

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Manipulação da fisiologia digestiva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): efeito da Galactosamina na atividade tripsinolítica intestinal do principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas.

Tatiana Lima da Silva

Belo Horizonte

2015

Tatiana Lima da Silva

Manipulação da fisiologia digestiva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): efeito da Galactosamina na atividade tripsinolítica intestinal do principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas.

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo

Belo Horizonte

2015

AGRADECIMENTOS

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 da coordenadora Prof^a. Érika Martins Braga.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, prof. Maurício, que após onze anos morando no Reino Unido, retornou ao Brasil e me deu a oportunidade de ser sua primeira aluna na pós-graduação da UFMG e por compartilhar comigo o seu vasto conhecimento. Pela confiança depositada, pelos ensinamentos, paciência e pelo apoio. Estendo o agradecimento a Dra. Juliana, sua esposa, a quem gentilmente nos auxiliou na parte biomolecular, e a Isabelinha, por compartilhar o tempo do papai comigo.

Ao meu coorientador, prof. Nelder, chefe do laboratório, que com muita paciência e sabedoria nos conduz de uma maneira muito didática. Que não mede esforços para nos ajudar, e por ser o professor mais disponível que eu já conheci. Está sempre de portas abertas, literalmente, e em qualquer momento nos atende. Tanto fez por nós que o seu nome virou alcunha da turma, turma do “Naldo”. A ele, meu respeito e agradecimento.

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 ao Adalberto, Alexandre e Kel, doutorandos que contribuíram sobremaneira nos meus experimentos, me orientando e me auxiliando. A Letícia e a Paula, colegas de turma e do mesmo laboratório, pela parceria e cumplicidade. Agradeço por tudo o que me ensinaram e por toda a ajuda que vocês me deram.

À Monique, que ainda recém-chegada no laboratório, na apresentação do meu projeto, foi essencial na conclusão deste. E esteve do meu lado neste último ano, me dando sábios

conselhos, me orientando, independente do dia e hora. A convivência com ela me fez uma acadêmica melhor.

À turma do Naldo, pela parceria, momentos de desespero (à época dos créditos), momentos de alegria, e pelo principal, por me fazerem acreditar em mim e no meu potencial. Não posso deixar de citar Débora (nossa doutoranda “from” Natal) e Ivana, que me ajudaram a revisar conteúdos importantes. Dani, Pri, Jordana, Joyce, Marco Túlio, Warlen Shake, Carol, Nathalie, Alcina, Gigi...por todos os conselhos e por poder compartilhar o fardo.

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

Ao César, nosso exemplar Técnico de laboratório e quem nos socorre o tempo todo, pela presteza e gentileza nos cuidados com a colônia. Sua competência está acima de qualquer tentativa de descrição de minha parte.

À Dra. Ana Flávia, amiga de infância e ex-aluna do departamento, que foi minha grande incentivadora e motivadora. E que sempre esteve disponível para me ajudar em todos os momentos de dificuldades, mesmo após a mudança para Brasília.

Ao Dr. Zenón Rodríguez Batista, professor da graduação em Enfermagem, que despertou em mim o interesse pela parasitologia.

A minha amiga do coração, Leila, minha primeira coordenadora em pesquisa, que mesmo longe me ajuda e me ampara nos momentos de desânimo. E a quem tenho como exemplo a ser seguido. Sei também que ficará orgulhosa com o término de mais um trabalho e que independente de tudo está sempre torcendo por mim.

À Dra. Rafaela Paim, pelo auxílio na parte de Biologia molecular. Aos nossos pós-doutorandos: Vladimir, Vânia, Erich e Elizângela, que de certa forma sempre nos ajudam, tirando dúvidas e dando conselhos.

Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, coordenado pelos professores Daniella Bartholomeu e Ricardo Fujiwara, por disponibilizarem o uso dos equipamentos.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Alice, pelo amor e grande incentivo aos estudos; meus irmãos Janaína e Carlos; meus cunhados Cícero e Viviane pelo carinho e apoio incondicional

em todos os momentos. Por serem o meu berço e serem as pessoas mais amadas da minha vida e entenderem minha ausência.

Aos meus sobrinhos Cauan (afilhado), Arthur e Thainá (ainda na barriga da mamãe) que são os xodós da família e por me encherem de alegria.

Ao meu noivo, Heitor, por ser o melhor companheiro que eu poderia ter. Sem o seu amor, carinho e cuidado eu não teria conseguido finalizar este trabalho. Que, apesar da distância, esteve comigo em todos os momentos, desde o início me ouvindo, me incentivando e apoiando. Amo você.

Ao meu sogro, sogra e cunhados, minha família mato-grossense, por me acolherem tão bem nas idas à Cuiabá.

Às pessoas que participam ativamente da minha vida, amigas do coração, a quem recorro nos momentos de fragilidade: Jaqueline, Geysa, Suellen e Bruna. Obrigada pela amizade, apoio e torcida.

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

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

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

Dedico este trabalho aos meus amados pais.

A minha querida avó Terezinha, irmãos e demais familiares.

Ao Heitor pelo amor, respeito e cuidado.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 LEISHMANIOSES	17
1.2 <i>LEISHMANIA</i>	18
1.3 FLEBOTOMÍNEOS.....	19
1.5 ENZIMAS DIGESTIVAS E FATORES DETERMINANTES PARA SOBREVIVÊNCIA DE <i>LEISHMANIA</i> DURANTE A DIGESTÃO DO SANGUE.	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3.2.1. Tratar fêmeas de <i>L. longipalpis</i> com uma mistura de antibióticos de largo espectro (Penicilina/Streptomicina/Gentamicina) para verificar o efeito da eliminação da microbiota de <i>L.</i> <i>longipalpis</i> ;.....	31
3.2.2. Investigar a ação dos anticoagulantes Citrato de Sódio e Heparina na atividade tripsinolítica de <i>L. longipalpis</i> utilizados durante alimentações artificiais;.....	31
3.2.3. Investigar a ação da Galactosamina (um açúcar aminado) na redução da atividade tripsinolítica de <i>L. longipalpis</i> ;.....	31
3.2.4. Comparar a ação da Galactosamina na redução da atividade tripsinolítica no intestino de <i>L.</i> <i>Longipalpis</i> com moléculas estruturalmente semelhantes (Galactose e Glicosamina);	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS INSETOS UTILIZADOS;	32
4.2. TRATAMENTO DE <i>L. longipalpis</i> COM ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO PARA ELIMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;.....	32
4.3. INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DO ANTICOAGULANTE NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. longipalpis</i> ;	32
4.4. INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. longipalpis</i> ;.....	34
4.4.1. Estudo da reversão da redução da atividade tripsinolítica no intestino de <i>L. Longipalpis</i> causada pela Galactosamina através da suplementação do sangue com uma mistura de aminoácidos;.....	34

4.4.2. Investigação da ação da Galactose na redução da atividade tripsinolítica de <i>L. longipalpis</i> em comparação com a ação da Galactosamina;	35
4.4.3. Investigação da ação da Glicosamina na redução da atividade tripsinolítica de <i>L. longipalpis</i> em comparação com a ação da Galactosamina;	35
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA;	36
5. RESULTADOS	37
5.1. TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS DE LARGO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ;	37
5.2. A INTERFERÊNCIA DO USO DE ANTICOAGULANTES NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DO INTESTINO DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ;	38
5.3. AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ;	41
5.4. REVERSÃO DA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA NO INTESTINO DE <i>L. LONGIPALPIS</i> PELA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO DO SANGUE COM UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS;	42
5.5. AÇÃO DA GALACTOSE EM COMPARAÇÃO COM GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ;	44
5.6. AÇÃO DA GLICOSAMINA EM COMPARAÇÃO COM A AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ;	45
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Grau celsius

cDNA – DNA complementar

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

Ct – *Cycle Threshold* (limiar de ciclo)

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

qPCR – *Real time quantitative PCR*

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: Ciclo biológico dos flebotomíneos;.....	20
Figura 2: Fêmea de <i>L. longipalpis</i> ;.....	20
Figura 3: Desenho esquemático do ciclo biológico das leishmanioses;.....	22
Figura 4-A: Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> dentro de macrófagos;.....	24
Figura 4-B: Formas nectomonadas de <i>Leishmania</i> escapam da matriz peritrófica e se ligam no epitélio intestinal;.....	24
Figura 4-C: Formas nectomonadas migrando para o intestino anterior;.....	24
Figura 4-D: Produção da matriz gelatinosa de proteoglicanos (PSG) pelas formas leptomonadas;.....	24
Figura 5-A: Desenho esquemático do tubo digestivo <i>P. papatasi</i> ;.....	25
Figura 5-B: Foto do trato digestivo de fêmea de <i>L. longipalpis</i> dissecado;.....	25
Figura 6: Aparelho Hemotek utilizado em alimentações artificiais de insetos hematófagos;.....	32
Figura 7: Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) por intestino;.....	36
Figura 8: Atividade tripsinolítica do intestino de <i>L. longipalpis</i> após repasto em hospedeiro humano;.....	38
Figura 9: Atividade tripsinolítica do intestino de <i>L. longipalpis</i> após repasto artificial utilizando sangue humano citratado;.....	39
Figura 10: Atividade tripsinolítica do intestino de <i>L. longipalpis</i> após repasto artificial utilizando sangue humano heparinizado;.....	40
Figura 11: Galactosamina reduz a produção de tripsina do intestino médio de <i>L. longipalpis</i> ;.....	41
Figura 12: Reversão em parte do efeito de redução da atividade tripsinolítica no intestino de <i>L. longipalpis</i> induzida por Galactosamina;.....	42
Figura 13: Atividade tripsinolítica do intestino médio de <i>L. longipalpis</i> após repasto artificial e ingestão de Galactosamina e Galactose;.....	43
Figura 14: Atividade tripsinolítica do intestino de <i>L. longipalpis</i> após ingestão de Galactosamina e Glicosamina em repasto artificial;.....	44
Figura 15: Estruturas cíclicas dos açúcares Glicosamina, Galactosamina e Galactose.....	50

