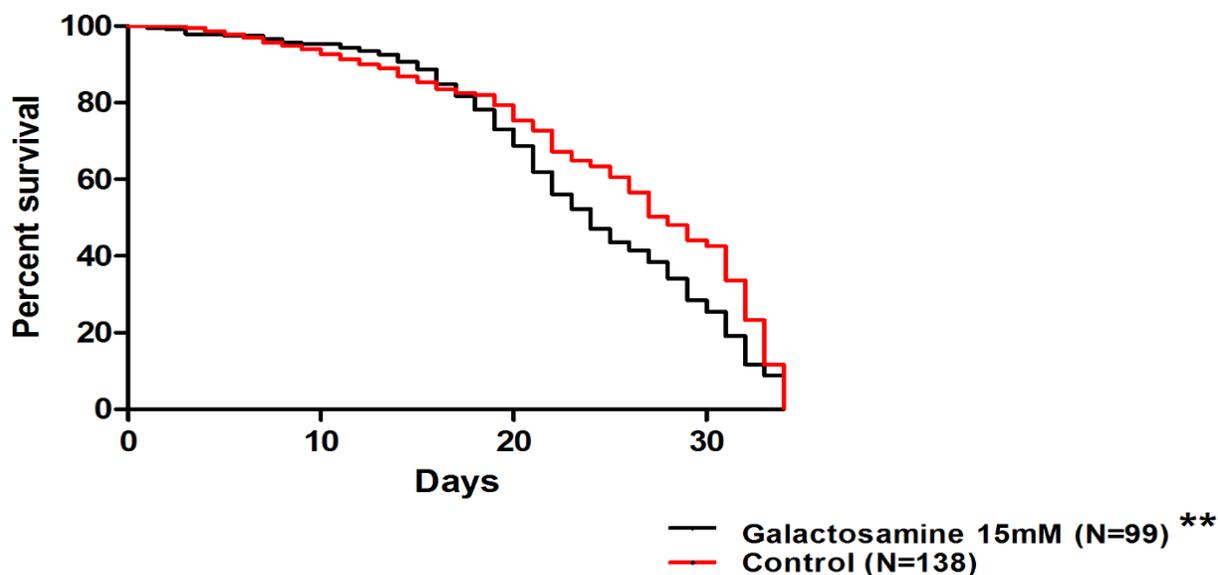


Figura 14: Galactosamina reduz estatisticamente a longevidade de fêmeas de *L. longipalpis* quando adicionada à alimentação artificial, em comparação com o grupo controle alimentado somente com sangue heparinado. O gráfico de sobrevivência foi gerado no programa Graphpad Prism6 for Windows, seguido de análise estatística no mesmo programa feita pelo teste mantel-Cox. ** significa diferença estatística entre os grupos $p \leq 0.0088$.

7.7 AUMENTO DA QUANTIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* NO INTESTINO MÉDIO DE *L. longipalpis* APÓS SUPLEMENTAÇÃO DO REPASTO INFECTIVO COM GALACTOSAMINA;

Usando Galactosamina no repasto infectivo, manipulamos a atividade de proteases no intestino de *L. longipalpis* com o objetivo de aumentar a suscetibilidade à *Leishmania*. Os resultados mostraram que a administração de 15 e 30 mM de Galactosamina foi suficiente para aumentar o número de formas promastigotas e a prevalência de *L. mexicana* (figura 15) e *L. infantum* (figura 16) em insetos tratados com Galactosamina em comparação com controles não tratados.

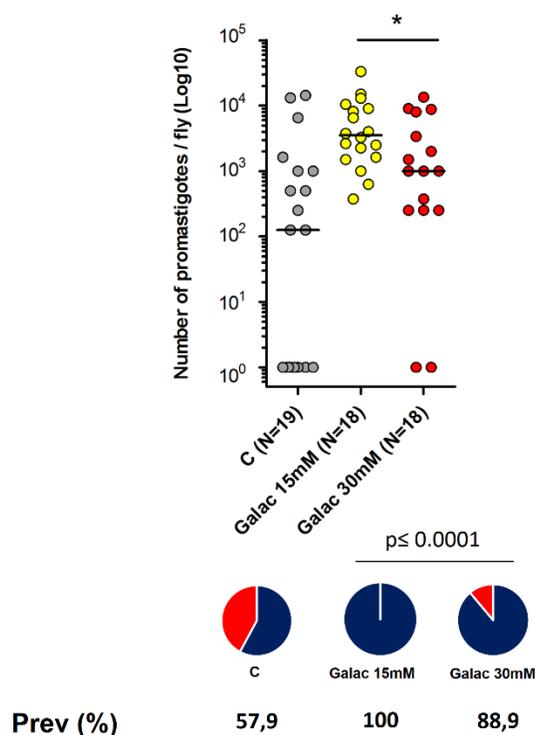


Figura 15: A suplementação de um repasto artificial infectante com Galactosamina (15 e 30 mM, concentração final) aumenta a carga parasitária e a prevalência de *L. longipalpis* com *L. mexicana*. Insetos foram dissecados 5 dias após as infecções artificiais. Os insetos controle foram infectados apenas com sangue humano heparinizado. Cada ponto no gráfico indica o número de promastigotas de *Leishmania* em intestinos individuais de flebotomíneos. Gráficos de pizza representam a prevalência de infecção de flebotomos com *L. mexicana*. Barras horizontais representam diferença estatística usando testes de Kruskal-Wallis seguido por pós teste de Dunn para comparações múltiplas. O Teste Exato de Fisher foi usado para testar diferenças na prevalência de infecção por *Leishmania* entre os grupos. Os resultados representam a soma de 2 experimentos independentes.

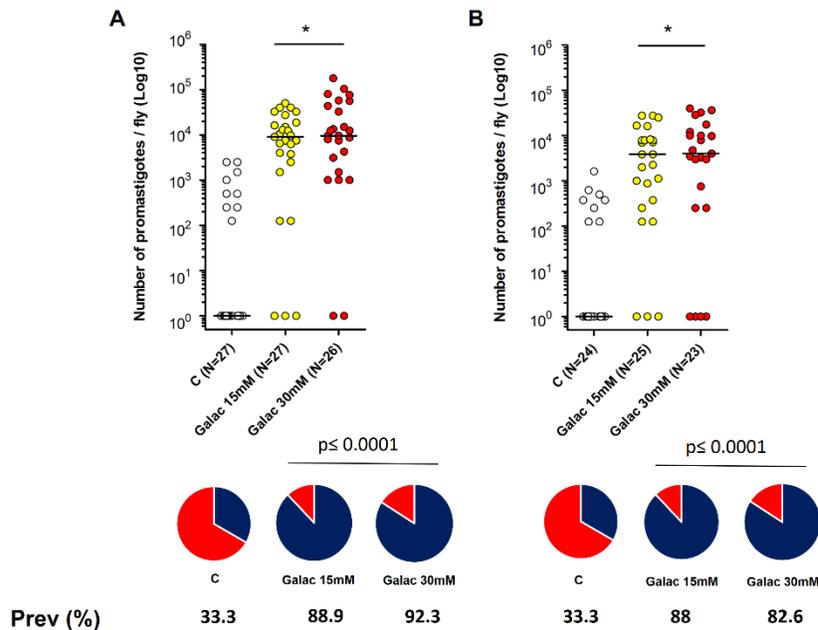


Figura 16: A suplementação de um repasto infectante artificial com Galactosamina (15 e 30 mM, concentração final) aumenta a carga parasitária e a prevalência de *L. longipalpis* com *L. infantum*. Os insetos foram dissecados 5 dias (A) e 8 dias (B) após as infecções artificiais. Os insetos controle foram infectados apenas com sangue humano heparinizado. Cada ponto no gráfico indica o número de promastigotas de *Leishmania* em intestinos individuais de flebotomíneos. Gráficos de pizza representam a prevalência de infecção de flebotomíneos com *L. infantum* (cepa BH401). Barras horizontais representam diferença estatística usando testes de Kruskal-Wallis seguido por pós teste de Dunn para comparações múltiplas. O Teste Exato de Fisher foi usado para testar diferenças na prevalência de infecção por *Leishmania* entre os grupos. Os resultados representam a soma de 3 experiências independentes.

7.8 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE N-ACETIL CISTEÍNA NO REPASTO INFECTIVO DE *L. longipalpis* COM *Leishmania* E A COMBINAÇÃO COM GALCTOSAMINA.

Com o objetivo de aumentar a susceptibilidade de *L. longipalpis* à *Leishmania*, no quarto dia após o tratamento com antibióticos, as fêmeas foram alimentadas artificialmente em aparelho Hemotek com o antioxidante N-acetil-cisteína nas concentrações finais de 1 mM e 2 mM, adicionados ao sangue humano heparinizado juntamente com *L. infantum* (cepa BH401). A redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela N-acetil-cisteína foi capaz de aumentar o número de promastigotas e a prevalência de infecção nos flebotomíneos em comparação com

controles não infectados (figura 17). Uma combinação de Galactosamina (15 mM) e N-acetil-cisteína (2 mM) em uma alimentação artificial infecciosa contendo *L. infantum* aumentou tanto o número de promastigotas de *Leishmania* por inseto quanto a prevalência de infecção, mostrando uma tendência a aumentar a infecção dos flebotomíneos quando ambos os tratamentos foram combinados (figura 18).

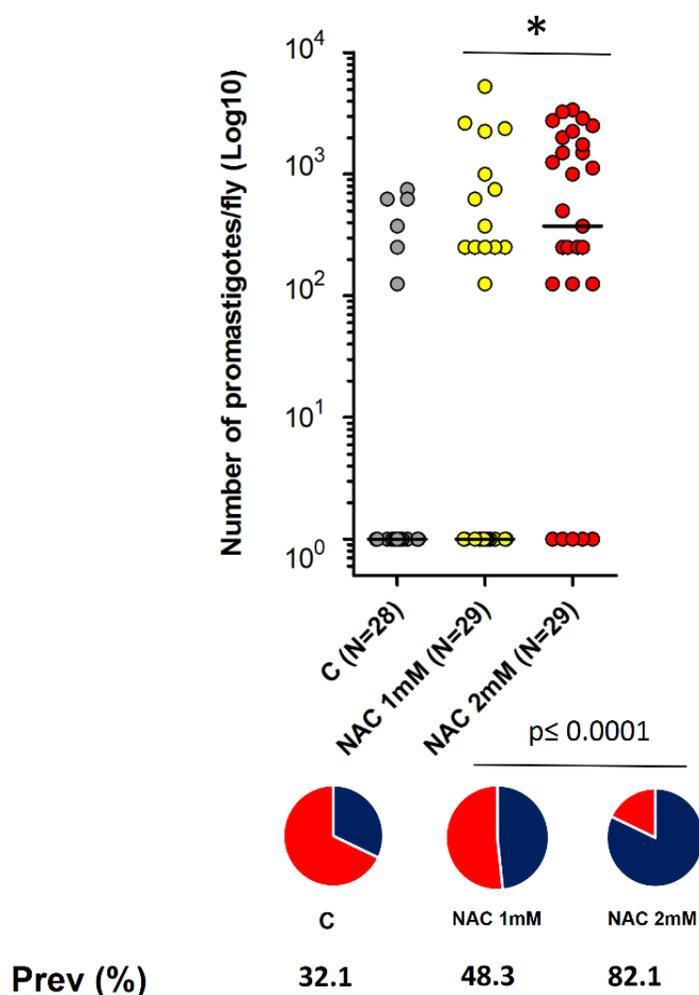


Figura 17: **N-acetil-cisteína aumenta a carga parasitária e a prevalência de *L. infantum* em *L. longipalpis*.** Os insetos foram dissecados oito dias após as infecções artificiais. Os insetos controle foram infectados apenas com sangue humano heparinizado. Cada ponto no gráfico indica o número de promastigotas de *Leishmania* em cada intestino. Gráficos de pizza representam a prevalência de infecção de flebotomíneos por *L. infantum*. Barras horizontais representam diferença estatística usando testes de Kruskal-Wallis seguido por pós teste de Dunn para comparações

múltiplas. O Teste Exato de Fisher foi usado para testar diferenças na prevalência de infecção por *Leishmania* entre os grupos. Os resultados representam a soma de 3 experiências independentes.

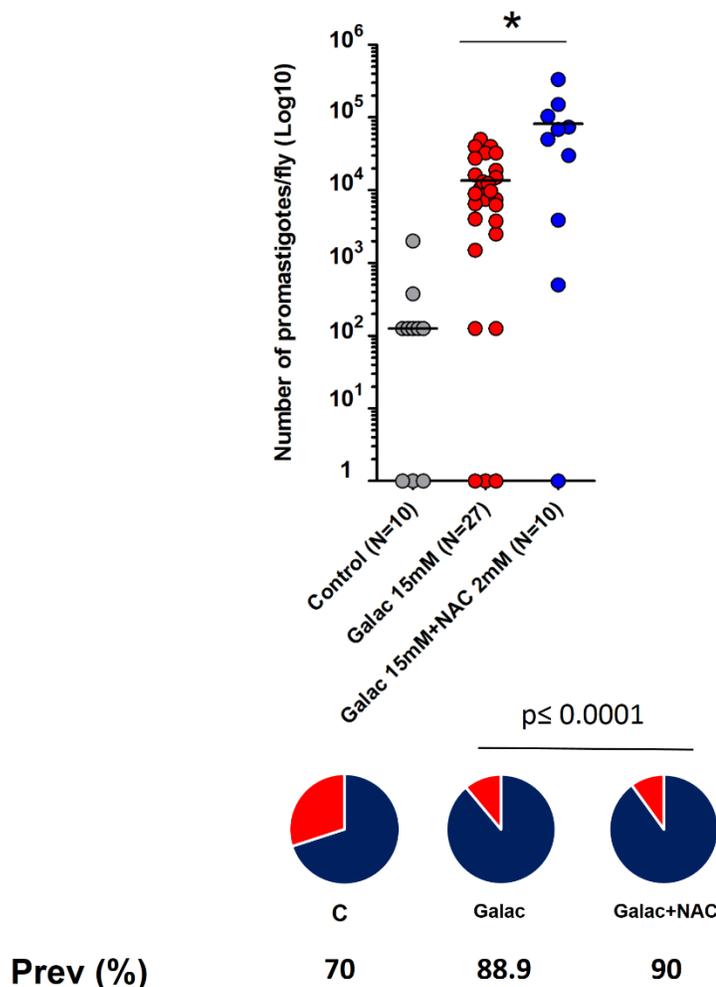


Figura 18: **A combinação de Galactosamina com N-acetil-cisteína promoveu a infecção de *L. longipalpis* por *L. infantum*.** Quando combinadas, a Galactosamina e a N-acetil-cisteína mostraram tendência a aumentar a carga parasitária da infecção de *L. longipalpis* em comparação com o grupo infectado com apenas galactosamina 15 mM. Insetos foram dissecados cinco dias após infecções artificiais. Os insetos controle foram infectados apenas com sangue humano heparinizado. Cada ponto no gráfico indica o número de promastigotas de *Leishmania* em intestinos individuais de flebotomíneos. Gráficos de pizza representam a prevalência de infecção por flebótomos com *L. infantum*. Barras horizontais representam diferença estatística usando testes de Kruskal-Wallis seguido por pós teste de Dunn para comparações múltiplas. O Teste Exato de Fisher foi usado para testar diferenças na prevalência de infecção por *Leishmania* entre os grupos.

9 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores realizados por Volf e colaboradores investigaram o efeito da Galactosamina na digestão do repasto sanguíneo de flebotomíneos. Os autores observaram que este açúcar aminado aumentou as infecções de flebotomos com *L. major*, causando extensas alterações na digestão sanguínea de *P. duboscqi*. A administração de 50 mM de Galactosamina bloqueou as atividades das tripsinas e das proteases alcalinas, enquanto a Galactose não alterou a atividade tripsinolítica da *P. duboscqi* (Volf et al. 1998, 2001). Em uma dissertação defendida no Departamento de Parasitologia da UFMG, mostramos que a Galactosamina reduziu atividade tripsinolítica de *L. longipalpis* (o principal vetor de leishmaniose visceral zoonótica nas Américas) de maneira dose-dependente (Lima-Silva, 2015). Neste estudo, mostramos que a dose de 30 mM de Galactosamina foi capaz de reduzir consideravelmente a atividade tripsinolítica dos flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* 24 horas após uma alimentação artificial (figura 19). Surpreendentemente, essa redução de atividade de tripsina foi específica para Galactosamina, já que outras hexoses similares, como Galactose, N-acetil-galactosamina e a Glicosamina, isômero estrutural de Galactosamina, não tiveram o mesmo efeito quando adicionadas em uma alimentação artificial de *L. longipalpis* (figura 20) (Lima-Silva 2015). Talvez apenas a Galactosamina seja capaz de competir com aminoácidos e se ligar a uma molécula relacionada à via TOR presente nos enterócitos, dificultando a ativação de uma via que impulsiona a expressão de proteases no intestino de flebotomíneos. TOR (Target of Rapamycin) é uma serina / treonina quinase que está envolvida no crescimento celular, resposta de ingestão de nutrientes e estresse (Hansen et al. 2005).

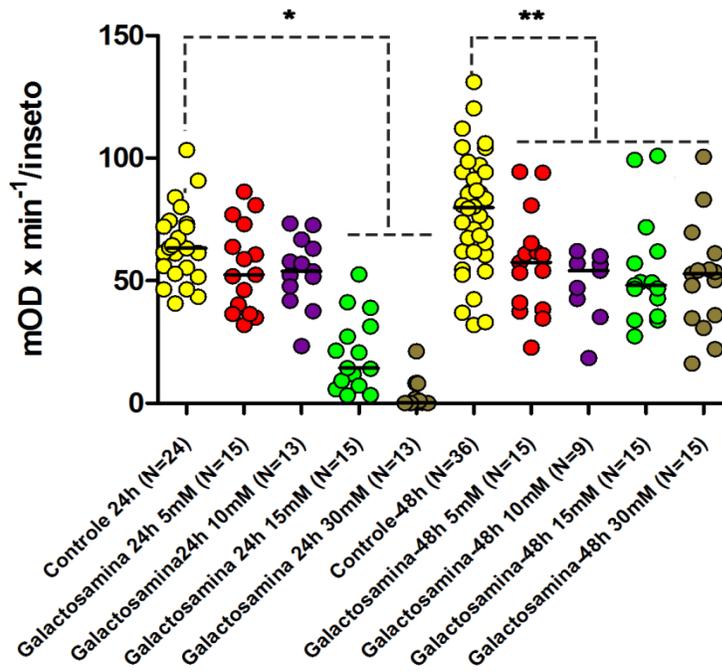


Figura 19: **Galactosamina reduz a produção de tripsina do intestino médio de *L. longipalpis***. Cada ponto do gráfico representa a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados a 24h ou 48h após os tratamentos. Insetos controle foram alimentados apenas com sangue humano heparinizado. Barras transversais representam a mediana. * indica diferença estatística em $p \leq 0,0001$; ** indica diferença estatística em $p \leq 0,0058$ (Mann-Whitney Test). Resultados representam a soma de 3 experimentos independentes. Resultados adaptados de Lima-Silva (2015).

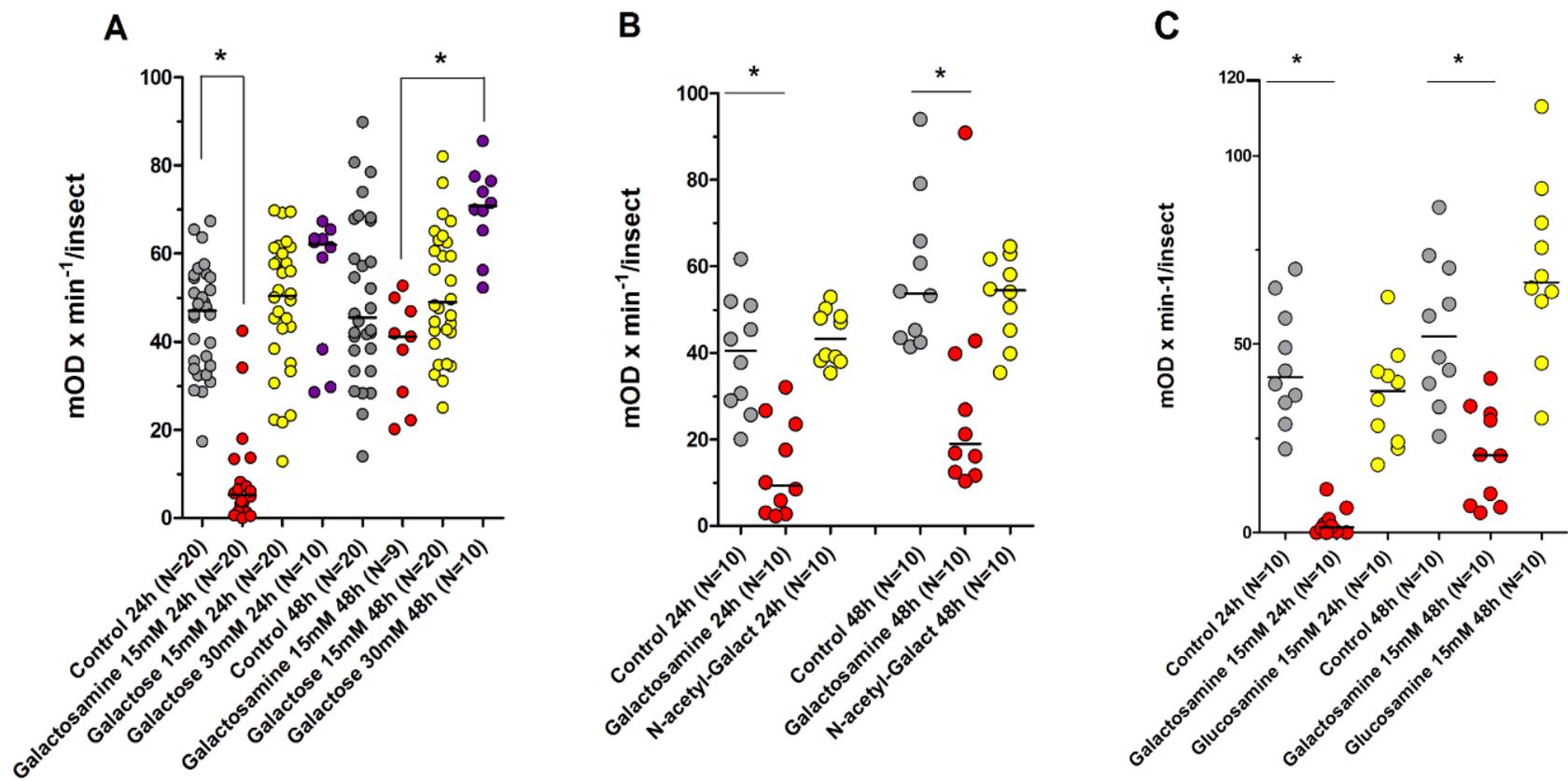


Figura 20: Galactose, N-acetil-galactosamina e glucosamina não foram capazes de induzir a redução da atividade tripsinolítica no flebotômíneo *L. longipalpis*. Cada ponto representa a actividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ / insect) de intestinos de flebotômíneos individuais dissecados 24 ou 48 horas após repasto de sangue artificial contendo sangue heparinizado humano, sangue heparinizado humano mais galactosamina (15 mM) e sangue heparinizado humano mais Galactose (15 e 30 mM) (A), N-acetil-galactosamina (15 mM) (B) ou Glucosamina (15 mM) (C). Barras transversais representam a mediana. * indica diferença estatística em $p \leq 0,05$; (Kruskal-Wallis and Dunn's post test). Resultados adaptados de Lima-Silva (2015).

No mosquito *A. aegypti*, a ingestão de aminoácidos pelas fêmeas induz a síntese de tripsina concomitantemente à fosforilação do ativador de tradução kinase p70S6 e do repressor translacional 4E-BP (duas proteínas pertencentes à via conservada TOR), necessárias para a tradução do RNA da tripsina em resposta ao aumento da concentração de aminoácidos (Brandon et al. 2008a, Roy & Raikhel 2012a). Em nosso trabalho, nós hipotetizamos que a Galactosamina interfere na detecção de nutrientes em flebotomíneos, dificultando a produção de tripsina. Para investigar isto, em um estudo anterior, nós alimentamos fêmeas *L. longipalpis* com sangue humano heparinizado suplementado com 15 mM de Galactosamina e um excesso de aminoácidos (15 e 30 mM) também suplementado com o repasto sanguíneo. Na concentração de 30mM, uma mistura de todos os aminoácidos reverteu a redução da atividade da tripsina observada quando a Galactosamina é suplementada durante as alimentações artificiais dos flebotomíneos (figura 21) (Lima-Silva 2015). A via TOR conservada é a ligação entre a digestão de nutrientes, expressão de tripsina (Brandon et al. 2008a) e oogênese (Carpenter et al. 2012b) em insetos nematóceros sugadores de sangue. Em flebotomíneos, a via TOR parece estar envolvida na produção de tripsina, pois a suplementação de um repasto sanguíneo de *L. longipalpis* com Rapamicina (um inibidor específico da mTOR) (Li et al. 2014) reduziu significativamente a atividade da tripsina em comparação com controles não tratados (figura 10).

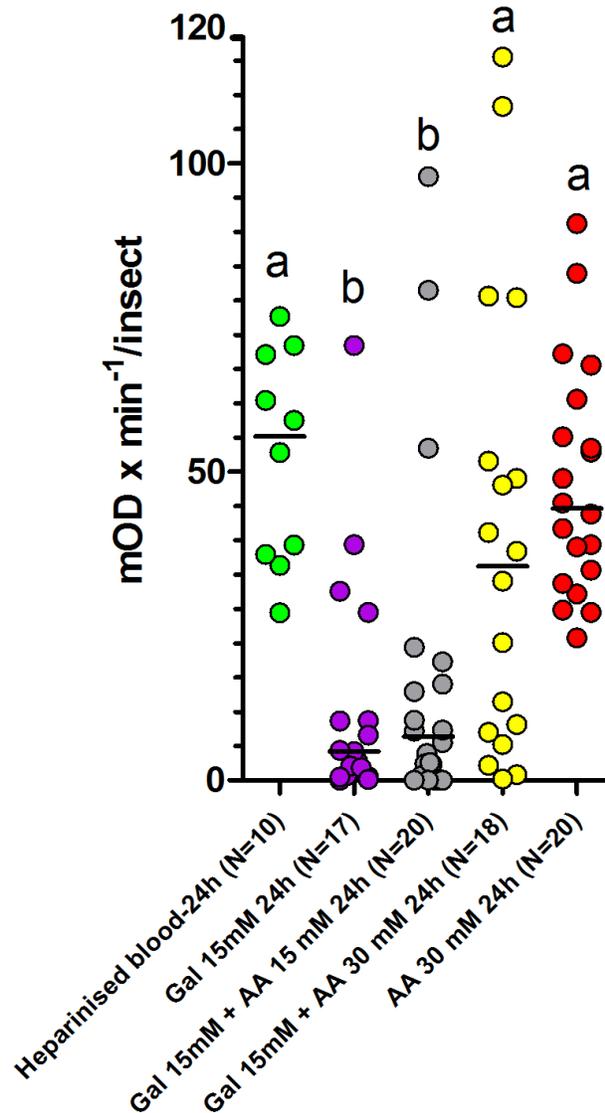


Figura 21: **Uma mistura de aminoácidos adicionada ao sangue humano anula o efeito da galactosamina de reduzir a atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*.** Cada ponto no gráfico indica a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ / inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados 24h após os diferentes tratamentos. Insetos controle foram alimentados somente com sangue heparinizado humano. Para todos os grupos, a significância estatística é representada por letras acima de cada barra, com letras diferentes significando grupos estatísticos distintos (diferença estatística em $p \leq 0,05$ - Kruskal-Wallis and Dunn's post test). Os resultados representam a soma de 2 experimentos independentes. Resultados adaptados de Lima-Silva (2015).

Nos mosquitos, os aminoácidos oriundos da digestão são absorvidos pelo corpo gorduroso para serem convertidos em proteína do ovo durante a oogênese por meio da ativação da via TOR (Carpenter et al. 2012b). A interrupção da atividade da via TOR causa impacto na vitelogênese e

na produção de ovos (Carpenter et al. 2012b). Em flebotomíneos, a Galactosamina adicionada ao repasto sanguíneo reduziu significativamente o número de ovos presentes dentro do abdome de *L. longipalpis* (figura 11) causando um impacto na capacidade reprodutiva deste flebotomíneo.

A Galactosamina é um açúcar que causa citotoxicidade em vertebrados, induzindo a apoptose em hepatócitos (Maes et al. 2016). Este açúcar, por esta razão, é usado em modelos experimentais para indução de hepatotoxicidade para estudar drogas que potencialmente minimizam o dano hepático em hospedeiros vertebrados (Deng et al. 2017, Misawa et al. 2017b). Volf e colaboradores (2001), considerando a citotoxicidade da galactosamina, atribuíram aos possíveis efeitos tóxicos deste açúcar em flebotomíneos o fato de a suplementação de repastos infecciosos com esse composto aumentar a suscetibilidade desses insetos à *Leishmania* (Volf et al. 2001). Em nossos estudos, realizamos uma série de experimentos para investigar o possível envolvimento de Galactosamina no dano intestinal ou na sobrevivência de *L. longipalpis*. As fêmeas de flebotomíneos que receberam sangue heparinizado suplementado com 15 mM de Galactosamina tiveram uma taxa de mortalidade mais elevada (Figura 14), embora sutil, em comparação com os seus respectivos controles que se alimentaram apenas de sangue heparinizado. No entanto, experimentos de microscopia de fluorescência com análise de imagens usando o marcador de morte celular Iodeto de Propídio não detectaram aumento significativo na morte celular com a alimentação de Galactosamina em comparação com insetos controle (figura 13). Como a Galactosamina é tóxica para os vertebrados, Volf e colaboradores (2001) sugeriram que este açúcar teria um efeito tóxico inespecífico sobre os flebotomíneos, especialmente porque a Glicosamina (um isômero da galactosamina) não tem efeito sobre a atividade da tripsina. Para investigar isto, nós suplementamos o repasto sanguíneo de flebotomíneos com 15 mM de Galactosamina e medimos as atividades de aminopeptidase (uma outra protease intestinal induzida pelo repasto sanguíneo) e atividade de α -glicosidase (enzima envolvida no metabolismo intestinal de açúcar) 24 horas após alimentação artificial com sangue heparinizado. Curiosamente, a suplementação com Galactosamina reduziu significativamente a atividade da aminopeptidase dos flebotomíneos (figura 12A), enquanto que este açúcar aumentou a atividade da α -glicosidase em *L. longipalpis* (figura 12B). Coletivamente, esses resultados sugerem que a Galactosamina causa impacto nas proteases do intestino desta espécie de flebotomíneo, em vez de ter uma influência inespecífica na fisiologia do intestino destes insetos, como sugerido anteriormente por Volf e colaboradores (Volf et al. 2001).

Outro fator que provavelmente favorece o estabelecimento de parasitas no intestino de seus vetores seria a eliminação da microbiota residente. Flebotomíneos adultos apresentam baixa longevidade em campo (Casanova et al. 2009). Durante este curto período de vida, as fêmeas precisam fazer um repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado com *Leishmania* e permanecerem vivas tempo suficiente para transmitir o parasito para um hospedeiro sadio. Devido ao hábito hematofágico e ao fato de que flebotomíneos também se alimentam de soluções açucaradas de plantas, é provável que estes insetos adquiram bactérias e leveduras que colonizam plantas e pele de animais dos quais os flebotomíneos se alimentam. Até recentemente muito pouco se sabia sobre a existência do fenômeno de exclusão competitiva em insetos vetores de doenças e sua contribuição na redução da capacidade vetorial destas espécies. No entanto, nos últimos anos, verificamos a publicação de vários estudos descrevendo o efeito da microbiota intestinal na redução da competência vetorial de mosquitos. *Anopheles stephensi* (principal vetor asiático de malária) que sobreviveram à exposição a um fungo patógeno de insetos apresentaram maior resistência à infecção por *Plasmodium* (Blanford et al. 2005). Além disso, alguns trabalhos observaram uma correlação positiva entre a presença de uma microbiota intestinal e a inibição do desenvolvimento de *Plasmodium* no intestino de mosquitos (Pumpini et al. 1996, Gonzalez-Ceron et al. 2003). Recentemente, nosso grupo de pesquisa em colaboração com pesquisadores da UFPI e da Lancaster University no Reino Unido (Sant'Anna et al. 2014) mostraram que a colonização do intestino de *L. longipalpis* com bactérias isoladas do intestino de insetos de laboratório ou de campo reduziram significativamente a população de *Leishmania* no intestino desta espécie vetora de *L. infantum* nas Américas. Entretanto, a necessidade da presença de bactérias durante o desenvolvimento tardio de *Leishmania* no intestino de flebotomíneos foi demonstrado no artigo de Kelly e colaboradores (Kelly et al. 2017), em que os autores mostraram que a eliminação da microbiota em fases tardias de infecção com antibióticos de largo espectro inibiu o desenvolvimento e a metaciclogênese de *Leishmania*.

Nossos resultados podem ser resumidos em um modelo teórico para a influência de Galactosamina em proteases intestinais como mostrado na figura 23. Provavelmente em todos os Dípteros Nematóceros, um mecanismo envolvendo a percepção de nutrientes detecta o aumento na concentração de aminoácidos após um repasto sanguíneo através do sistema TOR. Como os aminoácidos são necessários para a transcrição das enzimas digestivas induzidas por repasto sanguíneo e a Galactosamina é uma molécula aminada igualmente pequena, especulamos que a

Galactosamina compete com os aminoácidos dentro dos enterócitos para a ativação da via TOR. Entretanto, este açúcar não é capaz de ativar esta via para induzir a expressão de proteases induzidas pelo repasto sanguíneo.

Em *A. aegypti*, a digestão sanguínea ocorre em duas fases: uma fase que ocorre antes da refeição caracterizada pela transcrição do RNA mensageiro da tripsina e uma fase posterior, caracterizada pela tradução de tripsinas pela ingestão de sangue ou aminoácidos (Brandon et al. 2008a). O início da tradução da tripsina é pelo menos em parte controlado pela via TOR (Target of Rapamycin), que é importante na tradução de proteínas como a vitelogenina durante a vitelogênese no corpo gorduroso dos mosquitos após um repasto sanguíneo (Carpenter et al. 2012b). É provável que em insetos hematófagos, o mecanismo de reconhecimento de aminoácidos pelos enterócitos seja conservado e alguns complexos integrantes de TOR funcionem como “receptores” de aminoácidos, capazes de reconhecer um aumento na concentração de aminoácidos no intestino, ativando a via TOR e estimulando a síntese de enzimas digestivas.