RESUMO

As leishmanioses, consideradas antroponoses, são um complexo de doenças causadas por espécies de protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, sendo transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados por insetos pequenos denominados flebotomíneos. O agente etiológico da leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, é transmitido no Brasil aos hospedeiros principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). As fêmeas de flebotomíneos devem realizar a hematofagia para maturação dos ovários e realização da oviposição. *Leishmania* se desenvolve exclusivamente no interior do intestino das fêmeas, o que significa que o parasito será exposto a microorganismos residentes ou não. Devido ao hábito hematofágico das fêmeas 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. Os microorganismos adquiridos juntamente com a flora microbiana residente pode interferir na capacidade vetorial do inseto. A tripsina é uma das principais enzimas presentes no intestino desses vetores, tendo a função de digerir o sangue. Durante seu ciclo evolutivo no inseto vetor, *Leishmania* é mais susceptível à atividade de tripsina na transição da forma amastigota presente nos macrófagos recém-digeridos para as formas promastigotas, que são as formas responsáveis pelo desenvolvimento do parasito dentro do inseto vetor. O presente trabalho teve como objetivo manipular a fisiologia digestiva da espécie de flebotomíneo *L. longipalpis* no sentido de aumentar sua susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, além de tentar entender alguns dos mecanismos envolvidos no controle da atividade tripsinolítica no todo digestivo de *L. longipalpis*. Os resultados mostraram que é possível reduzir a flora bacteriana com uma solução de antibióticos de largo espectro. A administração de 15 mM de Galactosamina foi suficiente para reduzir a atividade tripsinolítica intestinal no inseto. A administração de 30 mM de uma mistura de todos os aminoácidos foi capaz de reverter em parte este efeito produzido pela Galactosamina. A ingestão de 15 mM de Galactose e Glicosamina não exerceram efeito semelhante à Galactosamina, contudo, a Galactose aumentou a atividade tripsinolítica 48 horas após a alimentação. A presente dissertação gerou resultados que nos permitirão manipular a fisiologia digestiva de *L. longipalpis* no sentido de se obter flebotomíneos maciçamente infectados com *Leishmania*. O novo protocolo de infecção que pretendemos desenvolver envolve a manipulação da digestão e do sistema imune dos flebotomíneos ao mesmo tempo em que eles serão protegidos de infecções bacterianas e fúngicas com uso de antibióticos. Assim, acreditamos que seria possível obter insetos

homogeneamente infectados com bloqueio do intestino médio anterior e da válvula de estomodeu por acúmulo de PSG. Com esses insetos, seria possível implantarmos em Minas Gerais um sistema de desafio vacinal em pesquisas de novos antígenos capaz de sustentar os estudos de grupos de pesquisa brasileiros e até de outros países trabalhando em novas vacinas contra *L. infantum*.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*; *Leishmania*; tripsina; digestão; Galactosamina, vacina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*, being transmitted to their vertebrate hosts by small insects called sandflies. The causative agent of visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, in Brazil is mainly transmitted to their vertebrate hosts by the sand fly species *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). Female sand flies feed primarily on sugar solutions but need to bloodfeed to mature their ovaries and perform oviposition. *Leishmania* develop exclusively within the gut of the female sand fly and this means that *Leishmania* will be exposed to other microorganisms that are either resident or passing through the gut. Adult sand flies acquire their microbiota from several sources: during blood feeding on their animal hosts or from plants on which the adults feed. These microorganisms is acquired during their feed may interfere with sand fly vectorial capacity. Trypsins are one of the key enzymes in the sand fly gut, having the function to digest blood. During their life cycle inside their insect vector, *Leishmania* is more susceptible to trypsin activity during the transition from the amastigote form present in newly digested macrophages to promastigotes, which are the parasite form responsible for their development within the insect vector. This study aimed to manipulate the digestive physiology of the sand fly species *L. longipalpis* in order to increase their susceptibility to *Leishmania* infection and try to understand some of the mechanisms underlying trypsin production during sand fly blood digestion. The results showed that it is possible to reduce the cultivable bacterial flora using a broad spectrum antibiotic solution. The supplementation of 15 mM Galactosamine during bloodfeed was sufficient to reduce trypsin activity in the sand fly gut. The administration of a 30 mM mixture of all amino acids during bloodfeed supplemented with Galactosamine was able to partially reverse this effect produced by this amino sugar. However, the ingestion of galactose and glucosamine at 15mM did not reduce the trypsin activity in the *L. longipalpis* gut. Bloodmeal supplementation with Galactose increased the trypsinolytic activity in the sand fly gut 48 hours after feeding. This work has generated results that will allow us to manipulate the digestive physiology of *L. longipalpis* in order to obtain sand flies massively infected with *Leishmania*. The new sand fly infection protocol we intend to develop involves the manipulation of sand fly digestion and their innate immune system associated with the removal of bacterial and fungal infections by the use of antibiotics. This new treatment would generate massively infected sand flies with their anterior midgut and stomodeal valve blocked by the accumulation of PSG. With

these infected insects, it would be possible to create a sand fly facility producing insects to be used in vaccine challenges that aim to test new immunogenic antigens against *L. infantum*.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania*, trypsin, digestion, Galactosamine, vaccine.

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses, consideradas antropozoonoses, são um complexo de doenças causadas por espécies de protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Estão entre as doenças mais negligenciadas no mundo e estão presentes principalmente nos países pobres ou em desenvolvimento. É uma enfermidade cujo ciclo de transmissão há interação dos vetores, dos parasitos, reservatórios e hospedeiros. Ademais, os fatores ambientais, sociais, humanos e biológicos fazem essa enfermidade ainda mais complexa (OPAS 2013). As leishmanioses apresentam-se basicamente em duas formas clínicas diferentes, 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 e, quando não diagnosticada e tratada precocemente, poderá cursar para o óbito em até 90% dos casos (WHO 2014).

Como as leishmanioses estão relacionadas à pobreza, más condições sanitárias e má nutrição, o número de casos recai de maneira desproporcional nos segmentos mais empobrecidos da população global (Yamey & Torreele 2002, Alvar et al. 2008). É sabido que as populações com os piores Índices de Desenvolvimento Humano são as mais acometidas pelas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (Lindoso & Lindoso 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014), 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por *Leishmania* e cerca de 2 milhões de novos casos surgem anualmente das diferentes formas clínicas (1,5 milhões de casos para as formas tegumentares e 500.000 da forma visceralizante). Para Coura-Vital (2011), esses dados são subestimados, devido aos problemas de notificação de cada país. Atualmente, as doenças são registradas em 98 países em desenvolvimento ou mesmo desenvolvidos e presente nos cinco continentes (Europa, Ásia, África, América e Oceania), estimando-se uma prevalência de 14 milhões de casos e 59 mil óbitos (Alvar et al. 2012, WHO 2014). A grande maioria (90%) dos casos de LV ocorre no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (Soares & Turco 2003, Chappuis et al. 2007). Já a forma cutâneo-mucosa ocorre principalmente no Brasil, Bolívia e Peru que, juntos, representam cerca de 90% dos casos da doença. Com relação à leishmaniose cutânea, 90%

dos casos notificados concentram-se no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO 2014).

As leishmanioses estão presentes em todas as regiões do Brasil. Cerca de 3.000 e 28.000 casos de leishmaniose visceral e tegumentar são relatados por ano, respectivamente (Brasil 2010). No Brasil, a LT é causada por diferentes espécies de *Leishmania* e LV é causada apenas por *L. infantum*. LT e LV são mais prevalentes nas regiões Norte e Nordeste, respectivamente (Lindoso & Lindoso 2009).

1.2 LEISHMANIA

Os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, à classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, 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 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).

Nos hospedeiros vertebrados são encontradas as formas amastigotas (aflageladas), 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 (flageladas), que posteriormente serão regurgitadas na pele dos hospedeiros vertebrados durante a picada (Bates 2007).

1.3 FLEBOTOMÍNEOS

Os hospedeiros invertebrados das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, da subordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. Os flebotomíneos 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 1). São insetos pequenos (geralmente 2 a 4 mm de comprimento), de coloração palha ou castanho e com o corpo coberto por cerdas finas (Figura 2). As pernas e as antenas são longas e finas, possuem vôo 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.

Os criadouros de flebotomíneos são difíceis de localizar, sendo encontrados em detritos de rocha, cavernas, raízes do solo e folhas mortas e úmidas; também nas forquilhas das árvores e em tocas de animais, ou seja, ambiente úmido, mas não molhado, e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (Ferro et al. 1997). A grande diversidade de criadouros assim como o pouco conhecimento sobre as características detalhadas destes locais impede que haja um método de controle efetivo tendo como alvo as formas imaturas de flebotomíneos.

Os flebotomíneos são encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, podem ser conhecidos por diferentes nomes de acordo com sua ocorrência geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, asa dura, asa branca, cangalhinha, anjinho, entre outros. Algumas espécies de *Lutzomyia* são antropofílicas, picando em diferentes circunstâncias. O grau de antropofilia varia entre espécies, populações, e em contextos ecológicos. A maioria dos membros deste gênero são exofílicas, picando as pessoas

no ambiente extra-domiciliar. No entanto, algumas outras espécies (*L. longipalpis* e *L. intermedia*) adaptaram-se perfeitamente aos ambientes intra e peridomiciliar, atraídas pela presença do homem e dos seus animais domésticos, além de serem atraídas pela luz artificial geralmente encontrada nestes ambientes (Killick-Kendrick 1999, Sharma & Singh 2008).