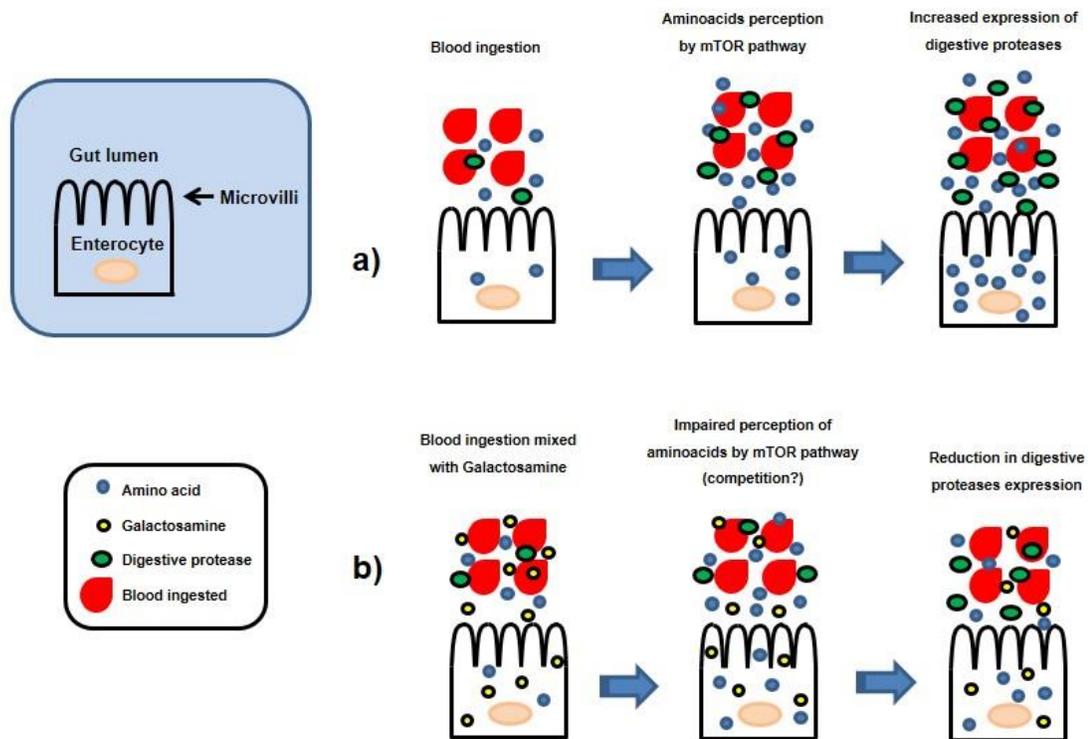


Figura 22: **Modelo de atuação de Galactosamina na atividade proteolítica no intestino de flebotomíneos.** A tradução da tripsina em dípteros nematóceros é pelo menos em parte controlada pela via TOR (Target of Rapamycin), que também é importante para a tradução de proteínas durante a vitelogênese no corpo gorduroso destes insetos após um repasto sanguíneo. O envolvimento da via TOR ativada por aminoácidos para induzir a atividade tripsinolítica em *A. aegypti* foi previamente demonstrado e é provável que esse mecanismo seja conservado entre os dípteros nematóceros (a). Como os aminoácidos são essenciais para a ativação transcricional de enzimas digestivas, especulamos um mecanismo de competição exercido pela galactosamina com aminoácidos em enterócitos de flebotomíneos na ativação da atividade de enzimas proteolíticas. Em nossos experimentos de competição, a adição de 30 mM de aminoácidos ao sangue humano suplementado com 15mM de galactosamina anulou o efeito de galactosamina da redução na atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*. A galactosamina é absorvida por enterócitos de flebotomíneos e compete com aminoácidos por uma molécula ativada por aminoácidos (receptor?), prejudicando a transcrição de tripsina através da ativação de TOR (b). O envolvimento de TOR na atividade tripsinolítica de flebotomíneos pode ser inferido pela redução na atividade de tripsina de *L. longipalpis* em repasto sanguíneo suplementando com rapamicina (um inibidor específico de TOR).

Parasitas do gênero *Leishmania* vivem exclusivamente dentro do intestino de seus insetos vetores. Durante a transformação de amastigotas arredondadas encontradas dentro de macrófagos em seus hospedeiros vertebrados para os promastigotas replicativos (Bates 2007a), a *Leishmania* é

mais suscetível ao ataque de enzimas digestivas, especialmente tripsinas (Pimenta et al. 1997). Mais recentemente, Pruzinova e colaboradores (2018) forneceram evidências de que as proteases digestivas exercem um efeito indireto em promastigotas de *Leishmania* ao aumentarem o estresse oxidativo devido à digestão da hemoglobina. A digestão do sangue gera grandes quantidades de heme, que é uma molécula extremamente reativa, causando danos à membranas, proteínas e DNA (GRACASOUZA et al. 2006). Considerando que a *Leishmania* modula a atividade de tripsina nos flebotomíneos durante o desenvolvimento (Schlein & Romano 1986, Sant'Anna et al. 2009, Telleria et al. 2010), investigamos se a suplementação de Galactosamina aumentava a suscetibilidade de *L. longipalpis* à infecção por *Leishmania*. De fato, a administração de 15 e 30 mM de Galactosamina foi suficiente para aumentar o número de formas promastigotas e a prevalência de infecção de *L. infantum* (figura 16) e *L. mexicana* (figura 15) em insetos tratados com Galactosamina comparados aos respectivos controles. A redução da produção de tripsina no intestino de *L. longipalpis* e o atraso na digestão do sangue gerado pela ingestão de Galactosamina beneficiaram o crescimento de *Leishmania* no interior do intestino, aumentando a carga parasitária dos insetos, com o número de promastigotas por intestino situado na faixa observada em flebotomíneos capazes de transmitir efetivamente *Leishmania* em condições de campo (10^3 a 10^6 promastigotas por flebotomíneo) (Stamper et al. 2011).

De acordo com Pruzinova e colaboradores (2018), proteases intestinais de flebotomíneos não afetam diretamente as formas promastigotas de *Leishmania*. O efeito deletério aos parasitos é provavelmente devido à liberação de heme na digestão do sangue e aumento no estresse oxidativo no intestino dos insetos, causando morte aos parasitos. Isto pode ser confirmado ao analisarmos dados de trabalhos anteriores, os quais demonstraram que o peróxido de hidrogênio é prejudicial ao desenvolvimento da *Leishmania* dentro do intestino de flebotomíneos. A suplementação deste composto pró-oxidante em algodão juntamente com a fonte de sacarose para flebotomíneos previamente infectados por *Leishmania* reduziu significativamente o número de formas promastigotas de *Leishmania* nestes insetos (Diaz-Albiter et al. 2012). Em nosso trabalho, a suplementação de um repasto infectivo com *Leishmania* suplementado com um composto antioxidante aumentou a população de *L. infantum* e a prevalência de *Leishmania* dentro do intestino de *L. longipalpis* (figura 17), confirmando que a modulação de ROS pode auxiliar o desenvolvimento de *Leishmania* em flebotomíneos.

O controle da leishmaniose visceral zoonótica na América do Sul baseia-se na tríade: tratamento de indivíduos infectados, na controversa eutanásia de cães infectados e na utilização de inseticidas de ação residual (Lara-Silva et al. 2017, Vijayakumar & Das 2018). A ausência de uma vacina eficaz com imunidade esterilizadora para controle da leishmaniose visceral tem instigado pesquisadores a buscar novos antígenos para a vacinação de cães, reservatórios urbanos da doença. O desafio vacinal por injeção de formas promastigotas de cultura, embora seja uma forma artificial e não natural por promover uma infecção em hospedeiros vertebrados muito diferente da infecção com curso normal devido à ausência da saliva de flebotomíneos (Abdeladhim et al. 2014) e PSG (Giraud et al. 2018), tem sido amplamente utilizado para validar novos potenciais antígenos para a vacinação. A presença da saliva com suas moléculas imunomoduladoras e de PSG com suas propriedades de ativação alternativa de macrófagos são essenciais para gerar uma infecção eficiente em hospedeiros vertebrados por espécies de *Leishmania*. Para tanto, o desafio vacinal através da picada de flebótomos seria mais apropriado, pois representa o caminho natural para a infecção de vertebrados. No entanto, flebotomíneos artificialmente infectados com infecções maduras são difíceis de obter em laboratório. Em nosso trabalho infecções usando uma combinação de Galactosamina e o antioxidante N-acetil-cisteína aumentou significativamente a susceptibilidade de *L. longipalpis* para *Leishmania* (figura 18). Diante disso, o nosso grupo de pesquisa está atualmente desenvolvendo um protocolo de infecção de *L. longipalpis*, incluindo a inibição de tripsina pela adição de galactosamina e a redução de ROS pela suplementação com N-acetil cisteína para gerar flebotomíneos altamente infectados para serem usados em desafios vacinais contra *L. infantum*.

10 CONCLUSÕES

- A suplementação de um repasto sanguíneo de *L. longipalpis* com Rapamicina (um inibidor específico da mTOR) reduziu significativamente a atividade da tripsina em comparação com controles não tratados;
- A Galactosamina adicionada ao repasto sanguíneo reduziu significativamente o número de ovos presentes dentro do abdome de *L. longipalpis*, causando um impacto na capacidade reprodutiva deste flebotomíneo;
- A suplementação do repasto sanguíneo com Galactosamina reduziu significativamente a atividade da aminopeptidase dos flebotomíneos, enquanto que este açúcar aumentou a atividade da α -glicosidase em *L. longipalpis*;
- Experimentos de microscopia de fluorescência com subsequente análise de imagens usando o marcador de morte celular Iodeto de Propídio não detectaram aumento significativo na morte celular intestinal em insetos que receberam repasto sanguíneo artificial com a suplementação de Galactosamina (15 mM) em comparação com insetos controle;
- As fêmeas de flebotomíneos que receberam sangue heparinizado suplementado com 15 mM de Galactosamina tiveram uma taxa de mortalidade mais elevada em comparação com os seus respectivos controles que se alimentaram apenas de sangue heparinizado;
- A administração de 15 e 30 mM de Galactosamina foi suficiente para aumentar o número de formas promastigotas e a prevalência de infecção de *L. infantum* e *L. mexicana* em insetos tratados com Galactosamina comparados aos respectivos controles;
- A suplementação de um repasto infectivo com *Leishmania* suplementado com o composto antioxidante N-acetil-cisteína (2 mM) aumentou a população de *L. infantum* e a prevalência de *Leishmania* dentro do intestino de *L. longipalpis*;
- Uma combinação de Galactosamina (15 mM) e N-acetil-cisteína (2 mM) aumentou significativamente a susceptibilidade de *L. longipalpis* para *Leishmania*.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho tem como perspectiva a utilização de parte da metodologia aqui apresentada para a manipulação da fisiologia digestiva de *L. longipalpis*, como a redução da atividade tripsinolítica pela suplementação do repasto sanguíneo com galactosamina e redução do stress oxidativo em repasto infectante de flebotomíneos pela suplementação com o antioxidante N-acetil cisteína, na geração de um protocolo para obter flebotomíneos maciçamente infectados com *L. infantum*. Juntamente a estas metodologias, utilizaremos por exemplo um composto imunossupressor como a dexametasona em repastos infectivos artificiais para aumentar ainda mais a susceptibilidade de *L. longipalpis* ao parasito. A partir da obtenção destes flebotomíneos maciçamente infectados, iremos comparar sua eficiência de transmissão das formas promastigotas metacíclicas para hospedeiros vertebrados em comparação com flebotomíneos infectados com os procedimentos padrões para enfim patentear este protocolo, que terá o potencial de ser usado corriqueiramente em laboratórios que visam obter flebotomíneos densamente infectados por *Leishmania* para diversos fins experimentais. Em nosso caso, disponibilizaremos a venda destes insetos densamente infectados para laboratórios que testam antígenos vacinais e que queiram fazer experimentos de desafio através de picada. Isso evidencia a aplicabilidade de nossas pesquisas e o seu potencial em inovação.

ANEXOS

Anexo I – Protocolo aprovado CEUA #121/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Manipulação da capacidade vetorial de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)", protocolo do CEUA: 121/2018 sob a responsabilidade de Maurício Roberto Viana Sant'Anna que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/10/2018.

Vigência da Autorização	08/10/2018 a 07/10/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/Inhagem	Hamster / Espécie <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	12
Peso/idade	150g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia - ICB
*Espécie/Inhagem	Hamster / Espécie <i>Mesocricetus auratus</i>
Nº de animais	12
Peso/idade	150g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia

Considerações posteriores:

08/10/2018	Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 08/10/2018. Validade: 08/10/2018 a 07/10/2023 RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.
------------	--

Belo Horizonte, 15/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceuaf/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Anexo II - Carta enviada ao editor da Revista Journal of Biological Chemistry

Belo Horizonte, 10th September, 2018.

To the Editor of Journal of Biological Chemistry

Dear Sir/Madam,

I would like to submit for your appreciation the paper entitled: "Galactosamine influences amino acid sensing, reduces sandfly protease activity and increases *Lutzomyia longipalpis* susceptibility to *Leishmania* species" by Fernandes et al. In this manuscript, we describe how galactosamine (an amino sugar) modulates sandfly gut protease activity, especially trypsin activity. Sandflies are the insect vectors of *Leishmania* species, which cause a spectrum of neglected diseases collectively called leishmaniasis. In the Americas, the most severe form of the disease (visceral leishmaniasis) is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* and is mainly transmitted by the sandfly species *Lutzomyia longipalpis*. During the transformation from round-shaped amastigotes found inside macrophages in their vertebrate hosts to the replicative procyclic promastigotes inside the insect, *Leishmania* is more susceptible to the onslaught of digestive enzymes, especially trypsins.

Here we describe how galactosamine competes with amino acids to hamper gut protease production through the TOR system. In addition, we describe how this gut protease modulation by galactosamine influences sandfly reproductive fitness, survival and ultimately sandfly infectiveness to *Leishmania* species.

Studies about sandfly-*Leishmania* interactions are usually done in the lab through artificial sandfly infections. These artificial infections are not trivial, depending on many factors such as the existence of a well-established sandfly lab colony and trained personnel. Still, sandfly infections in the lab often fail to produce highly infected flies to be used in sandfly-*Leishmania* interaction experiments. The findings of the present work have the potential to generate a protocol to manipulate sandfly gut physiology to produce heavily infected flies, capable to transmit the parasites through the sandfly bite and ready to be used in vaccine trials for visceral leishmaniasis. Therefore, I believe that this manuscript has the potential to provide useful information to researchers from many fields, especially those working on sandflies and *Leishmania* interactions.

Potential reviewers who neither share links nor have published papers with our research group are suggested below:

Dr. Walter Ribeiro Terra: biochemist working on evolution of molecular processes associated with digestion and nutrient absorption in dipteran insects (warterra@iq.usp.br)

Dr. Clélia Ferreira: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function (clfterra@iq.usp.br)

Dr. Paulo Filemon Paoluci Pimenta: expert in sandfly-*Leishmania* interactions (pfppimenta@gmail.com)

Dr. Nágila Francinete Secundino: expert in sandfly-*Leishmania* interactions (nagila@cpqrr.fiocruz.br)

Dr. Fernando Noriega: experience in insect digestive physiology and mosquito physiology (fnoriega@fiu.edu)

I would be most grateful if you kindly refrain from sending this work to Professor Petr Volf from Charles University in Prague and researchers from his research group for revision due to conflict of interest.

I am signing on behalf of all authors, who have revised the manuscript and are in agreement with all aspects of this work. Please do not hesitate to contact me should you require any extra information. I hope that after full peer review, this manuscript will be suitable for publication in Journal of Biological Chemistry.

Sincerely Yours,

Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Mauricio R. V. Sant'Anna Ph.D

Professor Adjunto

Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG

Phone:+5531 3409-2835

Galactosamine influences amino acid sensing, reduces sandfly protease activity and increases *Lutzomyia longipalpis* susceptibility to *Leishmania* species

Tatiana Lima Silva Fernandes^{1†}, Tarcisio de Freitas Milagres^{1†}, Luccas Gabriel Ferreira Malta¹, Adalberto Alves Pereira-Filho¹, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa¹, Leonardo Barbosa Koerich¹, Marcos Horácio Pereira¹, Ricardo Nascimento Araújo¹, Nelder de Figueiredo Gontijo¹, Mauricio Roberto Viana Sant'Anna^{1*}.

From the¹Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Running title: *Galactosamine impacts sandfly blood digestion through TORC*

*To whom correspondence should be addressed: Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; mrvsantanna@gmail.com; Tel +553134092835

† These authors contributed equally to this work

Keywords: Galactosamine, protease, amino acids, TOR, *Leishmania*, *Lutzomyia longipalpis*.

ABSTRACT

In sandflies, males and females feed on carbohydrates but females must get a blood meal from vertebrates for egg maturation. As *Leishmania* grows within the sandfly gut, during blood digestion ingested parasites will have to survive the onslaught of sandfly digestive enzymes. This study aimed to understand how galactosamine (an aminated hexose) interferes with sandfly digestive physiology. We also used galactosamine to manipulate the digestive physiology of *Lutzomyia longipalpis* to investigate its influence on sandfly digestion and *Leishmania* development within their insect vectors. Galactosamine was capable to reduce *Lu. longipalpis* tripsinolytic activity in a dose dependent manner. This effect was specific to galactosamine as other similar sugars were not able to affect sandfly trypsin production. An excess of amino acids supplemented with the bloodmeal plus 15mM galactosamine was able to abrogate the reduction of the tripsinolytic activity caused by galactosamine, suggesting this phenomenon may be related to an impairment of amino acid detection by sandfly enterocytes. Galactosamine reduces sandfly oviposition, causes impact on sandfly longevity and specifically reduces sandfly gut proteases whereas

increasing α -glycosidase activity. In an attempt to increase *Lu. longipalpis* midgut infection by two *Leishmania* species (*Le. mexicana* and *Le. infantum*) we performed sandfly artificial infections. The results showed that administration of 15 and 30 mM galactosamine increased the number of promastigote forms of *Le. mexicana* and *Le. infantum* in galactosamine-treated insects. Our results show that galactosamine influences amino acid sensing, reduces sandfly gut protease activity and benefit *Leishmania* growth within the *Lu. longipalpis* gut.

INTRODUCTION

Members of the family Psychodidae, subfamily Phlebotominae, genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia* are vectors of single-celled parasites of the genus *Leishmania* that causes a spectrum of diseases collectively called leishmaniasis. These insects are commonly named sandflies due to the terrestrial habit of their larvae that feed on soil organic matter (Killick-Kendrick 1999). Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is mainly transmitted in the New World by *Lutzomyia*

longipalpis, which is the urbanised vector of *Leishmania infantum* (Harhay et al. 2011b). Brazil is considered a country of high ZVL burden. In 2014, Brazil alone was responsible for 3453 reported cases, with 43% of the population at risk of ZVL (WHO 2016), which is fatal if not treated (Chappuis et al. 2007).

Sandfly males and females feed on sugar from plant sap, fruits and honeydew from aphids but females need a blood meal for egg maturation (Chanotis 1974b, Schlein 1986). Blood meal digestion in sand flies is mainly performed by serine proteases such as trypsins and chymotrypsins. In the sandfly *Lu. longipalpis*, 2 trypsins have been well studied: L1tryp2 is constitutively expressed, whereas L1tryp1 is induced by the blood meal (Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigão-Farias JR, de Araújo AP & YM 2007). In sandflies, *Leishmania* development is restricted to their digestive tract. After an infective blood meal, parasites have to overcome several natural barriers to develop within their vectors, including the presence of the peritrophic matrix, the sandflies' innate immune system and secretion of proteolytic enzymes, mainly trypsins (Dostálová & Volf 2012). As blood digestion progresses, the parasites need to bind the midgut epithelium to avoid loss of infection due to blood excretion (Kamhawi 2006b, Dostálová & Volf 2012). During their life cycle in sandflies, *Leishmania* species undergo their first differentiation when transforming from macrophage amastigotes found in their vertebrate hosts to the replicative form procyclic promastigotes inside the insect's midgut (Bates 2007b). Previous work have shown that during the amastigote-promastigote transition, the parasites are very sensitive to the onslaught of digestive enzymes (Pimenta et al. 1997). Therefore, *Leishmania* would benefit from a reduction in the proteolytic activity inside the sandfly gut. The use of soybean trypsin inhibitor (SBTI) increased the survival of *Le. donovani* in *P. papatasi*, suggesting the reduction of trypsin production may favour the development of this *Leishmania* species in a vector that does not support its development inside the gut (Borovsky

D 1987). Other work have shown that *Leishmania* is able to modulate the sandfly's trypsinolytic activity. Infection of *Phlebotomus papatasi* with *Le. major* reduced alkaline protease, aminopeptidase and trypsin activities in the gut of the insect compared to uninfected controls (Dillon & Lane 1993b). *Le. mexicana* was able to negatively modulate trypsin secretion by *Lu. longipalpis* (Sant'Anna et al. 2009, Telleria et al. 2010). Moreover, in *Lu. longipalpis*, *Leishmania* promastigote population tended to increase when the activity of *Lu. longipalpis* trypsin 1 (which is blood meal-induced) was reduced by RNAi knockdown (Sant'Anna et al. 2009). More recently, *Lu. longipalpis* infection by *Leishmania infantum* reduced the trypsinolytic activity in the gut of these sandflies in comparison to uninfected insects (Santos et al. 2014).

Previous work done by Volf and coworkers (Volf et al. 1998) showed that galactosamine (an aminated hexosamine derived from the galactose) supplemented to artificial infections increased *P. duboscqi* susceptibility to *Le. major* due to interference with midgut lectins, which are responsible to agglutination and parasite killing at this site. Using the same sandfly-*Leishmania* combination, the same research group confirmed that 50mM galactosamine administered through an artificial blood meal halted blood meal digestion abolishing alkaline protease and trypsin activities, inducing early defecation, reduced oviposition and increased sandfly mortality (Volf et al. 2001). However, this work did not explore how galactosamine halted protease activity and its impact on sandfly gut damage. The purpose of the present study was to investigate in detail the galactosamine influence on sandfly gut physiology and its effect on *Lu. longipalpis* infectivity to *Leishmania* species.

RESULTS

Galactosamine reduces sandfly gut trypsin activity in a dose dependent manner

Previous work investigating the influence of galactosamine on sandfly gut trypsin activity was done using an old world sandfly species. Fifty micromolar galactosamine was enough to completely block sand fly gut trypsin forcing a premature end to blood digestion and sandfly defecation. Here we show that galactosamine was capable to reduce *Lu. longipalpis* trypsinolytic activity in a dose-dependent manner. At 24 hours after an artificial blood feed with heparinised blood (controls) or blood supplemented with different galactosamine concentrations, galactosamine at 15 and 30 mM significantly reduced *Lu. longipalpis* trypsin activity in comparison to flies that fed on heparinised blood only. Forty eight hours after the feed, all galactosamine concentrations tested (5, 10, 15 and 30mM) were able to reduce the sandfly trypsin activity (Fig. 1).

Interestingly, this reduction in trypsin activity was specific to galactosamine as other similar hexoses such as galactose, N-acetyl-galactosamine and glucosamine were not able to reduce the sandfly trypsinolytic activity in the same way observed for galactosamine (Fig. S1). Surprisingly, glucosamine which is a structural isomer of galactosamine was not able to produce the same effect as galactosamine at the same concentration of 15mM (Fig. S1C).

Galactosamine reduction of sandfly trypsin activity is abrogated with excess amino acids

With the aim to understand how galactosamine modulates sandfly trypsin activity within their midguts, we hypothesized that this interference could be linked to amino acid detection, which activates the gut TOR pathway to induce trypsin expression. In mosquitoes, TOR signaling is the nutrient sensor and upstream activator of early trypsin synthesis in the midgut and amino acids function as stimulus for TOR activation. Supplementation of human blood with an excess of 15mM amino acids was not able to abolish the reduction in trypsin activity caused by 15mM galactosamine whereas supplementation with 30mM amino acid abrogated the

galactosamine effect to control levels at 24 hours after the artificial feed. This suggests that galactosamine interferes with amino acid detection by sandfly enterocytes during blood digestion. (Fig. 2).

Rapamycin reduces sandfly trypsinolytic activity

In sandflies, the involvement of the TOR pathway in trypsin activity was suggested with the supplementation of an artificial blood meal with the specific inhibitor of mTOR, rapamycin. Rapamycin (20 μ M final concentration) mixed with heparinised blood reduced *Lu. longipalpis* trypsin activity at 24 and 48 hours after the artificial blood meal in comparison to controls (Fig. 3).

Galactosamine impacts sandfly oviposition and survival but does not induce significant sand fly gut damage

In order to investigate the effect of galactosamine in *Lu. longipalpis* egg production, sandflies were dissected 5 days after an artificial feed supplemented with 15mM galactosamine and the number of oocytes were counted. Galactosamine reduced the number of oocytes when compared to control flies fed on heparinised blood only (Fig. 4A). Galactosamine also had a subtle impact on sandfly survival as flies that blood fed on heparinised human blood supplemented with 15mM galactosamine had a median survival of 24 days in comparison to 28 days of blood fed control flies (Fig. 4B). To further investigate whether galactosamine is toxic to enterocytes, we investigated if this sugar increased cell mortality in comparison to controls using propidium iodide. This dye is taken up by dead or apoptotic cells, generating a fluorescence observed at 510–560 nm excitation/590 nm emission. After image processing, we observed that galactosamine did not statistically induce gut cell death in comparison to controls fed on blood without galactosamine, showing a trend of increased gut cell mortality at 12 hours after the blood feed with galactosamine (Fig. 4C).

Galactosamine reduces sandfly gut proteases but increases sandfly α -glycosidase activity

To investigate if galactosamine induces unspecific toxicity, sandflies were blood fed with human blood supplemented with galactosamine and after 24h, we measured the aminopeptidase and α -glycosidase activities in comparison to blood fed controls. Galactosamine significantly reduced aminopeptidase activity (Fig. 5A) in the same way observed for trypsins whereas it increased α -glycosidase activity in comparison to blood fed controls (Fig. 5B).

Galactosamine increases *Lu. longipalpis* susceptibility to *Le. infantum* and *Le. mexicana*

Before sandfly infections with *Leishmania*, we confirmed that antibiotic treatment was able to reduce *Lu. longipalpis* microbiota (Fig. S2). Using galactosamine, we aimed to manipulate the *Lu. longipalpis* trypsin activity to increase their susceptibility to *Leishmania*. To this end, we performed sandfly infections with *Le. mexicana* (strain MNYC/BZ/62/M379) and *Le. infantum* (strain BH401) with 7 day old chick skin artificial feeders using a Hemotek device. Two groups of *Lu. longipalpis* ingested different amounts of galactosamine (15 and 30 mM final concentration) in an infective blood meal and guts of infected sandflies were dissected five and eight days after the infection. Parasite count was carried out using a haemocytometer and parasite load from insects infected with *Leishmania* seeded in human blood supplemented with Galactosamine was compared to control insects infected with *Leishmania* without galactosamine. The results showed that administration of 15 and 30 mM galactosamine was sufficient to increase the number of promastigote forms and prevalence of *Le. mexicana* (Fig. 6) and *Le. infantum* (Fig. 7) in galactosamine-treated insects in comparison to untreated controls.

The antioxidant N-acetyl cysteine favours *Leishmania* growth in *Lu longipalpis*

With the intent to increase *Lu longipalpis* susceptibility to *Leishmania*, we performed sand fly infections with *Le. infantum* (strain BH401) with supplementation of the infective blood meal with the antioxidant (N-acetyl-cysteine). ROS scavenging by N-acetyl-cysteine was able to increase the number of promastigotes and prevalence of sand fly infection in comparison to uninfected controls (Fig. 8). A combination of Galactosamine (15mM) and N-acetyl-cysteine (2mM) in an infective blood meal containing *Le. infantum* increased both the number of *Leishmania promastigotes* per fly and the infection prevalence, showing a trend to increase sand fly infection when both of these treatments were combined (Fig. 9).

DISCUSSION

Previous work done by Volf et al. (Volf et al. 2001) investigated the effect of galactosamine in blood meal digestion. The authors observed that this amino sugar increased sandfly infections with *Le. major* by causing extensive changes in *Phlebotomus duboscqi* blood digestion. The administration of 50 mM galactosamine blocked sandfly trypsin and alkaline protease activities whereas galactose did not alter *P. duboscqi* trypsinolytic activity. Here we show that galactosamine reduces *Lu. longipalpis* (the main vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Americas) trypsinolytic activity in a dose dependent manner. The dose of 30mM galactosamine was able to reduce sandfly trypsinolytic activity 24 hours after an artificial feed (Fig. 1). Surprisingly, this trypsin activity reduction was specific to galactosamine as other similar hexoses such as galactose, N-acetyl-Galactosamine and the galactosamine structural isomer glucosamine did not have the same effect when supplemented in an artificial *Lu. longipalpis* blood meal (Fig. S1). Perhaps only galactosamine is capable to compete with amino acids and bind to a TOR-related molecule (receptor?) present in enterocytes, hindering the activation of a pathway that drives protease expression in the sandfly gut. TOR (Target of Rapamycin) is a serine/threonine kinase which is

involved in cell growth, nutrient-intake response and stress (Hansen et al. 2005).

In the mosquito *Aedes aegypti*, amino acid intake by female mosquitoes induced trypsin synthesis concomitantly with the phosphorylation of the translational activator kinase p70S6 and the translational repressor 4E-BP (two proteins belonging to the conserved TOR pathway), necessary for the translation of trypsin RNA in response to increased amino acid concentration (Brandon et al. 2008b, Roy & Raikhel 2012b). We hypothesized that galactosamine interferes with nutrient sensing in sandflies, hindering protease production. To investigate this, *Lu. longipalpis* females were blood fed with heparinised human blood supplemented with 15 mM galactosamine and an excess of amino acids (15 and 30mM final concentration), also supplemented with the blood meal. At the concentration of 30mM, a mixture of all amino acids reverted the reduction of trypsin activity observed when galactosamine is supplemented during sandfly artificial meals (Fig. 3). The conserved TOR pathway is the link between nutrient digestion, trypsin expression (Brandon et al. 2008b) and oogenesis (Carpenter et al. 2012a) in bloodsucking insects. In sand flies, the TOR pathway seems to be involved in trypsin production, as the supplementation of a *Lu. longipalpis* blood meal with rapamycin (a specific inhibitor of mTOR) (Kaphingst et al. 2010) significantly reduced trypsin activity in comparison to untreated controls (Fig. 3).

In mosquitoes, amino acids from digestion are taken up by the fat body to be converted into yolk protein during oogenesis through TOR activation (Carpenter et al. 2012a). Interruption of TOR activity causes impact on vitellogenesis and egg production (Carpenter et al. 2012a). Corroborating this, in sandflies galactosamine added to the blood meal reduced the number of eggs present inside the abdomen of *Lu. longipalpis* (Fig. 4A) causing an impact on reproductive fitness.

Galactosamine is a sugar that causes cytotoxicity in vertebrates by inducing apoptosis in hepatocytes (Maes et al. 2016) and is also used in experimental models for hepatotoxicity induction to study drugs that potentially minimise hepatic damage in vertebrate hosts (Deng et al.

2017, Jia et al. 2017, Misawa et al. 2017a, Peng et al. 2017). Volf and co-workers (Volf et al. 2001) even attributed the possible galactosamine toxic effects on sandflies the fact that the supplementation of infective blood meals with this sugar increases the susceptibility of these insects to *Leishmania* (Volf et al. 2001). In our experiments, we performed a series of experiments to investigate the possible involvement of Galactosamine in gut tissue damage or reduced *Lu. longipalpis* survival after galactosamine intake. Although subtle, female sandflies that received heparinised blood supplemented with 15 mM Galactosamine had a higher mortality rate (Fig. 4B) compared to their respective controls that fed on heparinised blood only. However, fluorescence microscopy experiments with subsequent image analysis using the red-fluorescent dead cell marker propidium iodide did not detect significant increase in cell death upon galactosamine feed in comparison to control insects up to 36 hours after galactosamine intake (Fig. 4C). As this sugar is toxic to vertebrates, Volf and coworkers (Volf et al. 2001) suggested that it has an unspecific toxic effect on sand flies, especially because glucosamine (a galactosamine isomer) did not have an effect on trypsin activity. To investigate this, we supplemented sandfly blood meals with 15mM galactosamine and measured aminopeptidase and α -glycosidase activity 24 hours after this artificial blood meal. Interestingly, galactosamine supplementation significantly reduced sandfly aminopeptidase activity (Fig. 5A) whereas this sugar increased sandfly α -glycosidase activity (Fig. 5B). Overall, these results suggest that galactosamine impacts sand fly gut proteases rather than having an unspecific influence on sandfly gut physiology as previously suggested.

Collectively, our results can be summarised in a working model for galactosamine influence on sandfly gut proteases as shown in figure 10. Probably in all nematoceran dipterans, a mechanism involving nutrient perception detects the increase in amino acid concentration after a blood meal through the TOR system. Since amino acids are necessary for the transcription of blood meal-induced digestive enzymes and Galactosamine is an equally small

aminated molecule, we speculate that Galactosamine competes with amino acids inside enterocytes for TOR activation. In a mosquito model using *A. aegypti*, blood digestion occurs in two phases: a phase that occurs before the meal characterised by the transcription of the trypsin messenger RNA and a later phase, characterised by the translation of trypsins by the ingestion of blood or amino acids (Brandon et al. 2008b). The onset of trypsin translation is at least in part controlled via the TOR (Target of Rapamycin) pathway which is also important in the translation of proteins such as vitellogenin during vitellogenesis in the fatty body of mosquitoes after a blood meal (Carpenter et al. 2012a). It is likely that in nematoceran Diptera, at least the mechanism of amino acid recognition by enterocytes is conserved and some TOR complexes function as amino acid sensors, capable to recognise an increase in the amino acid concentration in the gut, activating the TOR pathway and stimulating the synthesis of digestive enzymes.