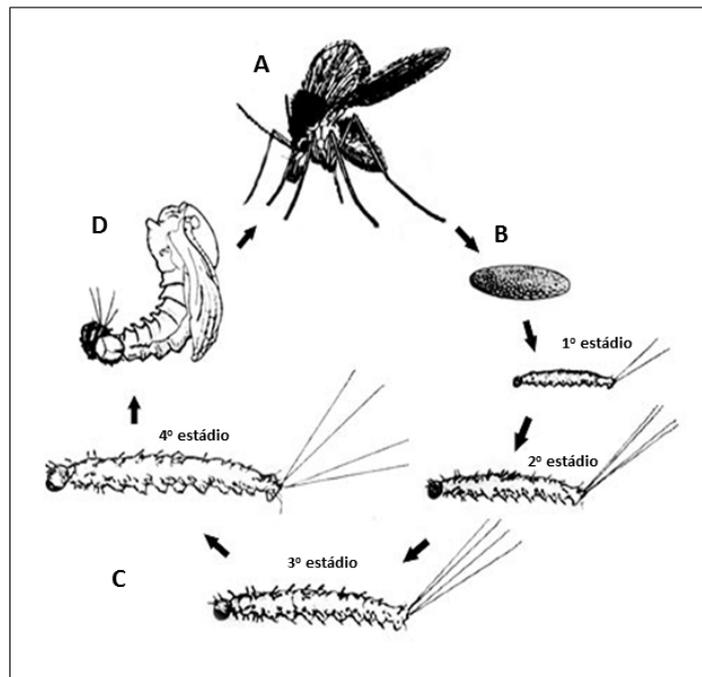


Figura 1 – Ciclo biológico dos flebotomíneos: A- Inseto adulto. B- Ovo com característica forma elíptica. C- 4 estádios larvais. D- Pupa. Fonte: <http://www.infectionlandscapes.org/2011/05/leishmaniasis.html>



Figura 2: Fêmea de *L. longipalpis* oriunda de colônia originária da cidade de Jacobina (Bahia) em repouso durante alimentação em hospedeiro humano. Foto gentilmente cedida por Ray Wilson.

As fêmeas dos dois principais gêneros, *Phlebotomus*, no velho mundo, e *Lutzomyia*, no novo mundo, são de importância médica como os únicos vetores comprovados de espécies de *Leishmania* patogênicas para os seres humanos (Young & Duncan 1994). Os machos e fêmeas de flebotomíneos se alimentam de substâncias açucaradas como fonte de energia, provenientes, por exemplo, de seiva de plantas e néctar de flores e secreções (Chaniotis 1974, Molyneux et al. 1991, Alexander & Usma 1994). Entretanto, somente as fêmeas necessitam de repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado para maturação dos ovos (Young & Duncan 1994). As peças bucais dos flebotomíneos são curtas e rígidas, por isso não se alimentam de sangue diretamente nos vasos sanguíneos. Assim, para obterem alimento as fêmeas dilaceram a pele do hospedeiro formando uma poça subcutânea de sangue e restos de tecido que então são ingeridos. Esse processo é chamado de telmatofagia e contribui para a transmissão das leishmanioses, uma vez que o parasito é encontrado principalmente na pele do hospedeiro vertebrado (Bates 2007).

As fêmeas têm hábitos alimentares crepuscular e noturno, e são atraídas para as residências pelo fototropismo positivo. Ao se alimentarem de sangue, as fêmeas de *L. longipalpis* injetam saliva no corpo de seus hospedeiros. Assim como em outros artrópodes hematófagos, a saliva destes insetos contém biomoléculas, tais como: vasodilatadores, antiagregantes plaquetários e inibidores do sistema complemento que são capazes de facilitar a implantação da infecção de *Leishmania* sp. nos hospedeiros vertebrados (Ribeiro 1987, Cavalcante et al. 2003).

No Novo Mundo, a transmissão das leishmanioses é efetuada por flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. *L. longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) é considerada a mais importante espécie transmissora da LV no Novo Mundo, com *L. cruzi* apresentando importância epidemiológica na transmissão de LV na região de Corumbá-MS (Harhay et al. 2011). Na América Latina, a doença está distribuída desde o México até a Argentina e possui como agente etiológico o protozoário *Leishmania infantum* (Young & Duncan 1994). Como todos os flebotomíneos, *L. longipalpis* é primordialmente uma espécie silvestre e ainda pode ser capturada em florestas primárias afastadas de habitações humanas. Porém, nenhuma outra espécie se adaptou tão bem aos ambientes domésticos e peridomésticos (Shaw 1999, Lainson & Rangel 2005).

1.4 CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania* EM SEUS HOSPEDEIROS VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS

Os hospedeiros vertebrados das espécies de *Leishmania* incluem uma ampla gama de mamíferos, incluindo roedores, canídeos e o próprio homem (Pereira Filho 2014). Durante a picada das fêmeas de flebotômíneos 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 proteoglicanos filamentosos denominada de PSG (do inglês “Promastigote Secretory Gel”) (Rogers et al. 2002, 2004). Estas formas promastigotas são rapidamente internalizadas por células fagocíticas, principalmente macrófagos, onde se transformam nas formas amastigotas (com flagelo internalizado), arredondadas e imóveis, que se multiplicam dentro do fagolisossomo (Podinovskaia & Descoteaux 2015). Conforme os parasitos vão se multiplicando, os macrófagos se rompem, liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos (Figura 3).

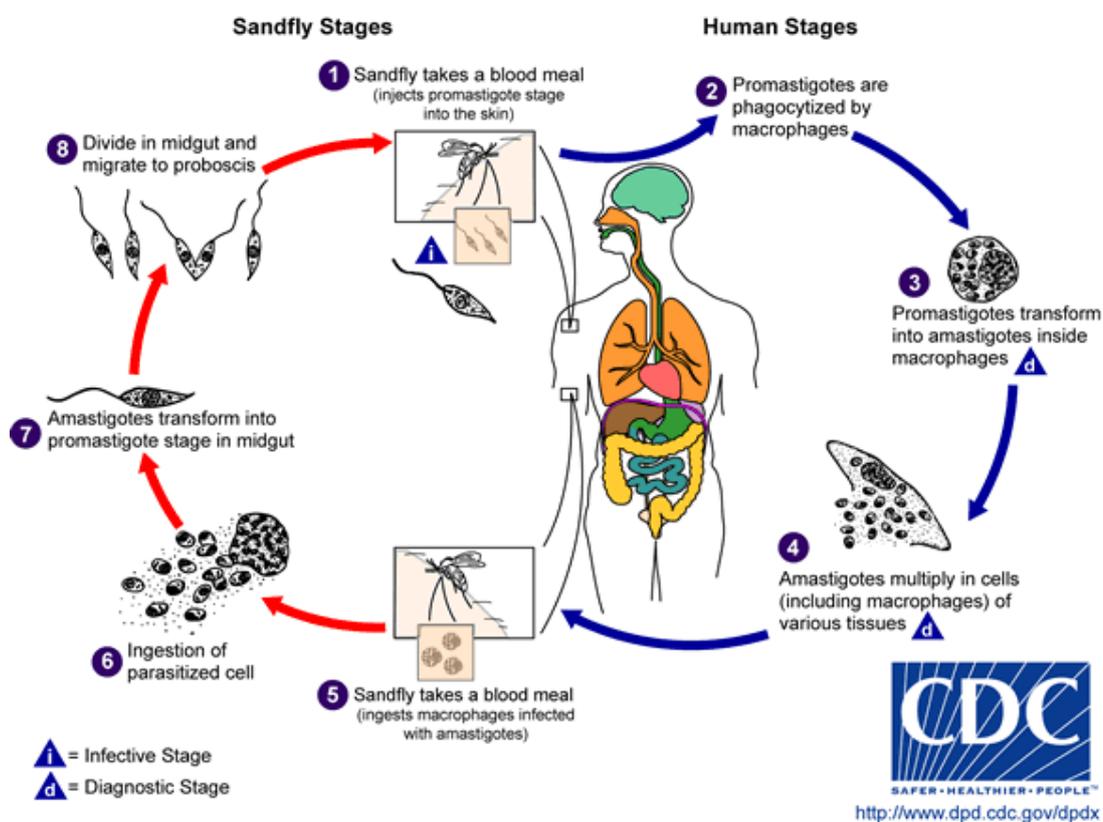
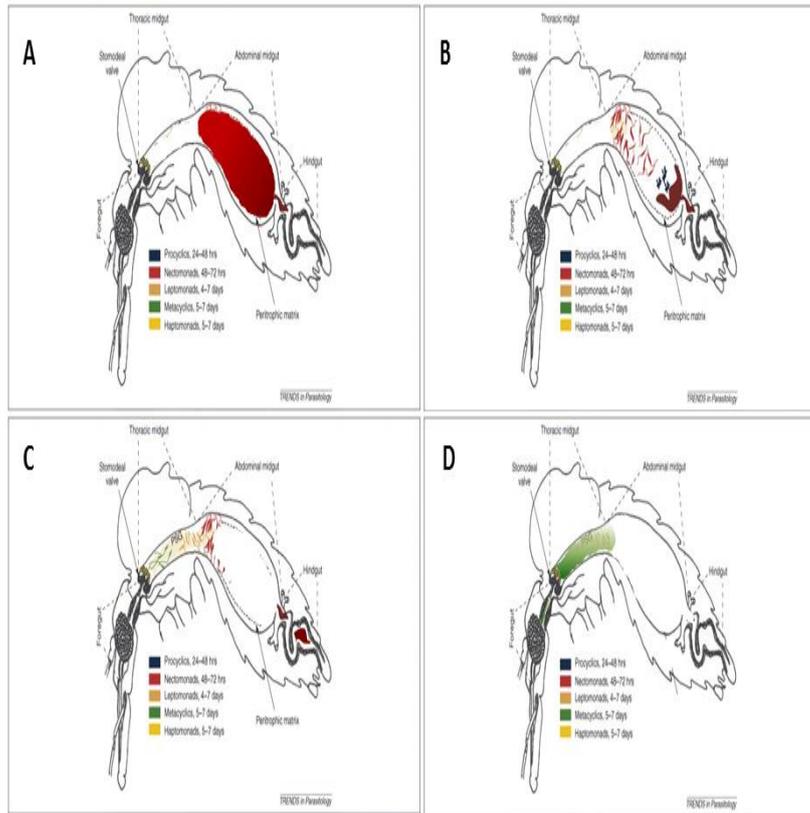


Figura 3: Desenho esquemático do ciclo biológico das leishmanioses. Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx.

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) (Figura 4A). 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) (Figura 4B), se ligam ao epitélio intestinal e se movem em direção ao intestino anterior, mais tarde se transformam em promastigotas curtas chamadas de formas leptomonadas (Bates 2007) (Figura 4C). 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 aderirem ao epitélio intestinal do inseto 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 2007).

Por fim, as formas leptomonadas que são responsáveis pela rápida expansão no intestino médio anterior transformam-se na forma metacíclica (formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, caracterizadas por serem curtas, com longo flagelo, extremamente móveis e não replicativas), que são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo feito exclusivamente pelas fêmeas (Rogers 2012). As formas leptomonadas produzem a matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos que obstrui o intestino anterior e intestino médio anterior, facilitando a transmissão das formas promastigotas metacíclicas para um hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo infectante (Figura 4D). 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.