Leishmania parasites dwell exclusively inside the gut of their insect vectors. During the transformation from round-shaped amastigotes found inside macrophages in their vertebrate hosts to the replicative procyclic promastigotes inside the sandfly gut (Bates 2007b), *Leishmania* is more susceptible to the onslaught of digestive enzymes, especially trypsins. (Pimenta et al. 1997). More recently, Pruzinova et al. (Pruzinova et al. 2018) provided evidence that digestive proteases exert an indirect harmful effect in *Leishmania* promastigotes by increasing oxidative stress due to haemoglobin digestion.

Considering that *Leishmania* modulates trypsin activity in sand flies during development (Dillon & Lane 1993b, Sant'Anna et al. 2009, Telleria et al. 2010, Santos et al. 2014), we investigated whether galactosamine supplementation increased *Lu. longipalpis* susceptibility to *Leishmania* infection. Indeed, the administration of 15 and 30mM galactosamine was sufficient to increase the number of promastigote forms and the prevalence of infection of *Le. infantum* (Fig. 6) and *Le. mexicana* (Fig. 7) in insects treated with galactosamine compared to the respective controls. The reduction of trypsin production

within the *Lu. longipalpis* gut and the delayed blood digestion generated by galactosamine ingestion benefited *Leishmania* growth within the sandfly gut, increasing the flies' parasite load to the range speculated to occur in sand flies transmitting *Leishmania* in the field (10^3 to 10^6 promastigotes per fly)(Stamper et al. 2011). According to Pruzinova et al. (Pruzinova et al. 2018) sandfly gut proteases do not directly affect *Leishmania* promastigote forms. The killing effect is probably due to haem release upon blood digestion and increase in oxidative stress in the sandfly gut. Previous work have demonstrated that the pro-oxidative molecule hydrogen peroxide is detrimental to *Leishmania* development within the sandfly gut (Diaz-Albiter et al. 2012). The supplementation of an infective blood meal with an antioxidant compound increased *Le. infantum* population and *Leishmania* prevalence within *Lu. longipalpis* gut (Fig. 8), confirming that ROS modulation can either increase or decrease *Leishmania* growth in sandflies.

The control of zoonotic visceral leishmaniasis in South America relies on treatment of infected individuals, the controversial culling of infected dogs and insecticide spraying (Lara-Silva et al. 2017, Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JME, Freitas YBN & Melo AECDS, Campos MP, Alves ND 2018, Vijayakumar & Das 2018). The absence of an effective vaccine with sterilising immunity have instigated researchers to seek new antigens for dog vaccination (De Mendonça et al. 2016, Moura et al. 2017, Roatt et al. 2017). Although needle challenge has been proved to drive an outcome to leishmaniasis far from the natural disease development due to the absence of sandfly saliva (Abdeladhim et al. 2014) and PSG (Giraud et al. 2018), it has been widely used to validate new potential antigens for vaccination. To that end, vaccine challenge through sandfly bite would be more appropriate as it represents the natural way for vertebrate infection. However, artificially infected sand flies with mature infections are difficult to obtain in the laboratory. As infections using a combination of galactosamine and the

antioxidant N-acetyl-cysteine significantly increased sandfly susceptibility to *Leishmania* (Fig. 9), our research group are currently developing an infection protocol including sandfly trypsin inhibition and ROS scavenging to generate heavily infected sand flies to be used as an ideal challenge in vaccine trials against *Le. infantum*.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In summary, our findings demonstrate that galactosamine influences sandfly gut proteases by impairing amino acid sensing through the TOR system, whereas increasing *Lu. longipalpis* susceptibility to *Leishmania* species.

Experimental procedures

Ethics Statement

All procedures using experimental animals were previously approved by the ethical review committee of animal experimentation and performed in accordance with UFMG regulations (CEUA-UFMG #121/2018).

Insect Rearing

All experiments were performed using colony-reared *Lu. longipalpis* obtained from insects caught in the urban area of Teresina (Piauí-Brazil) in 2009, following standard methods previously described (Modi & Tesh 1983). Insects were maintained on 30% sucrose solution *ad libitum* and blood fed once a week in hamsters (*Mesocricetus auratus*) anesthetized with 0.1 mL of 5% Thiopental. The insects were maintained in insectary conditions at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% humidity.

Antibiotic treatment of Lu. longipalpis

Before sandfly infections with *Leishmania*, sand flies were treated from emergence with broad spectrum antibiotics (100µg Penicillin, 70µg Streptomycin and 20µg

Gentamycin) mixed with 30% sucrose in cotton wool. The insects were treated for four days and to evaluate the effectiveness of treatments and microbiota reduction, 4 groups of female *Lu. longipalpis* were treated with antibiotics as stated above and were blood fed with heparinised human blood (2 units/mL)(group 1), heparinised human blood with 15mM galactosamine (group 2) and heparinised human blood with 30mM galactosamine (group 3). A fourth group was not treated with antibiotics. Three pools of 3 sandfly guts were dissected 24 hours after the blood feed and were serially diluted in sterile 0.9 saline followed by plating in LB/agar nutrient medium and incubation at 37°C for 24 hours. The results were expressed as colony forming units (CFU) per gut in all groups.

Blood feeding and Leishmania artificial infections

Three to five day old female sand flies were antibiotic treated as stated above and artificially fed through chick skin membrane on human heparinised blood (2 units/mL) containing antibiotics (100µg Penicillin, 70µg Streptomycin and 20µg Gentamycin). Artificial *Leishmania* infections were performed according to Diaz-Albiter et al. (Diaz-Albiter et al. 2012) with some modifications. Briefly, *Le. infantum* (BH401) promastigotes were kept at 26°C in Schneider's Insect Medium and were subpassaged until P2 cultures reached log phase. Promastigotes were then resuspended in 1.5 mL heparinised human blood reconstituted after serum complement inactivation at 56°C for 30 minutes. *Le. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) and *Le. infantum* (BH401) promastigotes were maintained in early exponential growth in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich®) supplemented with 10% FBS, 200µM L-glutamine, BME vitamins (Invitrogen), Penicillin (70µg/mL) and Streptomycin (100µg/mL). Human blood seeded with parasites and antibiotics (100µg Penicillin, 70µg Streptomycin and 20µg Gentamycin) were offered to 3-5 day old female *Lu. longipalpis* (4 x

10⁶ parasites/mL) through chick skin feeders using Hemotek[®] as described before (Diaz-Albiter et al. 2012).

Leishmania artificial infections supplemented with an antioxidant

Three to five day old female sandflies were antibiotic treated as stated above and were artificially infected with *Le. infantum* (BH 401) in human heparinised blood supplemented with N-acetyl-cysteine (1 and 2mM). Control groups were infected using heparinised blood only.

Sandfly gut trypsin activity

Sandfly gut trypsin activity was measured as previously described (Fazito do Vale et al. 2007), with some modifications. Briefly, sandfly guts were dissected in saline 0.9% and transferred to 1.5mL Eppendorf tubes containing 50µL saline. After homogenisation, 450µL of 0.9% saline were added following centrifugation at 14,000g for 10 minutes at 4°C. Fifty microlitres of homogenate were added in duplicate to 100µL Tris-HCl 0,1M pH8.5, 40µL 0.9% saline and 10µL 10mM BApNA. The kinetic assay was performed in an ELISA plate reader (Versamax[®], Molecular Devices) at 30°C with reads performed every 30 seconds during 30 minutes at 410nm.

Effect of rapamycin in sandfly gut trypsin activity

Three to five day old female sandflies were antibiotic treated since emergence as stated above and were artificially fed through chick skin membrane in heparinised human blood supplemented with rapamycin (20µM final concentration). Control flies fed on heparinised human blood only. Trypsin activity was measured as described above.

Amino acid supplementation of the blood meal

Five groups of sandflies were treated from emergence with a mixture of broad spectrum antibiotics as stated above added to 30% sucrose

solution in cotton wool. On the fourth day, one group was artificially fed with heparinised human blood only; the second group fed on blood supplemented with 15mM galactosamine (Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500); the third group fed with 15 mM Galactosamine added to heparinised blood plus a solution of amino acids at the final concentration of 15 mM; the fourth group fed with 15mM Galactosamine added to heparinised blood plus 30 mM amino acid final concentration and the fifth group fed with heparinised blood plus 30 mM amino acid final concentration. The supplementation of the blood meal with amino acids was done by mixing 3 stock solutions containing the following components:

- Solution A: MEM amino acid solution (50x) - SIGMA-M5550
- Solution B: 178 mg alanine, 266 mg aspartic acid, 294 mg glutamic acid, 150 mg glycine, 230 mg proline, 210 mg serine in 50 ml distilled water;
- Solution C: 2336 mg glutamine, 120 mg asparagine prepared in 20 mL of distilled water.

The 15mM galactosamine group was prepared by mixing 10µL galactosamine (3M) in 1990µL heparinised blood. The 15mM galactosamine + 15mM amino acid group was obtained by mixing 10µL galactosamine (3M), 66µL solution A, 8.4µL of solution B and 8.4µL of solution C in 1907.2µL of heparinised blood. The 15mM galactosamine + 30mM amino acid group was obtained by mixing 10µL galactosamine (3M), 164µL solution A, 20.4µL of solution B and 20.4µL of solution C in 1785.2µL of heparinised blood. The 30mM amino acid group was prepared by mixing 164µL solution A, 20.4µL of solution B and 20.4µL of solution C in 1795.2µL of heparinised blood.

For this experiment, it was considered that the blood already contains approximately 5mM total amino acid concentration. After the blood meal, the insects were kept in cages with access to 30% sucrose supplemented with antibiotics as stated above. Sandfly guts were

dissected at 24 and 48 hours after the blood meals and the trypsinolytic activity was measured as described above.

Aminopeptidase activity

The sandfly gut aminopeptidase activity was measured according to Fazito do Vale (Fazito do Vale et al. 2007) with modifications. Briefly, pools of 5 sandfly guts were dissected into 500 μ L of 0.9% saline with 5 μ L Triton X100 1%. Samples were briefly sonicated and centrifuged 10.000g at 4°C for 10 minutes. To each 96-well plate were added 100 μ L 100mM TRIS/HCl buffer PH8, 30 μ L water and 20 μ L of 10mM L-leucine P-NA substrate previously dissolved in DMSO. After incubation at 30 C for 5 minutes in a microtitre plate reader, the assay started by adding 50 μ L of sample (containing 0.5 gut) following a kinetic assay done at 415 nm with reads performed every 30 seconds for 30 minutes.

α -glycosidase activity

Gut samples were prepared as described above for aminopeptidase activity. The assays were performed by mixing 50 μ L of 4 mM p-Np- α -D-glucopyranoside substrate dissolved in water, 20 μ L 0.1M buffer (MES/NaOH, pH 6), 20 μ L H₂O and 10 μ L sample (equivalent to 0.2 midguts). Blanks were prepared by substituting the samples with saline. Incubations were performed for 1h at 30°C, and reactions were stopped by the addition of 200 μ L 0.375 M glycine buffer, pH 10.5. Two hundred microliters from each tube were transferred to a micro plate and the absorption was measured using a micro plate reader at 400 nm.

Propidium iodide detection of dead sandfly gut cells

Sandflies were artificially blood fed with heparinised human blood (control) or human blood supplemented with 15mM galactosamine. Sandfly guts were dissected at 12, 24 and 36 hours

after the blood feed in 0.9% saline and were incubated with 3.74 μ M Propidium iodide for 30 seconds at room temperature. The presence of dead cells was monitored in a fluorescence microscope (Olympus U-PMTVC, Tokyo, Japan) at 590 nm. Sandfly guts were photographed using the 10x objective and images were analysed using Image J as previously described (Diaz-Albiter et al. 2012). Tiff files were generated using the digital camera Canon EOS 600D using the software EOS Utility and midgut images were outlined using the freehand selection tool and mean intensity was measured accounting for background fluorescence.

Sandfly survival curve

Three day old *Lu longipalpis* were blood fed with heparinised human blood (control, N=99) or blood supplemented with 15mM galactosamine (N=138). Sandflies had access to 30% sucrose *ad libitum* after artificial feed and sandfly survival was monitored daily until all sandflies had died.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Data distribution and normality were tested using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Comparisons between groups were done using one-way ANOVA followed by Tukey test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test. Comparisons between two groups were done using t-Test; survival analyses were performed using the Log-rank (Mantel-Cox) test and prevalence of *Leishmania* infection in sand flies were compared using Fishers Exact Test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Laís Karolyne Castro, Amanda Bortolini Martins and César Nonato de Oliveira for technical assistance. MRVS, MHP, RNA and NFG are funded by

INCT-Molecular Entomology (CNPq Brazil).
MRVS is funded by a CNPq Grant #
306560/2016-0.

Conflict of interest

The authors declare that they have no
conflict of interests.

Author Contributions

MRVS and NFG designed the
experiments. TLSF, TFM, LGFM and AAPF
performed the experiments and analysed the
results. TLSF, GCDP, LBK, MHP, RNA, NFG
and MRVS wrote the paper.

References

- (PAHO) PAHO 2015. *Leishmaniasis. World Health Organization. Américas.*
- Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG 2014. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect. Genet. Evol.* 28: 691–703.
- Aguiar G, Vilela M, Lima R 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 583–584.
- Alexander B, Usma M 1994. Potential sources of sugar for the phlebotominae sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 543–549.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M de 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7.
- Ashford R 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269–1281.
- Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568–572.
- Backer J 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17.
- Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4.
- Bates P a 2007a. International Journal for Parasitology. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Bates PA 2007b. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Blanford S, Chan BHK, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF 2005. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science (80-.)*. 308: 1638–1641.
- Borovsky D SY 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 1: 235–242.
- Brandon M, Pennington J, Isoe J, Zamora J, Schillinger A 2008a. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 916–922.
- Brandon MC, Pennington JE, Isoe J, Zamora J, Schillinger AS, Miesfeld RL 2008b. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 916–922.
- Brasil 2007. Secretaria de vigilância epidemiológica em saúde. *Minist. da Saúde.*
- Carpenter VK, Drake LL, Aguirre SE, Price DP, Rodriguez SD, Hansen IA 2012a. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J. Insect Physiol.* 58: 513–522.
- Carpenter VK, Drake LL, Aguirre SE, D. DPP, Stacy Rodriguez and IAH 2012b. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J Insect Physiol.* 58: 513–522.
- Casanova C, Natal D, Santos F a M 2009. Survival, population size, and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.* 46: 42–50.
- Chanotis B 1974a. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol* 11: 73–79.
- Chanotis BN 1974b. Psychodidae) Under Experimental Conditions I.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 872–882.
- Cirimotich CM, Dong YM, Clayton AM, Souza-Neto JA., Mulenga M, Dimopoulos G 2010. Bacteria-Mediated Resistance to Plasmodium Infection in Anopheles Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*

- 83: 259–260.
- Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* 10: 307–310.
- Deng Y, Chen C, Yu H, Diao H, Shi C, Wang Y, Li G, Shi M 2017. Oridonin ameliorates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis. *Am. J. Transl. Res.* 9: 4271–4279.
- Diaz-Albiter H, Sant'anna MR, Genta F a, Dillon RJ 2012. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 287: 23995–24003.
- Dillon RJ, Dillon VM 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71–92.
- Dillon RJ, Lane R 1993a. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med. Vet. Entomol.* 7: 225–232.
- Dillon RJ, Lane RP 1993b. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol. Res.* 79: 492–496.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5.
- Dostálová A, Volf P 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5: 276.
- Fazito do Vale V, Pereira MH, Gontijo NF 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Insect Physiol.* 53: 1151–1159.
- Giraud E, Lestinaova T, Derrick T, Martin O, Dillon RJ, Volf P, Müller I, Bates PA, Rogers ME 2018. *Leishmania proteophosphoglycans* regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling (SM Beverley, Ed.). *PLOS Pathog.* 14: e1006794.
- Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez M, Mendes D, Hernandez-Avila J 2003. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* 40: 371–374.
- Gramiccia M GL 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 35: 1169–1180.
- Hansen I, Attardo G, Roy S, Raikhel A 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J Biol Chem* 280: 20565–20572.
- Harhay M, Olliaro P, Costa D, Costa C 2011a. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403–409.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN 2011b. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27: 403–409.
- Jia R, Zhang H, Zhang W, Zhao H, Zha C, Liu Y 2017. Protective effects of tenuigenin on lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced acute liver injury. *Microb. Pathog.* 112: 83–88.
- Kamhawi S 2006a. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22: 439–445.
- Kamhawi S 2006b. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22: 439–445.
- Kaphingst KA, Persky S, Lachance C 2010. NIH Public Access. 14: 384–399.
- Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JME, Freitas YBN SM, Melo AECDS, Campos MP, Alves ND WG 2018. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis.:* 1–8.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279–289.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD 1977. The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 13: 429–440.
- Lainson R 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 1: 13–32.

- Lainson R, Rangel E 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 811–827.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *Acad. Press*: 1–20.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis - the Neotropical *Leishmania* species. *Microbiol. Microbiol Infect. Ed. Topley Wilson's* 9: 243–266.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 239–242.
- Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Dias ES 2017. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 176: 109–113.
- Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR da, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, Pimenta PFP, Marcondes M 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi to the natural vector. *Vet. Parasitol.* 196.
- Lehane M 2005. *The Biology of blood-Sucking in insects.*
- Lima-Silva T 2015. Manipulação da fisiologia digestiva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): efeito da Galactosamina na atividade tripsinolítica intestinal do principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas.
- Lindoso JAL, Lindoso AABP 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 51: 247–253.
- Maes M, Vinken M, Jaeschke H 2016. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 290: 86–97.
- McMichael AJ 2004. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: Past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359: 1049–1058.
- Mendonça LZ De, Resende LA, Lanna MF, Aguiar-Soares RDDO, Roatt BM, Castro RADOE, Batista MA, Silveira-Lemos D, Gomes JDAS, Fujiwara RT, Rezende SA, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Dutra WO, Reis AB, Giunchetti RC 2016. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors* 9: 1–12.
- Miot HT 2014. Caracterização de componentes da via TOR (target of rapamycin) em *Trypanosoma cruzi*.
- Misawa H, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Shimada Y, Hattori Y 2017a. Prostacyclin mimetics afford protection against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 334: 55–65.
- Misawa H, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Shimada Y, Hattori Y 2017b. Prostacyclin mimetics afford protection against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 334: 55–65.
- Modi GB, Tesh RB 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Ent.* 20(5): 568–569.
- Molyneux D, Moore J, Maroli M 1991. Sugar in sandflies. *Parassitologia* Suppl: 431–436.
- Moura AP V., Santos LCB, Brito CRN, Valencia E, Junqueira C, Filho AAP, Sant'Anna MRV, Gontijo NF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Gazzinelli RT, McKay CS, Sanhueza CA, Finn MG, Marques AF 2017. Virus-like Particle Display of the α -Gal Carbohydrate for Vaccination against *Leishmania* Infection. *ACS Cent. Sci.* 3: 1026–1031.
- Oliveira F, Carvalho AM de, Oliveira CI de 2013. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. *Front. Immunol.* 4: 1–8.
- OPAS 2018. *Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas.* Washington.
- Paes LR do NB 2016. Distribuição espaçotemporal dos casos humanos de leishmaniose tegumentar americana notificados no Estado do Rio de Janeiro de 2001 a 2013 e associação com variáveis clínicas e populacionais.
- Park J, Attardo G, Hansen I, Raikhel A 2006. GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous

- mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 281: 11167–11176.
- Peng Z, Gong X, Yang Y, Huang L, Zhang Q, Zhang P, Wan R, Zhang B 2017. Hepatoprotective effect of quercetin against LPS/D-GalN induced acute liver injury in mice by inhibiting the IKK/NF- κ B and MAPK signal pathways. *Int. Immunopharmacol.* 52: 281–289.
- Pimenta P, Modi G, Pereira S, Shahabuddin M, Sacks D 1997. A novel role of the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359–369.
- Podinovskaia M, Descoteaux A 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 10: 111–129.
- Pruzinova K, Sadlova J, Myskova J, Lestinova T, Janda J, Volf P 2018. *Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases. *Parasites and Vectors* 11: 1–9.
- Pumpini C, Demaio J, Kent M, Davis J, Beier J 1996. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 214–218.
- Ramirez JL, Souza-Neto J, Cosme RT, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: 1–11.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA 1986. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 347–349.
- Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, Reis LES, Cardoso JM de O, Mathias FAS, Brito RCF de, Silva SM da, Gontijo NDF, Ferreira S de A, Valenzuela JG, Corrêa-Oliveira R, Giunchetti RC, Reis AB 2017. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Front. Immunol.* 8.
- Rogers M 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol.* 28: 223.
- Rogers M, Chance M, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495–508.
- Rogers M, Hajmová M, Joshi M, Sadlova J, Mwyer D, Volf P 2008. *Leishmania* chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol.* 10: 1363–1372.
- Rogers M, Ilg T, Nikolaev A, Ferguson M, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463–467.
- Roque ALR 2009. Avaliação do Potencial de Pequenos Mamíferos e Importância de Animais Domésticos na Manutenção dos Ciclos de Transmissão de Tripanossomatídeos: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.
- Roque ALR, Jansen AM 2014. Hospedeiros e reservatórios de *leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópicos. I.
- Roy SG, Raikhel AS 2012a. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito *Aedes aegypti*. *Faseb J.* 26.
- Roy SG, Raikhel AS 2012b. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito *Aedes aegypti*. *FASEB J.* 26: 1334–1342.
- Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Aguiar-Martins K, Salem WS Al, Cavalcante RR, Dillon VM, Bates P a, Genta F a, Dillon RJ 2014. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit. Vectors* 7: 329.
- Sant'anna MR, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon RJ, Bates PA 2009. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasit. Vectors* 2: 62.
- Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon RJ, Bates PA 2009. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites and Vectors* 2: 1–10.
- Santos VC, Vale VF, Silva SM, Alves A, Nascimento S, Alvim N, Saab A, Pedro R, Soares P, Suzan

- M, Michalick M, Araujo RN, Pereira MH, Fujiwara RT, Gontijo NF 2014. Host Modulation by a Parasite : How *Leishmania infantum* Modifies the Intestinal Environment of *Lutzomyia longipalpis* to Favor Its Development. 9: 1–9.
- Schlein Y 1986. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today* 2: 175–177.
- Serafim TD, Coutinho-abreu I V, Oliveira F, Meneses C, Valenzuela JG, Molecular V, Section B, Diseases I 2018. Sequential blood meals augment vector infectiousness by promoting *Leishmania* replication and triggering amplification of metacyclics via a novel retroleptomonad developmental stage. *Nat Microbiol.* 3: 548–555.
- Shaw JJ 1999. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In *Contributions to the knowledge of Diptera*. In: Florida, p. .
- Shaw JJ, Lainson R, Ward RD 1972. Leishmaniasis in Brazil. VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 718–723.
- Shaw JJ, Travassos da Rosa AP, Souza A, Cruz AC 2003. *Transmissão de Outros Agentes: Os Flebotomíneos Brasileiros como Hospedeiros e Vetores de Determinadas Espécies*.
- Shimabukuro PHF, Galati EAB 2011. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentário sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop.* 11.
- Stamper LW, Patrick RL, Fay MP, Lawyer PG, Elnaïem DEA, Secundino N, Debrabant A, Sacks DL, Peters NC 2011. Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5.
- Telleria EL 2007. Caracterização de Tripsinas em *Lutzomyia longipalpis* – Principal Vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil.
- Telleria EL, Araújo APO de, Secundino NF, & Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM 2010. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* - expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum* chagasi. *PLoS One* 5: 1–8.
- Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigão-Farias JR, de Araújo AP R-OJ, YM T-C 2007. Constitutive and Blood Meal-Induced Trypsin Genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 66: 53–63.
- Vijayakumar S, Das P 2018. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. *Acta Trop.* 181: 95–104.
- Volf P, Kiewegová a., Svobodová M 1998. Sandfly midgut lectin: Effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med. Vet. Entomol.* 12: 151–154.
- Volf P, Svobodová M, Dvoráková E 2001. Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: Effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Med. Vet. Entomol.* 15: 281–286.
- Ward 1990. Some aspects of the biology of phlebotominae sand fly vectors. *Adv Dis Vector Res. Harris KF*: 91–126.
- WHA 2007. *Resolution from the 16 World Health Assembly*.
- WHO 2010. *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases - Control of the Leishmaniases*. Geneva.
- WHO 2016. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 10.1186/1750-9378-2-15.Voir.
- Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4.
- Young DG, Duncan MA 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*.

Figures and figure legends

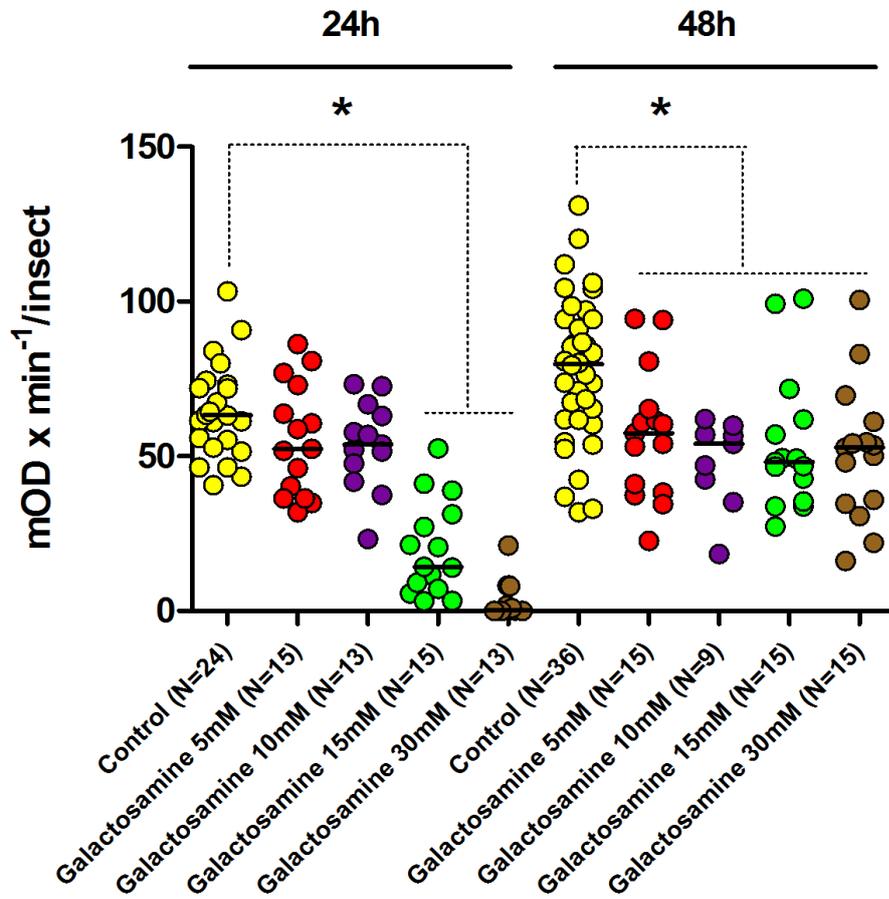


Figure 1: **Galactosamine reduces the trypsin production in *Lu. longipalpis* midgut.** Each plot point represents the trypsinolytic activity (mOD x min⁻¹/insect) of individual sandfly guts dissected at 24 or 48 hours after treatments. Control insects were fed with human heparinised blood only. Crossbars represent the median. * indicates statistical difference at $p \leq 0.05$; (Kruskal-Wallis and Dunn's post test). Results represent the sum of 3 independent experiments.

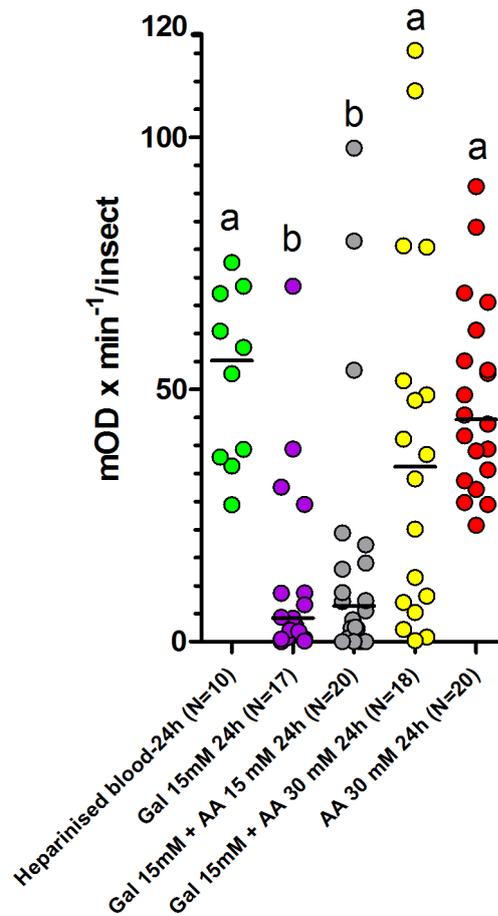


Figure 2: **A mixture of amino acids added to human blood abrogates the Galactosamine effect of reducing trypsinolytic activity in the gut of *Lu. longipalpis*.** Each point on the graph indicates the trypsinolytic activity (mOD x min⁻¹/insect) of individual sandfly guts dissected at 24h after different treatments. Control insects were fed with human heparinised blood only. For all groups, statistical significance is represented by letters above each bar, with different letters meaning distinct statistical groups (statistical difference at $p \leq 0.05$ - Kruskal-Wallis and Dunn's post test). Results represent the sum of 2 independent experiments.

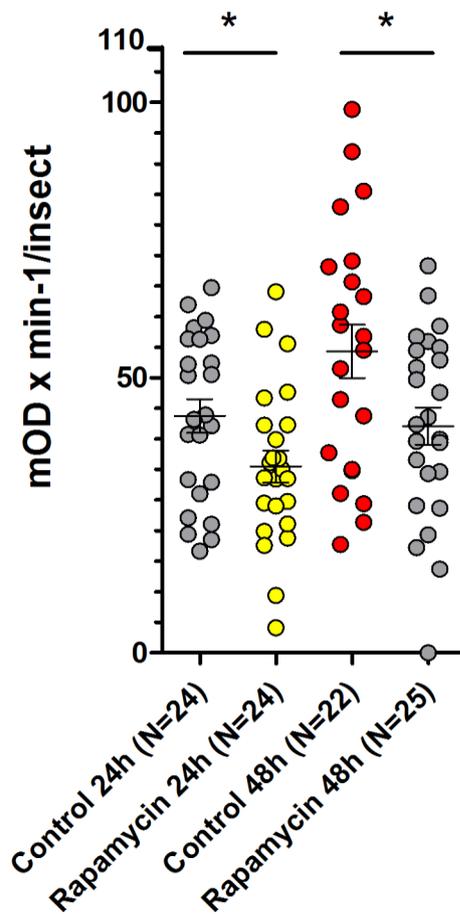


Figure 3: **Rapamycin reduces the trypsinolytic activity in the *Lu. longipalpis* midgut.** Each point on the graph indicates the trypsinolytic activity (mOD x min⁻¹/insect) of individual sandfly guts dissected at 24 or 48h after different treatments. Control insects were fed with human heparinised blood only. Data were represented as mean ± SEM. * indicates statistical difference at $p \leq 0.05$; (ANOVA; Unpaired Student t test). Results represent the sum of 2 independent experiments.

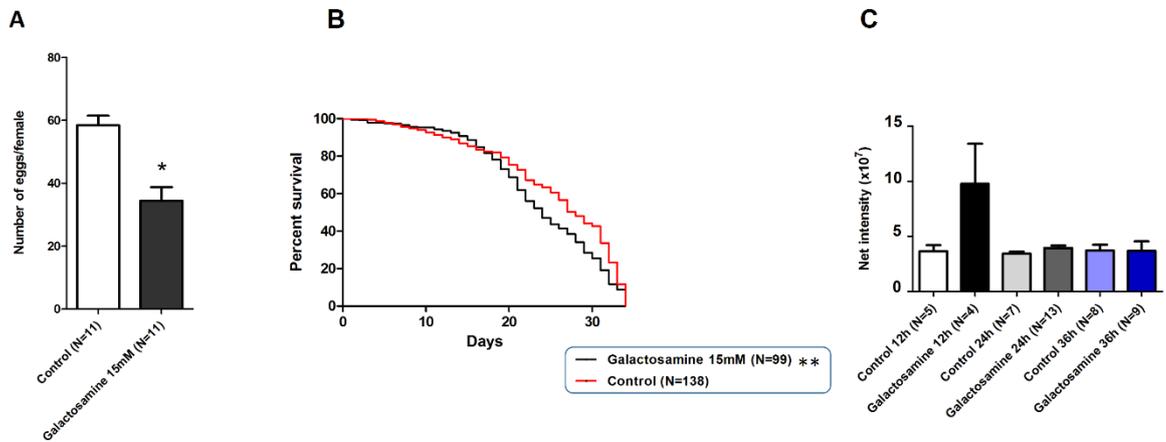


Figure 4: Galactosamine reduces *Lu. longipalpis* oviposition, reduces sandfly longevity but does not induce significant sandfly gut mortality. (A) Human blood supplemented with galactosamine reduce the number of *Lu. longipalpis* eggs inside the abdomen of female sand flies; (B) Galactosamine reduces *Lu. longipalpis* longevity when supplemented to sandfly artificial blood meal. (C) Galactosamine does not induce significant cell death in *Lu. longipalpis* enterocytes when added to the artificial blood meal. * indicates statistical difference at $p \leq 0.05$ (Student t-Test); ** indicates statistical difference at $p \leq 0.05$ (Mantel-Cox Survival test).