Adaptado de Kamhawi, 2006

Figura 4: Desenvolvimento de uma espécie de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Leishmania* no intestino de uma fêmea de flebotomíneo. (A) As formas amastigotas de *Leishmania* dentro de macrófagos são ingeridas junto com o sangue durante o repasto, sendo este envolto pela matriz peritrófica. (B) As formas nectomonadas de *Leishmania* escapam da matriz peritrófica e se ligam no epitélio intestinal. (C) 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. (D) Produção da matriz gelatinosa de proteofosfoglicanos (PSG) pelas formas leptomonadas e oclusão da porção anterior do intestino médio e intestino anterior. Esquema modificado (Kamhawi 2006).

1.5 ENZIMAS DIGESTIVAS E FATORES DETERMINANTES PARA SOBREVIVÊNCIA DE *LEISHMANIA* DURANTE A DIGESTÃO DO SANGUE.

Em relação à morfologia interna, os flebotomíneos apresentam um intestino anterior, intestino médio e posterior (Figura 5A). O intestino anterior é formado pelo cibário, faringe, esôfago e divertículo. A sucção do alimento é permitida através do funcionamento das bombas cibarial e faringiana, localizadas nas regiões do cibário e faringe (Santos 2010).

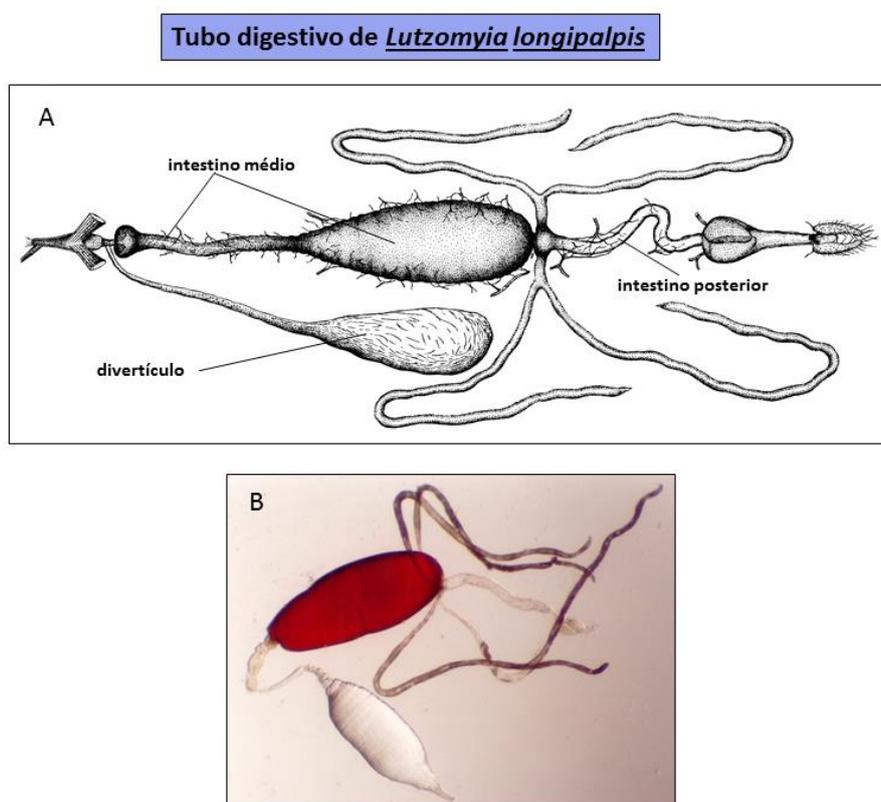


Figura 5: (A) Desenho esquemático do tubo digestivo de *P. papatasi*, mostrando o divertículo e intestinos médio e posterior. Desenho adaptado de Jobling 1987. (B) Foto do trato digestivo de fêmea de *Lutzomyia longipalpis* dissecado após repasto sanguíneo, evidenciando o intestino médio repleto de sangue e divertículo repleto de solução açucarada. Foto gentilmente cedida por Nelder F. Gontijo.

O intestino médio dos insetos constitui a maior parte do tubo digestivo, é o órgão responsável pelo armazenamento e digestão do sangue ingerido durante o repasto; e também pela digestão dos carboidratos que, em princípio, ficam armazenados no divertículo (Santos

2010) (Figura 5B). O intestino médio é composto por um epitélio constituído de uma monocamada de células colunares cilíndricas densamente cobertas por microvilosidades voltadas para o lúmen intestinal. Estas células estão ativamente envolvidas na produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes (Billingsley & Lehane 1996) e se apoiam numa lâmina basal fina, que separa o tubo digestivo da hemocele do inseto (Rudin & Hercker 1982). Assim como ocorre em outros insetos, nos flebotomíneos a superfície da membrana basal encontra-se envolvida por fibras musculares longitudinais e circulares, que formam uma rede muscular responsável pelos movimentos de todo o intestino durante a passagem dos alimentos (Billingsley & Lehane 1996, Andrade-Coelho et al. 2001, Santos 2010). A ligação do intestino médio com o intestino anterior se dá pela válvula de estomodeu.

Ao exercerem a hematofagia em seus hospedeiros vertebrados, as fêmeas de flebotomíneos liberam a saliva que contém componentes com funções anticoagulantes e vasodilatadoras, que auxiliarão no processo alimentar (Charlab et al. 1999). A ingestão de sangue por fêmeas de flebotomíneos induz respostas fisiológicas no intestino médio do inseto, incluindo a produção de uma matriz peritrófica, secreção de enzimas digestivas e diurese (Kamhawi 2006). De uma maneira geral, após realizar o repasto sanguíneo (entre 1 e 4 horas), inicia-se a formação de uma camada amorfa, composta de proteínas, proteoglicanos e quitina, denominada de matriz peritrófica. Ela exerce função de proteção, já que, ao envolver o bolo alimentar, evita a abrasão nas paredes do intestino, além de proteger contra proliferação bacteriana, infecções virais e parasitárias (Gusmão 2002a, Pascoa 2002, Kamhawi 2006). Outra função importante é permitir a permeabilidade de enzimas e seus produtos da digestão entre o interior e o exterior da matriz (Telleria 2007).

A matriz peritrófica reveste todo o intestino médio dos insetos, separando o lúmen intestinal das células do epitélio digestivo, e é a única região que está em contato com o meio externo representado pelo sangue. Há duas formas de matriz peritrófica, os tipos I e II. A do tipo I é sintetizada após o repasto sanguíneo, e do tipo II sintetizada de forma constitutiva (Gusmão 2002b). O processamento do sangue ingerido se dá em aproximadamente quatro dias.

A assimilação dos nutrientes por insetos e outros organismos ocorre após o processamento dos alimentos por enzimas digestivas. As enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas são chamadas de peptidases ou proteases e podem ser classificadas de acordo com a natureza química do sítio catalítico ou pela reação catalisada (Barret 1994). As

peptidases são divididas em serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases ou metaloproteases, de acordo com a natureza química do sítio catalítico (Fazito do Vale 2008). Tripsinas são serino-proteases que clivam proteínas preferencialmente na porção carboxílica de aminoácidos básicos como arginina e lisina e são caracterizadas pela tríade catalítica histidina, ácido aspártico e serina. São consideradas as mais importantes enzimas digestivas no intestino médio de insetos dípteros hematófagos (Sant'anna et al. 2009). Sua forma inativa é denominada tripsinogênio, que ao sofrer uma clivagem em sua porção N-terminal, torna-se ativa. Ao serem ativadas, elas podem ativar sua própria forma inativa ou outros zimogênios (Santos 2010).

No intestino médio de flebotomíneos não alimentados a atividade proteolítica é basal e a ingestão de sangue é que induz a secreção de enzimas digestivas (Dostálová & Volf 2012). Níveis significantes de atividade proteolítica podem ser detectados 6 horas após o repasto sanguíneo, atingindo pico de expressão entre 36 e 48 horas após a alimentação, dependendo da fonte alimentar e da espécie de flebotomíneo. O pH ótimo dessas endoproteases está entre 7.5 e 9.5 e, baseado em resultados utilizando-se inibidores específicos, verificou-se que estas enzimas são serino proteases, principalmente tripsinas e quimiotripsinas (Dillon & Lane 1993, Telleria et al. 2010, Dostálová & Volf 2012). O sequenciamento de ESTs de três espécies de flebotomíneos (*P. papatasi*, *P. perniciosus* e *L. longipalpis*) identificou transcritos que codificam enzimas digestivas, principalmente tripsinas e quimiotripsinas (Dillon et al. 2006, Ramalho-Ortigão et al. 2007, Dostálová et al. 2011). Telleria e colaboradores (2007) descreveram dois cDNAs codificantes para tripsinas em *L. longipalpis*, um deles codificando uma tripsina de expressão constitutiva (chamada de *Lltryp2*) e outro codificando uma tripsina cuja expressão é induzida pelo repasto sanguíneo (*Lltryp1*). Além de tripsinas e quimiotripsinas, transcritos de outras enzimas digestivas têm sido identificados e descritos no intestino de flebotomíneos, incluindo metalocaboxipeptidases, metaloproteases e aminopeptidases (Dostálová et al. 2011).

Alguns trabalhos desenvolvidos no passado verificaram que a atividade proteolítica desencadeada pela digestão do sangue causa um impacto no desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestivo de seu inseto vetor. Alguns destes estudos mostraram uma redução do número de promastigotas de *Leishmania* no tubo digestivo de flebotomíneos que não são seus vetores naturais durante o início do processo de digestão (Lawyer et al. 1990, Schlein & Jacobson 1998). Schlein e Romano (1986) mostraram que a infecção de *P. papatasi* com *L.*

major promove a diminuição da atividade proteolítica do inseto vetor, enquanto que *L. donovani* que não é transmitida por *P. papatasi* promove aumento da produção de proteases. O envolvimento de algumas enzimas proteolíticas nesta redução do número de promastigotas de *Leishmania* no intestino de flebotomíneos pode ser melhor elucidado pela utilização de inibidores específicos. A adição do inibidor de tripsina de soja durante a infecção artificial de *P. papatasi* com *L. donovani* aumentou a sobrevivência do parasito no intestino do inseto (Borovsky D 1987). Por outro lado, a adição de inibidores de quitinase causou um aumento na sobrevivência de *L. major* em *P. papatasi* devido ao aumento em espessura da matriz peritrófica, o que causou um retardamento na velocidade de difusão das enzimas digestivas (Pimenta et al. 1997). Rogers e colaboradores (2008) ajudaram ainda mais a elucidar o efeito de enzimas digestivas na colonização do intestino de flebotomíneos por *Leishmania*. A suplementação do repasto infectivo de *L. longipalpis* com quitinase reduziu o número de promastigotas de *L. mexicana* no intestino do inseto vetor, enquanto que a suplementação extra deste mesmo repasto infectivo com um inibidor de tripsina reverteu o efeito deletério da quitinase em *Leishmania*.

Outros estudos mostraram que *Leishmania* é capaz de modular o nível de proteases no intestino médio após um repasto sanguíneo infeccioso e que a diminuição da atividade tripsinolítica é realmente benéfica para o desenvolvimento de formas promastigotas no intestino dos insetos vetores (Sant'anna et al. 2009, Telleria et al. 2010). Recentemente, Santos e colaboradores (2014) mostraram que a redução de pH reduz a eficiência de enzimas proteolíticas e também a redução de fornecimento de aminoácidos para os entrócitos de *L. longipalpis*. Esta diminuição reduz o estímulo para a produção de proteases, considerando que a mesma é regulada pelo abastecimento de aminoácidos, levando a um atraso na digestão. Este mecanismo de redução da atividade proteolítica pela alteração do pH, embora necessite ser mais estudado, poderia ser utilizado por *Leishmania* para manipular a fisiologia digestiva do inseto vetor em prol do seu próprio desenvolvimento.

Estudos de fisiologia digestiva de flebotomíneos realizados por Volf e colaboradores (1998) mostraram que a administração do açúcar aminado Galactosamina juntamente com o repasto infectante para *P. Duboscqi* aumentou a taxa de infectividade desta espécie de flebotomíneo por *L. major*. Os autores discutem que este açúcar aminado provavelmente inibiria lectinas no intestino desta espécie de flebotomíneo que aglutinaria parasitas, facilitando o estabelecimento de *Leishmania* no intestino do inseto vetor. Posteriormente,

Volf e colaboradores (2001) mostraram que a administração de Galactosamina na alimentação de flebotomíneos causa mudanças drásticas no processo de digestão. Neste trabalho, a administração de altas doses (100 mM) de Galactosamina foi capaz de bloquear a produção de tripsina no intestino de *P. duboscqi*. Esta redução (principalmente a redução moderada) 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).

Desta forma, a atividade proteolítica no intestino de flebotomíneos, além de ser responsável pela digestão, é uma das barreiras que reduz a competência de *Leishmania* em se desenvolver no compartimento intestinal. Portanto, a habilidade de escapar da atividade proteolítica no intestino do inseto vetor seria um fator determinante para o sucesso ou não da progressão da infecção.

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 esses 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 atingir grande sucesso na obtenção de sangue, sucesso reprodutivo e elevada 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 (como nos casos de transmissão natural) em comparação com infecções iniciadas por injeção com parasitos ressuspensos em salina estéril ou PBS (Abdeladhim et al. 2014). A geração de flebotomíneos superinfectados com *Leishmania*, com alta proporção de formas metacíclicas

infectantes 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.

Por este motivo, o presente trabalho teve como objetivo manipular a fisiologia digestiva da espécie de flebotomíneo *L. longipalpis* (principal vetor de *L. infantum* nas Américas) no sentido de aumentar sua susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, além de tentar entender alguns dos mecanismos envolvidos no controle da atividade tripsinolítica no tubo digestivo de *L. longipalpis*. Desta forma, a manipulação da fisiologia digestiva pode oferecer uma importante contribuição para aumentar os conhecimentos gerais sobre esta espécie de flebotomíneo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Manipulação da fisiologia digestiva de *L. longipalpis* através da redução da atividade tripsinolítica no intestino do inseto vetor no intuito de aumentar sua susceptibilidade à infecção por *Leishmania*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Tratar fêmeas de *L. longipalpis* com uma mistura de antibióticos de largo espectro (Penicilina/Streptomicina/Gentamicina) para verificar o efeito da eliminação da microbiota de *L. longipalpis*;

3.2.2. Investigar a ação dos anticoagulantes Citrato de Sódio e Heparina na atividade tripsinolítica de *L. longipalpis* utilizados durante alimentações artificiais;

3.2.3. Investigar a ação da Galactosamina (um açúcar aminado) na redução da atividade tripsinolítica de *L. longipalpis*;

3.2.4. Comparar a ação da Galactosamina na redução da atividade tripsinolítica no intestino de *L. Longipalpis* com moléculas estruturalmente semelhantes (Galactose e Glicosamina);

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 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 (50mg/mL), de acordo com as exigências determinadas pelo comitê de ética animal do ICB-UFMG. Esta colônia foi 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 ELIMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DO INSETO;

Grupos de fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram alimentadas desde a eclosão com uma solução de sacarose (30% em água destilada) contendo Penicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), Streptomina (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 grupo de 3 intestinos de insetos tratados e não tratados com a mistura de antibióticos, 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 ambos os grupos.

4.3. INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DO ANTICOAGULANTE NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. longipalpis*;

Grupos de fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram tratados desde o nascimento com uma mistura de antibióticos de largo espectro adicionada à solução de sacarose de acordo com metodologia descrita no item 4.2. No quarto dia após o tratamento, dois grupos (um tratado com antibióticos e outro sem este tratamento) foram alimentados na região abdominal de um

hospedeiro humano através de um pote plástico de 11 cm de altura por 10 cm de diâmetro com tampa plástica revestida de malha fina. Outros dois grupos (um tratado com antibióticos e outro sem este tratamento) foram alimentados artificialmente em aparelho Hemotek (figura 6) com sangue humano citratado (diluição de 1/10 do sangue em 109 mM de citrato de sódio em PBS). Os últimos dois grupos (um tratado com antibióticos e outro sem este tratamento) foram alimentados artificialmente em aparelho Hemotek com sangue humano heparinizado (2 unidades de heparina por mL de sangue). Após os respectivos tratamentos os flebotomíneos foram dissecados a 24, 48 e 72 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). 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.

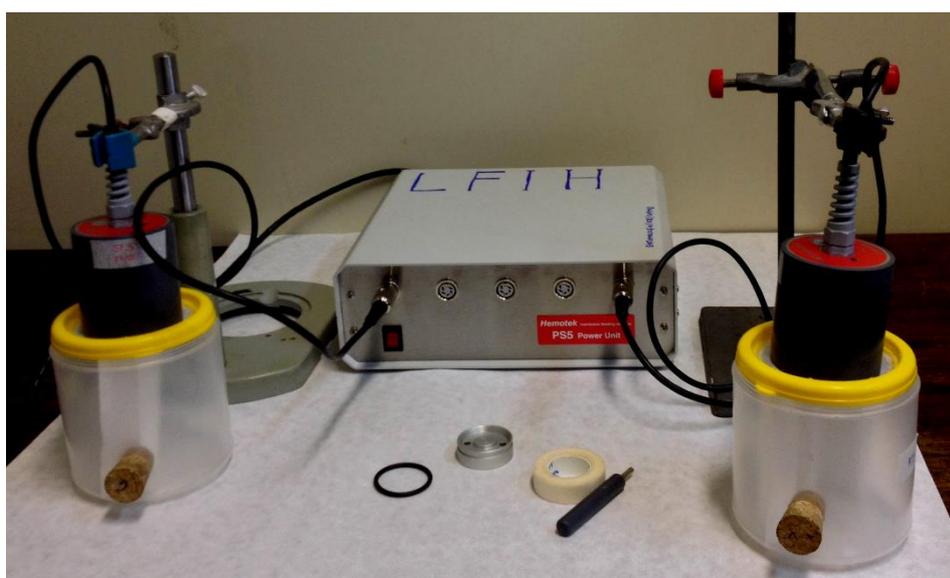


Figura 6: Aparelho Hemotek utilizado em alimentações artificiais de insetos hematófagos

4.4. INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. longipalpis*;

Cinco grupos de fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram tratadas desde o nascimento com uma mistura de antibióticos de largo espectro adicionada à solução de sacarose de acordo com metodologia descrita no item 4.2. No quarto dia após o tratamento, elas foram alimentadas artificialmente em aparelho Hemotek com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) nas concentrações finais de 5 mM, 10 mM, 15mM e 30 mM, adicionados ao sangue humano heparinizado (2 unidades por mL). Os insetos controle receberam somente sangue heparinizado. Após o repasto sanguíneo, os insetos foram mantidos em gaiolas sendo alimentados com a mesma solução de sacarose com antibióticos por três dias. No quarto dia, os intestinos das fêmeas alimentadas foram dissecados 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de metodologia descrita no item 4.3.

4.4.1. Estudo da reversão da redução da atividade tripsinolítica no intestino de *L. Longipalpis* causada pela Galactosamina através da suplementação do sangue com uma mistura de aminoácidos;

Quatro grupos de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram tratados desde o nascimento com uma mistura de antibióticos de largo espectro adicionada à solução de sacarose a 30%. No quarto dia, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparinizado (2 unidades por mL). O segundo grupo foi alimentado com Galactosamina adicionada a sangue heparinizado na concentração de 15 mM mais uma solução de aminoácidos também na concentração de 15 mM. O terceiro grupo foi alimentado com Galactosamina adicionada a sangue heparinizado na concentração de 15 mM mais uma solução de aminoácidos na concentração final de 15 mM e o quarto grupo foi alimentado com Galactosamina adicionada a sangue heparinizado na concentração de 15 mM mais uma solução de aminoácidos na concentração final de 30 mM. A suplementação do repasto sanguíneo com aminoácidos partiu de uma solução estoque preparada da mistura de outras três soluções com os seguintes componentes:

- Solução A: MEM solução de aminoácidos (50x) - SIGMA-M5550

- Solução B: 178 mg de alanina, 266 mg de ácido aspártico, 294 mg de ácido glutâmico, 150 mg de glicina, 230 mg de prolina, 210 mg de serina em 50 mL de água destilada;
- Solução C: 2336 mg de glutamina, 120 mg de asparagina preparados em 20 mL de água destilada;

Para este experimento foi considerado que o sangue já contém aproximadamente 5 mM de aminoácidos totais. Após o repasto sanguíneo, os insetos foram mantidos nas gaiolas sendo tratados com a mesma solução de sacarose com antibióticos. Os intestinos das fêmeas alimentadas foram dissecados em 24 e 48 horas após o repasto e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA, de acordo com metodologia descrita no item 4.3, para verificação da possibilidade de reversão da redução da atividade tripsinolítica causada pela Galactosamina.