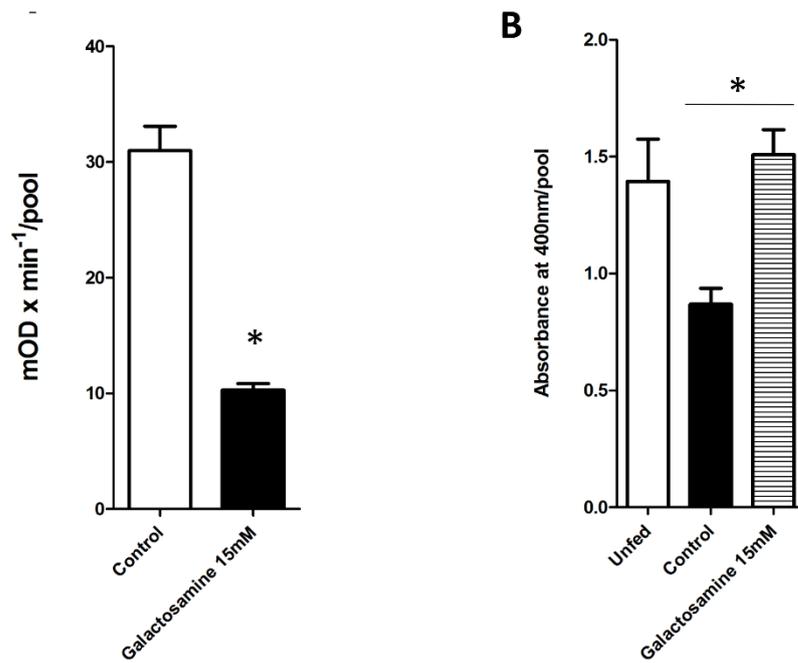


Figure 5: **Galactosamine reduces *Lu. longipalpis* aminopeptidase activity and increases α -glycosidase activity.** (A) Heparinised human blood supplementation with 15mM galactosamine reduced female sandfly aminopeptidase activity. (B) Heparinised human blood supplementation with 15mM galactosamine increased female sandfly α -glycosidase activity. * indicates statistical difference at $p \leq 0.05$ (Student t-Test). Results represent the sum of 2 independent experiments.

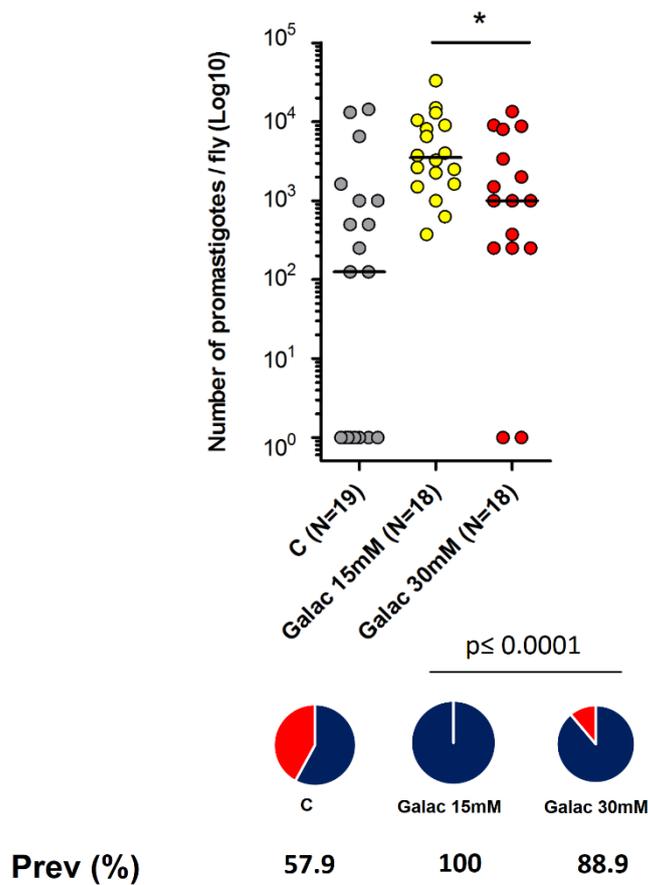


Figure 6: **The supplementation of an infective blood meal with galactosamine (15 and 30 mM) increases parasite load and the prevalence of *Lu. longipalpis* with *Le. mexicana*.** Insects were dissected 5 days after artificial infections. Control insects were infected using heparinised human blood only. Each point on the graph indicates the number of *Leishmania* promastigotes in individual sandfly guts. Pizza charts represent sandfly infection prevalence with *L. mexicana*. Horizontal bars represent statistical difference using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post test for multiple comparisons. Fishers Exact Test was used to test differences in *Leishmania* infection prevalence between groups. Results represent the sum of 2 independent experiments.

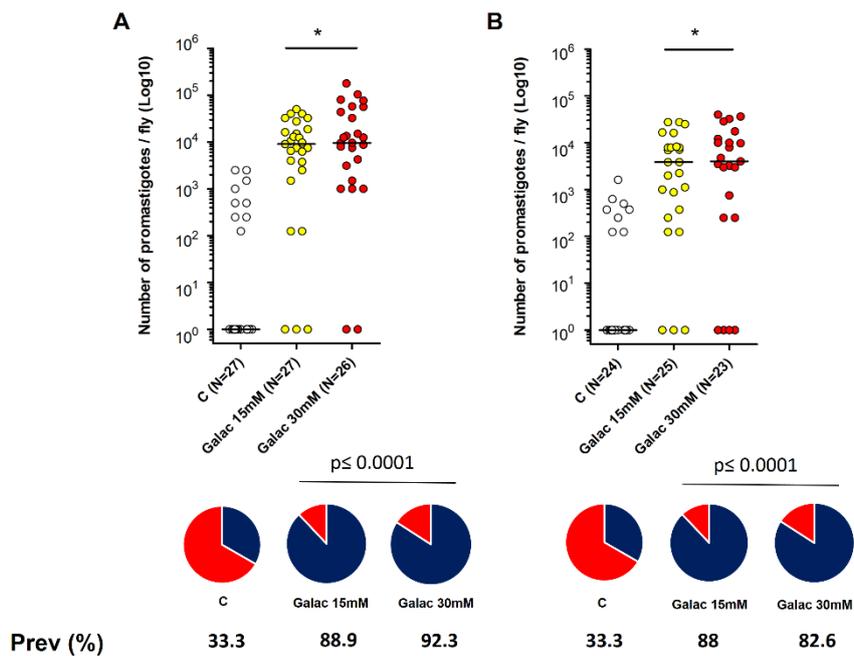


Figure 7: **The supplementation of an infective blood meal with galactosamine (15 and 30 mM, final concentration) increases parasite load and the prevalence of *Lu. longipalpis* with *Le. infantum*.** Insects were dissected 5 days (A) and 8 days (B) after artificial infections. Control insects were infected using heparinised human blood only. Each point on the graph indicates the number of *Leishmania* promastigotes in individual sandfly guts. Pizza charts represent sandfly infection prevalence with *Le. infantum* (strain BH401). Horizontal bars represent statistical difference using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post test for multiple comparisons. Fishers Exact Test was used to test differences in *Leishmania* infection prevalence between groups. Results represent the sum of 3 independent experiments.

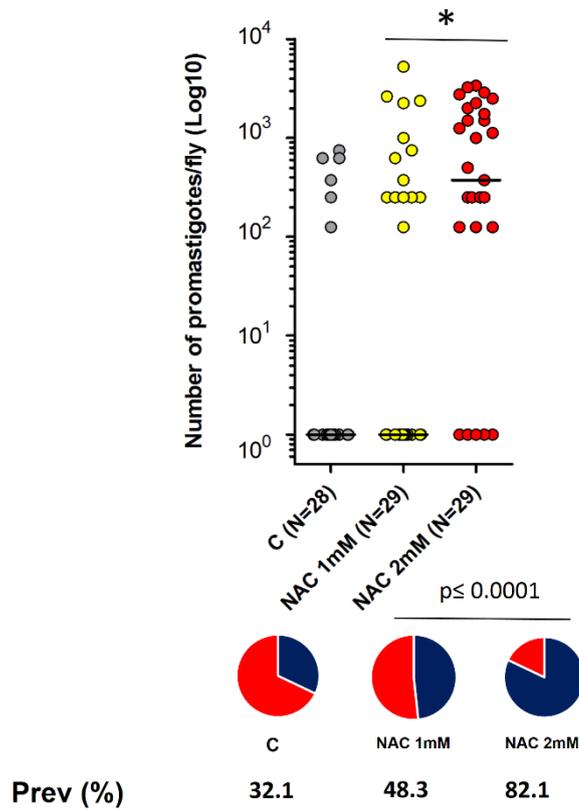


Figure 8: **N-acetyl-cysteine increases parasite load and the prevalence of *Lu. longipalpis* with *Le. infantum*.** Insects were dissected 8 days after artificial infections. Control insects were infected using heparinised human blood only. Each point on the graph indicates the number of *Leishmania* promastigotes in individual sandfly guts. Pizza charts represent sandfly infection prevalence with *Le. infantum*. Horizontal bars represent statistical difference using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post test for multiple comparisons. Fishers Exact Test was used to test differences in *Leishmania* infection prevalence between groups. Results represent the sum of 3 independent experiments.

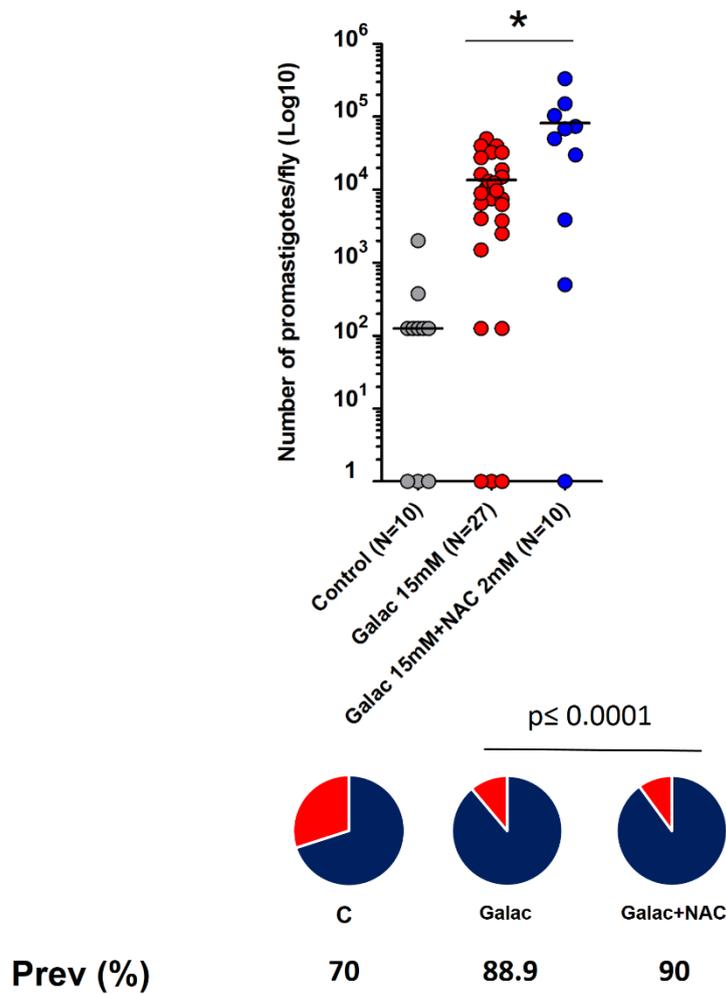


Figure 9: **A combination of Galactosamine and N-acetyl-cysteine promoted *Le. infantum* infection in *Lu. longipalpis*.** When combined, Galactosamine and N-acetyl cysteine showed a trend to increase both parasite load and *Lu. longipalpis* infection prevalence. Insects were dissected 5 days after artificial infections. Control insects were infected using heparinised human blood only. Each point on the graph indicates the number of *Leishmania* promastigotes in individual sandfly guts. Pizza charts represent sandfly infection prevalence with *Le. infantum*. Horizontal bars represent statistical difference between both experimental groups and the control group using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's post test for multiple comparisons. Fishers Exact Test was used to test differences in *Leishmania* infection prevalence between groups.

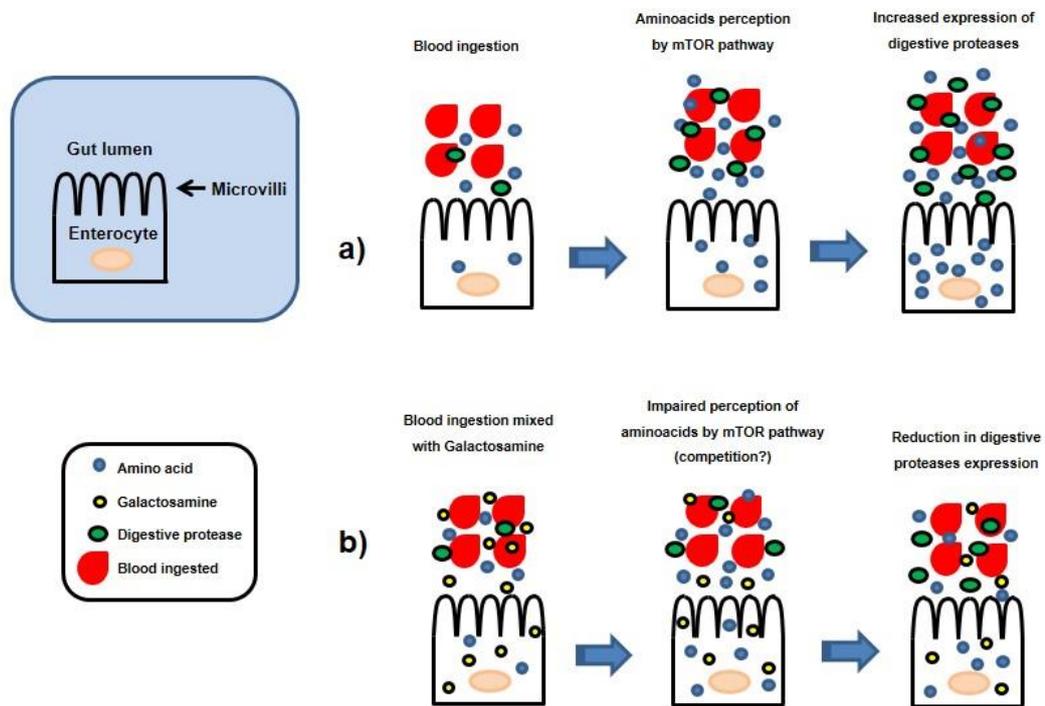
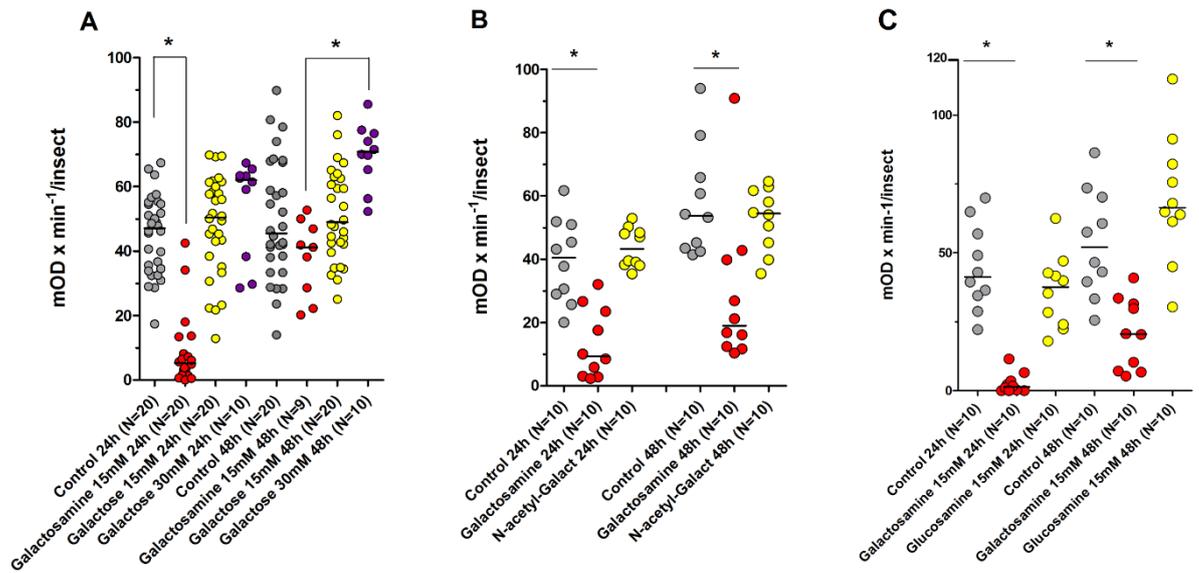
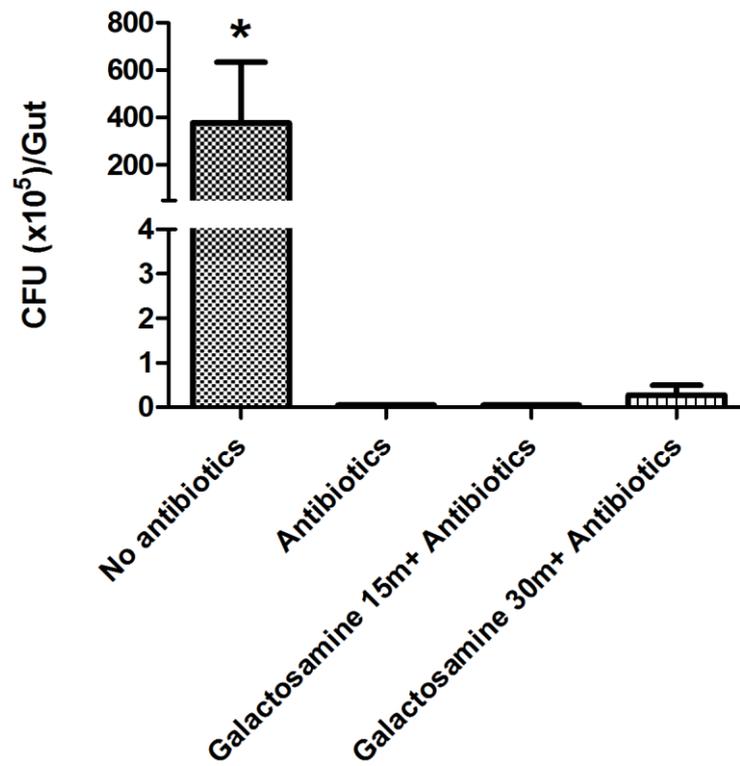


Figure 10: **Galactosamine working model.** The onset of trypsin translation is at least in part controlled via the TOR (Target of Rapamycin) pathway which is also important for protein translation during vitellogenesis in the mosquito fatty body after a blood meal (Carpenter et al. 2012a, Roy & Raikhel 2012b). The involvement of the TOR pathway activated by amino acids to induce *A. aegypti* gut trypsinolytic activity was previously shown (Brandon et al. 2008b) and it is likely that this mechanism is conserved among nematoceran Diptera (a). As amino acids are essential for the transcriptional activation of digestive enzymes, we speculate a competition mechanism exerted by Galactosamine with amino acids in sandfly enterocytes. In our experiments, adding 30 mM amino acids to human blood supplemented with 15mM Galactosamine abrogated the galactosamine effect of reduction in *Lu. longipalpis* gut trypsinolytic activity. Galactosamine is taken up by sandfly enterocytes and compete with amino acids for an amino acid-sensing molecule (receptor?), impairing trypsin transcription through TOR activation (b). TOR involvement in sandfly trypsin production can be inferred by the reduction in *Lu. longipalpis* trypsin activity by supplementing a blood meal with rapamycin (a specific TOR inhibitor).



Supplemental figure 1: **Galactose, N-acetyl-galactosamine and glucosamine were not able to induce reduction of the trypsinolytic activity in the sandfly *Lu. longipalpis*.** Each plot point represents the trypsinolytic activity (mOD x min⁻¹/insect) of individual sandfly guts dissected at 24 or 48 hours after artificial blood meals containing human heparinised blood, human heparinised blood plus galactosamine (15mM) and human heparinised blood plus Galactose (15 and 30mM) (A), N-acetyl-galactosamine (15mM)(B) or Glucosamine (15mM)(C). Crossbars represent the median. * indicates statistical difference at $p \leq 0.05$; (Kruskal-Wallis and Dunn's post test).



Supplemental figure 2: **Broad spectrum antibiotic treatment was able to significantly reduce sandfly gut microbiota.** Bars represent number of CFUs per sandfly gut 24 hours after the blood feed. *represents statistical difference at $p \leq 0.05$ (t-Test).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG 2014. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect. Genet. Evol.* 28: 691–703.
- Aguiar G, Vilela M, Lima R 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 583–584.
- Alexander B, Usma M 1994. Potential sources of sugar for the phlebotominae sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 543–549.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M de 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7.
- Araújo, V. E.; Pinheiro, L. C.; Almeida, M. C.; De Menezes, F. C.; Morais, M. H.; Reis, I. A.; Assunção, R. M.; Carneiro, M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7(11), p. e2540, 2013.
- Ashford R 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269–1281.
- Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol* 21: 568–572.
- Backer J 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17.
- Bar-Peled L, Sabatini DM 2014. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol* 24: 400–406.
- Barros VC, Assunção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4.
- Bates P a 2007a. International Journal for Parasitology. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Bates PA 2007b. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Blanford S, Chan BHK, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF 2005. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science* (80-.). 308: 1638–1641.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL 1998. 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.* 188: 1941–1953.
- Borovsky D SY 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 1: 235–242.
- Brandon M, Pennington J, Isoe J, Zamora J, Schillinger A 2008a. TOR signaling is required

- for amino acid stimulation of early trypsin protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 916–922.
- Brandon MC, Pennington JE, Isoe J, Zamora J, Schillinger AS, Miesfeld RL 2008b. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 916–922.
- Brasil 2007. Secretaria de vigilância epidemiológica em saúde. *Minist. da Saúde*.
- Carpenter VK, Drake LL, Aguirre SE, Price DP, Rodriguez SD, Hansen IA 2012a. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J. Insect Physiol.* 58: 513–522.
- Carpenter VK, Drake LL, Aguirre SE, D. DPP, Stacy Rodriguez and IAH 2012b. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J Insect Physiol.* 58: 513–522.
- Casanova C, Natal D, Santos F a M 2009. Survival, population size, and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.* 46: 42–50.
- Chaniotis B 1974a. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol* 11: 73–79.
- Chaniotis BN 1974b. Psychodidae) Under Experimental Conditions I.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 872–882.
- Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J 1992. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69: 1227–1236.
- Cirimotich CM, Dong YM, Clayton AM, Souza-Neto JA., Mulenga M, Dimopoulos G 2010. Bacteria-Mediated Resistance to Plasmodium Infection in Anopheles Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83: 259–260.
- Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* 10: 307–310.
- Deng Y, Chen C, Yu H, Diao H, Shi C, Wang Y, Li G, Shi M 2017. Oridonin ameliorates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis. *Am. J. Transl. Res.* 9: 4271–4279.
- Diaz-Albiter H, Sant’anna MR, Genta F a, Dillon RJ 2012. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 287: 23995–24003.
- Dillon RJ, Dillon VM 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71–92.
- Dillon RJ, Lane R 1993a. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med. Vet. Entomol.* 7: 225–232.
- Dillon RJ, Lane RP 1993b. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol. Res.* 79: 492–496.

- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5.
- Dostálová A, Volf P 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5: 276.
- Fazito do Vale V, Pereira MH, Gontijo NF 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Insect Physiol.* 53: 1151–1159.
- Genaro, O.; Da Costa, C. A.; Williams, P.; Silva, J. E.; Rocha, N. M.; Lima, S. L.; Mayrink, W. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 23(2), p. 121, 1990.
- Giraud E, Lestinova T, Derrick T, Martin O, Dillon RJ, Volf P, Müller I, Bates PA, Rogers ME 2018. Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling (SM Beverley, Ed.). *PLOS Pathog.* 14: e1006794.
- Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez M, Mendes D, Hernandez-Avila J 2003. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* 40: 371–374.
- GRACASOUZA A, MAYAMONTEIRO C, PAIVASILVA G, BRAZ G, PAES M, SORGINE M, OLIVEIRA M, OLIVEIRA P 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 322–335.
- Gramiccia M GL 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 35: 1169–1180.
- Hansen I, Attardo G, Roy S, Raikhel A 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J Biol Chem* 280: 20565–20572.
- Harhay M, Olliaro P, Costa D, Costa C 2011a. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403–409.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN 2011b. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27: 403–409.
- Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan K 2005. Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Society* 69: 79–100.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kamhawi S, Lawyer PG, Fay MP, Germain RN, Sacks D 2009. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (80-.)*. 321: 970–974.
- J L, SG K, J B 2014. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.*
- Jia R, Zhang H, Zhang W, Zhao H, Zha C, Liu Y 2017. Protective effects of tenuigenin on lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced acute liver injury. *Microb. Pathog.* 112: 83–88.
- Kamhawi S 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.* 2: 1765–1773.

- Kamhawi S 2006a. Phlebotominae sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22: 439–445.
- Kamhawi S 2006b. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 22: 439–445.
- Kaphingst KA, Persky S, Lachance C 2010. NIH Public Access. 14: 384–399.
- Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JME, Freitas YBN SM, Melo AECDS, Campos MP, Alves ND WG 2018. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis.*: 1–8.
- Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, Kirby JR, Valenzuela JG, Kamhawi S, Wilson ME 2017. The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum* (SM Beverley and A Sher, Eds.). *MBio* 8.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279–289.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD 1977. The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 13: 429–440.
- Lainson R 2010. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 1: 13–32.
- Lainson R, Rangel E 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 811–827.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *Acad. Press*: 1–20.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis - the Neotropical Leishmania species. *Microbiol. Microbiol Infect. Ed. Topley Wilson's* 9: 243–266.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 239–242.
- Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Dias ES 2017. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 176: 109–113.
- Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR da, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, Pimenta PFP, Marcondes M 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Vet. Parasitol.* 196.
- Lehane M 2005. *The Biology of blood-Sucking in insects.*
- Lima-Silva T 2015. Manipulação da fisiologia digestiva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

- Psychodidae): efeito da Galactosamina na atividade tripsinolítica intestinal do principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas.
- Lindoso JAL, Lindoso AABP 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 51: 247–253.
- Maes M, Vinken M, Jaeschke H 2016. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 290: 86–97.
- Marques, L. H. S.; Rocha, I. C. M.; Reis, I. A.; Cunha, G. M. R.; Oliveira, E.; Pfeilsticker, T. R.; Araújo, V. E. M.; Morais, M. H. F.; Rabello A.; Carneiro, M. *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. *Parasitology*, v. 29, p. 1-11, 2016.
- McMichael AJ 2004. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: Past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359: 1049–1058.
- Mendonça LZ De, Resende LA, Lanna MF, Aguiar-Soares RDDO, Roatt BM, Castro RADOE, Batista MA, Silveira-Lemos D, Gomes JDAS, Fujiwara RT, Rezende SA, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Dutra WO, Reis AB, Giunchetti RC 2016. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors* 9: 1–12.
- Miot HT 2014. Caracterização de componentes da via TOR (target of rapamycin) em *Trypanosoma cruzi*.
- Misawa H, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Shimada Y, Hattori Y 2017a. Prostacyclin mimetics afford protection against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 334: 55–65.
- Misawa H, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Shimada Y, Hattori Y 2017b. Prostacyclin mimetics afford protection against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 334: 55–65.
- Modi GB, Tesh RB 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Ent.* 20(5): 568–569.
- Molyneux D, Moore J, Maroli M 1991. Sugar in sandflies. *Parassitologia* Suppl: 431–436.
- Moura AP V., Santos LCB, Brito CRN, Valencia E, Junqueira C, Filho AAP, Sant'Anna MRV, Gontijo NF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Gazzinelli RT, McKay CS, Sanhueza CA, Finn MG, Marques AF 2017. Virus-like Particle Display of the α -Gal Carbohydrate for Vaccination against *Leishmania* Infection. *ACS Cent. Sci.* 3: 1026–1031.
- Oliveira F, Carvalho AM de, Oliveira CI de 2013. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. *Front. Immunol.* 4: 1–8.
- OLIVEIRA, C. D. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*, v. 17(5), p. 1231-9, 2001.
- OPAS 2018. *Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas*. Washington.
- Paes LR do NB 2016. Distribuição espaçotemporal dos casos humanos de leishmaniose

tegumentar americana notificados no Estado do Rio de Janeiro de 2001 a 2013 e associação com variáveis clínicas e populacionais.

(PAHO) PAHO 2015. *Leishmaniasis. World Health Organization. Américas.*

Park J, Attardo G, Hansen I, Raikhel A 2006. GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 281: 11167–11176.

Peng Z, Gong X, Yang Y, Huang L, Zhang Q, Zhang P, Wan R, Zhang B 2017. Hepatoprotective effect of quercetin against LPS/D-GalN induced acute liver injury in mice by inhibiting the IKK/NF- κ B and MAPK signal pathways. *Int. Immunopharmacol.* 52: 281–289.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kamhawi S, Lawyer PG, Fay MP, Germain RN, Sacks D 2009. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (80-.)*. 321: 970–974.

Pimenta P, Modi G, Pereira S, Shahabuddin M, Sacks D 1997. A novel role of the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359–369.

Podinovskaia M, Descoteaux A 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 10: 111–129.

Pruzinova K, Sadlova J, Myskova J, Lestinova T, Janda J, Volf P 2018. *Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases. *Parasites and Vectors* 11: 1–9.

Pumpini C, Demaio J, Kent M, Davis J, Beier J 1996. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 214–218.

Ramirez JL, Souza-Neto J, Cosme RT, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: 1–11.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA 1986. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 347–349.

Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, Reis LES, Cardoso JM de O, Mathias FAS, Brito RCF de, Silva SM da, Gontijo NDF, Ferreira S de A, Valenzuela JG, Corrêa-Oliveira R, Giunchetti RC, Reis AB 2017. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Front. Immunol.* 8.

Rogers M 2012. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol.* 28: 223.

Rogers M, Chance M, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495–508.

- Rogers M, Hajmová M, Joshi M, Sadlova J, Mwyer D, Volf P 2008. Leishmania chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol.* 10: 1363–1372.
- Rogers M, Ilg T, Nikolaev A, Ferguson M, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463–467.
- Rogers ME, Corware K, Muller I, Bates PA 2010. Leishmania infantum proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, Lutzomyia longipalpis, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. *Microbes Infect.* 12: 875–879.
- Roque ALR 2009. Avaliação do Potencial de Pequenos Mamíferos e Importância de Animais Domésticos na Manutenção dos Ciclos de Transmissão de Tripanossomatídeos: Trypanossoma cruzi , Leishmania infantum e Leishmania braziliensis.
- Roque ALR, Jansen AM 2014. Hospedeiros e reservatórios de leishmania sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópicos. I.
- Roy SG, Raikhel AS 2012a. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito Aedes aegypti. *Faseb J.* 26.
- Roy SG, Raikhel AS 2012b. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito Aedes aegypti. *FASEB J.* 26: 1334–1342.
- SES - Secretaria de Saúde de Minas Gerais 2015. Dados de Leishmaniose Visceral. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/component/search/?all=leishmaniose&area=all>. Acesso em setembro 2018.
- SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2015. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso setembro 2018.
- SMSA-PBH “Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura de Belo Horizonte” 2016. Vigilância Epidemiológica da leishmaniose visceral. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?app=saude&idConteudo=188390>. Acesso em setembro 2018.
- Sant’Anna MR, Diaz-Albiter H, Aguiar-Martins K, Salem WS Al, Cavalcante RR, Dillon VM, Bates P a, Genta F a, Dillon RJ 2014. Colonisation resistance in the sand fly gut: Leishmania protects Lutzomyia longipalpis from bacterial infection. *Parasit. Vectors* 7: 329.
- Sant’anna MR, Diaz-Albiter H, Mubaraki M, Dillon RJ, Bates PA 2009. Inhibition of trypsin expression in Lutzomyia longipalpis using RNAi enhances the survival of Leishmania. *Parasit. Vectors* 2: 62.
- Sant’Anna MR, Diaz-Albiter H, Mubaraki M, Dillon RJ, Bates PA 2009. Inhibition of trypsin expression in Lutzomyia longipalpis using RNAi enhances the survival of Leishmania. *Parasites and Vectors* 2: 1–10.
- Santos VC, Vale VF, Silva SM, Alves A, Nascimento S, Alvim N, Saab A, Pedro R, Soares P,

- Suzan M, Michalick M, Araujo RN, Pereira MH, Fujiwara RT, Gontijo NF 2014. Host Modulation by a Parasite : How *Leishmania infantum* Modifies the Intestinal Environment of *Lutzomyia longipalpis* to Favor Its Development. 9: 1–9.
- Schlein Y 1986. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today* 2: 175–177.
- Serafim TD, Coutinho-abreu I V, Oliveira F, Meneses C, Valenzuela JG, Molecular V, Section B, Diseases I 2018. Sequential blood meals augment vector infectiousness by promoting *Leishmania* replication and triggering amplification of metacyclics via a novel retroleptomonad developmental stage. *Nat Microbiol.* 3: 548–555.
- Shaw JJ 1999. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In Contributions to the knowledge of Diptera. In: Florida, p. .
- Shaw JJ, Lainson R, Ward RD 1972. Leishmaniasis in Brazil. VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 718–723.
- Shaw JJ, Travassos da Rosa AP, Souza A, Cruz AC 2003. *Transmissão de Outros Agentes: Os Flebotomíneos Brasileiros como Hospedeiros e Vetores de Determinadas Espécies.*
- Shimabukuro PHF, Galati EAB 2011. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentário sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop.* 11.
- Stamper LW, Patrick RL, Fay MP, Lawyer PG, Elnaiem DEA, Secundino N, Debrabant A, Sacks DL, Peters NC 2011. Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5.
- Telleria EL 2007. Caracterização de Tripsinas em *Lutzomyia longipalpis* – Principal Vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil.
- Telleria EL, Araújo APO de, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM 2010. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* - expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum* chagasi. *PLoS One* 5: 1–8.
- Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigão-Farias JR, de Araújo AP R-OJ, YM T-C 2007. Constitutive and Blood Meal-Induced Trypsin Genes in *Lutzomyia longipalpis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 66: 53–63.
- Vijayakumar S, Das P 2018. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. *Acta Trop.* 181: 95–104.
- Volf P, Kiewegová a., Svobodová M 1998. Sandfly midgut lectin: Effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med. Vet. Entomol.* 12: 151–154.
- Volf P, Svobodová M, Dvoráková E 2001. Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: Effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Med. Vet. Entomol.* 15: 281–286.
- Ward 1990. Some aspects of the biology of phlebotominae sand fly vectors. *Adv Dis Vector Res. Harris KF:* 91–126.
- WHA 2007. *Resolution from the 16 World Health Assembly.*
- WHO 2010. *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of*

Leishmaniases -Control of the Leishmaniases. Geneva.

WHO 2016. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 10.1186/1750-9378-2-15.Voir.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4.

Young DG, Duncan MA 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*.