4.4.2. Investigação da ação da Galactose na redução da atividade tripsinolítica de *L. longipalpis* em comparação com a ação da Galactosamina;

Quatro grupos de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram tratados desde o nascimento com uma mistura de antibióticos de largo espectro adicionada à solução de sacarose a 30%. No quarto dia, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com o açúcar aminado Galactosamina (D-(+)-Galactosamine hydrochloride, SIGMA-G0500) na concentração final de 15mM, adicionada a sangue humano heparinizado (2 unidades por mL). Outros dois grupos foram alimentados com o açúcar Galactose (D (+) Galactose, SIGMA-G0750) nas concentrações finais de 15 mM e 30 mM, respectivamente. Insetos controle receberam somente sangue heparinizado. Após o repasto sanguíneo, os insetos foram mantidos nas gaiolas sendo alimentados com a mesma solução de sacarose com antibióticos por três dias. No quarto dia, os intestinos das fêmeas alimentadas foram dissecados 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA de acordo com metodologia descrita no item 4.3, para verificação da influência da galactose na atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*.

4.4.3. Investigação da ação da Glicosamina na redução da atividade tripsinolítica de *L. longipalpis* em comparação com a ação da Galactosamina;

Neste experimento, quatro grupos de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram tratados desde o nascimento com uma mistura de antibióticos de largo espectro adicionada à

solução de sacarose a 30%. No quarto dia, um dos grupos foi alimentado artificialmente em aparelho Hemotek com o açúcar aminado Galactosamina na concentração final de 15 mM, adicionada a sangue humano heparinizado (2 unidades por mL); e o outro grupo foi alimentado com Glicosamina na concentração final de 15 mM em sangue heparinizado. Insetos controle receberam somente sangue heparinizado. Após o repasto sanguíneo, os insetos foram mantidos nas gaiolas sendo alimentados com a mesma solução de sacarose com antibióticos por três dias. No quarto dia, os intestinos das fêmeas alimentadas foram dissecados 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA de acordo com metodologia descrita no item 4.3, para verificação da influência da Glicosamina na atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA;

Os dados foram analisados utilizando o software Prism 5 (GraphPad Software). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram testadas por ANOVA e teste-T para comparações entre os grupos. No caso de variáveis que não apresentaram distribuição normal, as análises foram feitas com Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para comparações entre os grupos. O nível de significância estatística foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS DE LARGO ESPECTRO PARA REDUÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE *L. LONGIPALPIS*;

Para verificar se o tratamento com antibióticos seria eficaz na eliminação da flora intestinal de *L. longipalpis*, os insetos foram submetidos 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. Posteriormente, os insetos foram dissecados e um grupo de 3 intestinos foram plaqueados em meio LB/Ágar, realizando-se diluições seriadas para permitir a contagem das unidades formadoras de colônias (CFUs). 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 7).

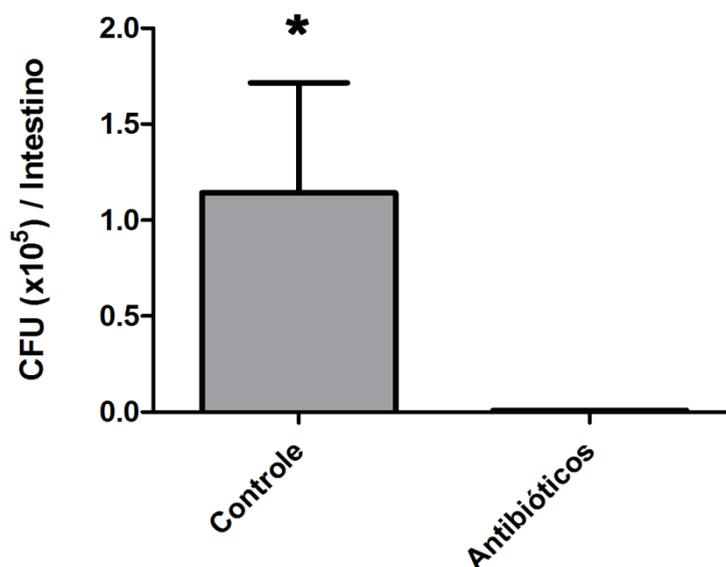


Figura 7: Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) por intestino, obtidas de 3 amostras de 3 intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* tratadas (Antibióticos) e não tratadas com antibióticos (controle). * representa diferença estatística em $p \leq 0.0001$ (t-test).

5.2. A INTERFERÊNCIA DO USO DE ANTICOAGULANTES NA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DO INTESTINO DE *L. LONGIPALPIS*;

Para avaliar se os anticoagulantes usados nos experimentos de alimentação artificial exercem alguma interferência na fisiologia intestinal de insetos hematófagos, foram realizados três experimentos para testar o efeito de dois anticoagulantes comumente utilizados: Citrato de Sódio e Heparina.

No primeiro experimento, um grupo de fêmeas de *L. longipalpis* foi tratado com uma solução de antibióticos de largo espectro (Streptomicina, Penicilina e Gentamicina) misturada à solução de sacarose 30% durante três dias desde a eclosão. Os insetos de um outro grupo não receberam tratamento com antibióticos para avaliar se o tratamento com antibióticos altera a atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*. No quarto dia, foi realizado repasto sanguíneo na região abdominal de um hospedeiro humano. Posteriormente, os intestinos das fêmeas foram dissecados a 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA, utilizando-se o substrato sintético BApNA como descrito no item 4.3. Quando o inseto realiza repasto diretamente em hospedeiro vertebrado, observa-se um aumento significativo da atividade tripsinolítica no intestino a 48 horas após o repasto em relação a 24 horas após a alimentação. Observa-se também uma queda da atividade tripsinolítica a 72 horas após o repasto, que coincide justamente com o término da digestão de flebotomíneos criados sob as condições de temperatura e umidade do nosso laboratório ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). O tratamento com antibióticos não exerceu alteração na atividade tripsinolítica em comparação ao grupo não tratado (figura 8).

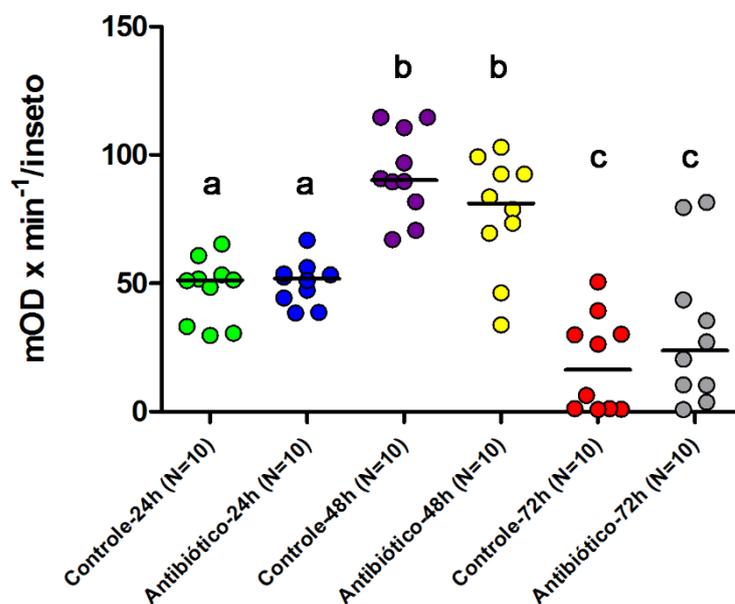


Figura 8: Atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* após repasto em hospedeiro humano. Cada ponto do gráfico representa a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados em 24, 48 e 72h após o tratamento. Insetos do grupo denominado controle não foram tratados com antibióticos. Barras transversais representam a mediana. Letras sobre os grupos indicam diferentes grupos estatísticos (T-test $p \leq 0.011$ entre grupos a e b; $p \leq 0.0355$ entre grupos a e c).

No segundo experimento, um grupo de fêmeas de *L. longipalpis* foi tratado com uma solução de antibióticos de largo espectro (Streptomicina, Penicilina e Gentamicina) misturada à solução de sacarose 30% durante três dias desde a eclosão. Os insetos de um outro grupo não receberam tratamento com antibióticos para avaliar se o tratamento com antibióticos altera a atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* na presença do anticoagulante citrato de sódio. No quarto dia, foi realizado repasto sanguíneo artificial em aparelho Hemotek com sangue humano que continha Citrato de Sódio como anticoagulante (109 mM em PBS). Posteriormente, os intestinos das fêmeas foram dissecados com 24, 48 e 72 horas e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA, utilizando-se o substrato sintético BApNA. Neste experimento não ocorreu um aumento significativo da atividade tripsinolítica no intestino a 48 horas após o repasto em relação a atividade medida a 24 horas após a alimentação (figura 9). Este resultado contrasta com o resultado obtido quando os insetos se alimentaram de sangue diretamente do hospedeiro vertebrado, situação esta que se caracteriza pela ausência de anticoagulantes no sangue. Além disso, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na atividade tripsinolítica dos intestinos de insetos tratados com antibióticos em relação aos insetos não tratados com os mesmos a 48 horas após o repasto sanguíneo.

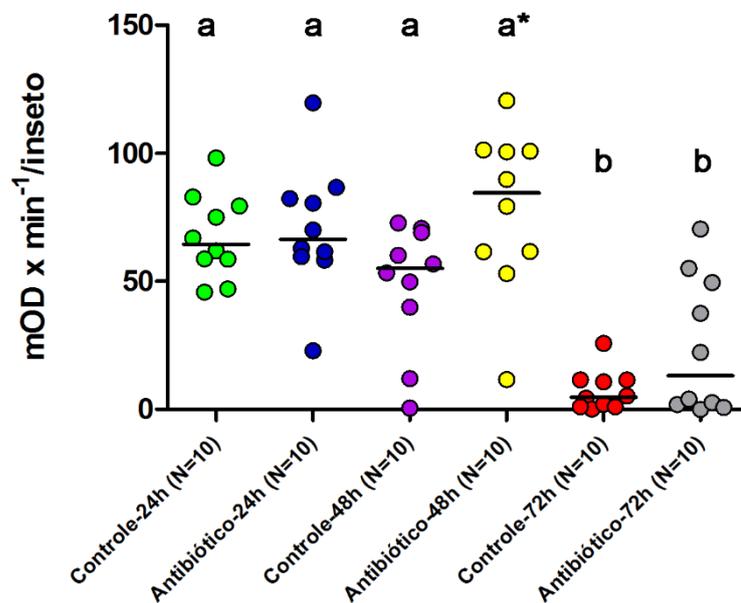


Figura 9: Atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* após repasto artificial utilizando sangue humano citratado. Cada ponto do gráfico representa a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados a 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Insetos do grupo denominado controle não foram tratados com antibióticos. Barras transversais representam a mediana. Letras sobre os grupos indicam diferentes grupos estatísticos (T-test, $p \leq 0.0011$ entre grupos a e b; $a^* p \leq 0.0288$ entre grupos controle e antibiótico a 48h após o repasto).

No terceiro experimento, um grupo de fêmeas de *L. longipalpis* foi tratado com uma solução de antibióticos de largo espectro (Streptomicina, Penicilina e Gentamicina) misturada à solução de sacarose 30% durante três dias desde a eclosão. Os insetos de um outro grupo não receberam tratamento com antibióticos para avaliar se o tratamento com antibióticos altera a atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* na presença do anticoagulante heparina. No quarto dia, foi realizado repasto sanguíneo artificial em aparelho Hemotek com sangue humano que continha Heparina como anticoagulante (16 unidades por mL de sangue). Posteriormente, os intestinos das fêmeas foram dissecados a 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA, utilizando-se o substrato sintético BApNA. De forma semelhante ao que ocorreu com o uso de Citrato como anticoagulante, não ocorreu um aumento significativo da atividade tripsinolítica no intestino a 48 horas após o repasto em relação a atividade medida a 24 horas após a alimentação para o grupo controle não tratado

com antibióticos (figura 10). Entretanto, houve um aumento significativo da atividade tripsinolítica do intestino a 48 horas depois do repasto entre os grupos tratados com antibióticos a 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo, situação que se assemelha mais à condição ideal quando os insetos se alimentam de sangue diretamente do hospedeiro vertebrado. Observou-se de novo uma redução estatisticamente significativa na atividade tripsinolítica dos intestinos de insetos tratados ou não com antibióticos a 72 horas após o repasto sanguíneo em relação aos tempos de 24 e 48 horas após a alimentação.

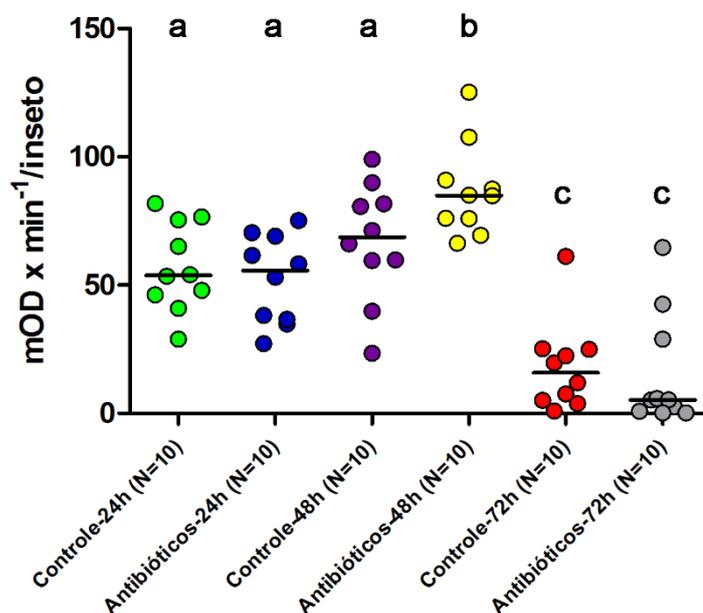


Figura 10: Atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* após repasto artificial utilizando sangue humano heparinizado. Cada ponto do gráfico representa a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados a 24h, 48, e 72h após o tratamento. Insetos do grupo denominado controle não foram tratados com antibióticos. Barras transversais representam a mediana. Letras sobre os grupos indicam diferentes grupos estatísticos (T-test, b- $p \leq 0.0002$ entre grupos Antibioticos-24h e Antibioticos-48h; $p \leq 0.0003$ entre grupos a e c).

5.3. AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. LONGIPALPIS*;

Grupos de fêmeas de flebotomíneos ingeriram diferentes quantidades de Galactosamina (concentração final de 5, 10, 15 e 30 mM), adicionada a sangue humano heparinizado. A alimentação artificial dos insetos foi feita utilizando-se pele de pintinho de 7 dias de idade em aparelho Hemotek. Os intestinos foram dissecados em 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA. Insetos controle alimentaram-se apenas de sangue

heparinizado. Observou-se uma redução significativa da produção tripsinolítica dose dependente no intestino de fêmeas tratadas com diferentes concentrações de Galactosamina 24 horas após o repasto. Esta redução também pode ser observada 48 horas após a alimentação (figura 11). Observações em lupa durante as dissecações dos insetos experimentais mostraram que nas fêmeas alimentadas com sangue mais Galactosamina, o sangue contido no abdômen era de tonalidade mais avermelhada e mais fluido em comparação com o grupo controle.

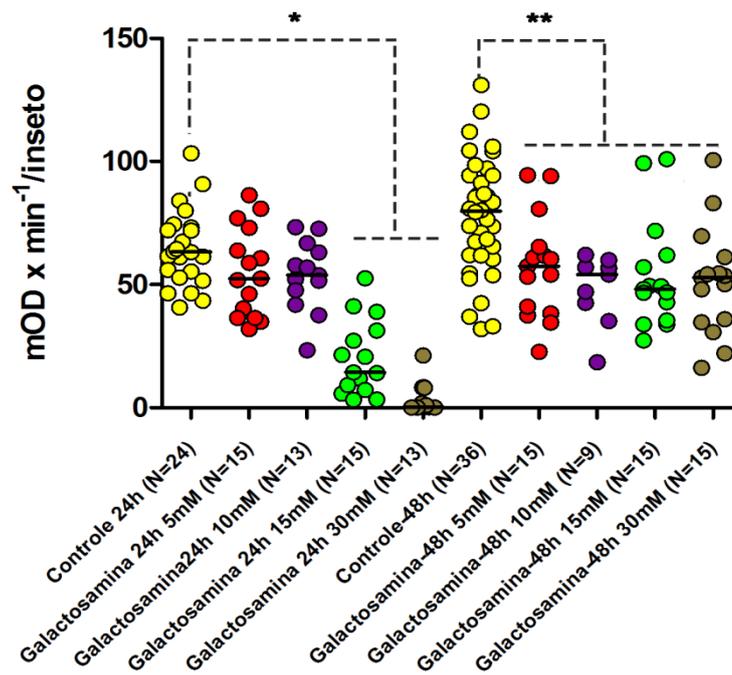


Figura 11: Galactosamina reduz a produção de tripsina do intestino médio de *L. longipalpis*. Cada ponto do gráfico representa a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados a 24h ou 48h após os tratamentos. Insetos controle foram alimentados 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.

5.4. REVERSÃO DA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA NO INTESTINO DE *L. LONGIPALPIS* PELA GALACTOSAMINA ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO DO SANGUE COM UMA MISTURA DE AMINOÁCIDOS;

Com o objetivo de entender o mecanismo da redução da atividade tripsinolítica exercido pela Galactosamina e de observar se a reversão desse processo seria possível pela presença de aminoácidos sendo captados pelos enterócitos, diferentes grupos de fêmeas de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* foram alimentados com: Galactosamina (concentração final de 15 mM), adicionada a sangue humano heparinizado; Galactosamina

(concentração final de 15mM) adicionada a uma mistura de aminoácidos com a concentração final de 15 ou 30mM; uma mistura de aminoácidos com a concentração final de 30mM em sangue heparinizado e um grupo controle que recebeu apenas sangue heparinizado. A alimentação artificial dos insetos foi feita utilizando-se pele de pintinho de 7 dias de idade em aparelho Hemotek. Os intestinos foram dissecados em 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando o substrato sintético BApNA. A administração de 30 mM de uma mistura de todos aminoácidos ao sangue foi capaz de reverter, em parte, a redução da atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* produzida pela Galactosamina no grupo dissecado 24horas após a alimentação (figura 12).

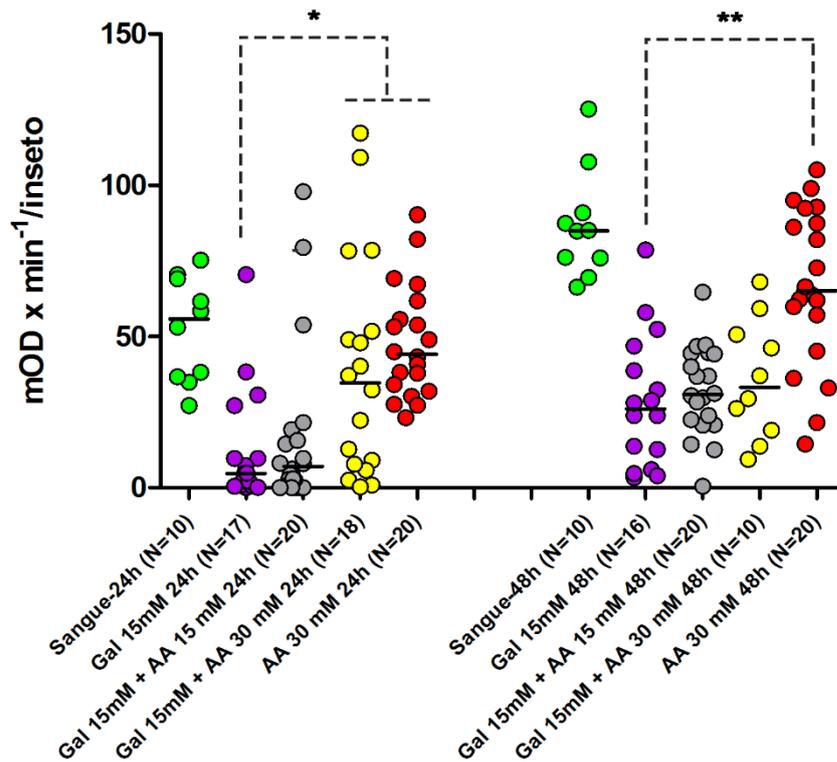


Figura 12: Uma mistura de aminoácidos adicionados ao sangue reverte em parte o efeito de redução da atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* induzida por Galactosamina. Cada ponto no gráfico indica a atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados a 24 ou 48h após os diferentes tratamentos. Insetos controle foram alimentados apenas com sangue humano heparinizado. Barras transversais representam a mediana. * indica diferença estatística em $p \leq 0.008$. ** indica diferença estatística em $p \leq 0.0002$ (Mann-Whitney Test). Resultados representam a soma de 2 experimentos independentes.

5.5. AÇÃO DA GALACTOSE EM COMPARAÇÃO COM GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. LONGIPALPIS*;

Um grupo de fêmeas de *L. longipalpis* ingeriu 15 mM de Galactosamina adicionada a sangue humano heparinizado. Outros dois grupos ingeriram Galactose na concentração final de 15 e 30 mM, também adicionados ao sangue heparinizado. A alimentação artificial dos insetos foi feita utilizando-se pele de pintinho de 7 dias de idade em aparelho Hemotek. Os intestinos foram dissecados em 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA. Insetos controle alimentaram-se apenas de sangue heparinizado. A atividade tripsinolítica do intestino de insetos tratados foi comparada entre os quatro grupos e constatou-se um aumento significativo na atividade tripsinolítica no intestino de insetos que alimentaram-se de sangue suplementado com 30 mM de Galactose em comparação com o grupo controle alimentado somente com sangue heparinizado, 48 horas após a alimentação (figura 13).

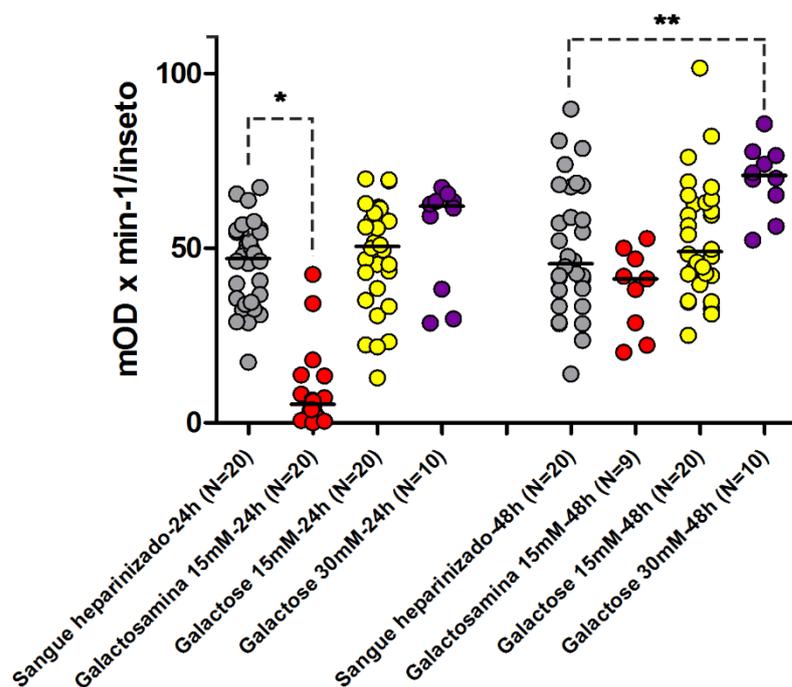


Figura 13: Atividade tripsinolítica do intestino médio de *L. longipalpis* após repasto artificial e ingestão de Galactosamina e Galactose. Atividade tripsinolítica (mOD x min-1 por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados em 24 e 48h após o tratamento com Galactosamina (15mM) e galactose (15 e 30 mM). Insetos controle foram alimentados somente com sangue heparinizado. Barras transversais representam a mediana. * indica diferença estatística em $p \leq 0.0001$. ** indica diferença estatística em $p \leq 0.0026$ (Mann-Whitney Test). Resultados representam a soma de 2 experimentos independentes.

5.6. AÇÃO DA GLICOSAMINA EM COMPARAÇÃO COM A AÇÃO DA GALACTOSAMINA NA REDUÇÃO DA ATIVIDADE TRIPSINOLÍTICA DE *L. LONGIPALPIS*;

Para investigar se a Glicosamina (um outro açúcar aminado) exerceria efeito semelhante a Galactosamina em reduzir a atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*, um grupo de flebotomíneos tratados com antibióticos ingeriu 15 mM de Galactosamina adicionada a sangue humano heparinizado e os insetos de outro grupo ingeriram Glicosamina na concentração final de 15 mM, também adicionado ao sangue heparinizado. A alimentação artificial dos insetos foi feita utilizando-se pele de pintinho de 7 dias de idade em aparelho Hemotek. Os intestinos das fêmeas foram posteriormente dissecados 24 e 48 horas após o tratamento e a atividade tripsinolítica medida através de ensaio em leitor de ELISA utilizando-se o substrato sintético BApNA. Insetos controle alimentaram-se apenas de sangue heparinizado. A atividade tripsinolítica do intestino de insetos tratados foi comparada entre os três grupos e a observação dos resultados mostraram que a Glicosamina, apesar de ser um d-isômero da Galactosamina, não reduz a atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* (figura 14).

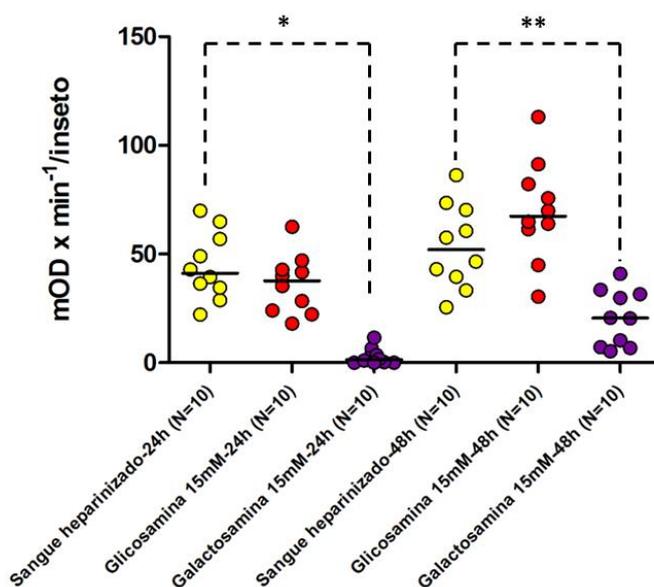


Figura 14: Atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* após ingestão de Galactosamina e Glicosamina em repasto artificial. A atividade tripsinolítica (mOD x min⁻¹ por inseto) de intestinos individuais de flebotomíneos dissecados em 24 e 48h, e após o tratamento com Galactosamina e Glicosamina a 15mM. Insetos controle foram alimentados somente com sangue heparinizado. Barras transversais representam a mediana. * indica diferença estatística em $p \leq 0.0001$. ** indica diferença estatística em $p \leq 0.0003$ (T-test).

6. DISCUSSÃO

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 o 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. No que diz respeito aos estágios larvais que se alimentam de fungos e bactérias que crescem em solo rico em matéria orgânica, é possível que microrganismos ingeridos pela larva resistam à absorção do intestino durante o processo de pupagem e colonizem o intestino do inseto adulto (Volf et al. 2002).

A flora microbiana residente pode proteger o hospedeiro indiretamente através do estímulo do sistema imune, através do aumento dos movimentos peristálticos do intestino, competição por nutrientes e sítios de adesão e alteração do pH intestinal (Dillon et al. 2005). Entretanto, apenas em alguns casos é possível o isolamento e identificação de bactérias cultiváveis para o estudo de possíveis mecanismos envolvidos no processo de exclusão competitiva (do inglês “colonisation resistance”), que representa o efeito protetor que bactérias da flora intestinal de vertebrados exercem sobre bactérias recém ingeridas, inclusive as consideradas patogênicas (Dillon & Dillon 2004). 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 capacidade vetorial de mosquitos (Cirimotich et al. 2011).

Podemos encontrar nos flebotomíneos dois tipos de microbiota: a flora residente que se forma no decorrer do ciclo de vida do inseto e as bactérias recém-adquiridas, provenientes dos hábitos alimentares de larvas e adultos. Recentemente, Sant’Anna e colaboradores (2014) realizaram um trabalho em que colonizaram o intestino de fêmeas de *L. longipalpis* com bactérias e leveduras extraídas do intestino de insetos coletados em uma zona endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. A colonização do intestino de fêmeas de *L. longipalpis* criadas em laboratório com estes microrganismos interferiu na capacidade de *L. mexicana* em colonizar estes flebotomíneos. Entretanto, o aumento da infecção por *Leishmania* através da redução da microbiota residente pelo tratamento dos insetos com antibióticos de largo espectro não foi

testado. A redução da microbiota residente teoricamente seria benéfica para o desenvolvimento de *Leishmania* no intestino de flebotomíneos.

Um dos nossos objetivos é a obtenção de flebotomíneos superinfectados com *Leishmania*. 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. 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 ressuspendidos em salina estéril ou PBS (Abdeladhim et al. 2014). 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.

Em nosso trabalho, manipulamos o ambiente intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, de maneira a diminuir as interferências provocadas por microrganismos no desenvolvimento de *Leishmania*. Os resultados alcançados nesta investigação nos mostrou que a eliminação de bactérias cultiváveis no intestino de *L. longipalpis* é possível e simples de ser reproduzida, uma vez a redução da flora é um fator importante a ser considerado para reduzir a competição entre microrganismos intestinais e *Leishmania*.

Uma outra questão abordada neste trabalho foi a interferência dos anticoagulantes usados em alimentações artificiais e a consequência destes na fisiologia intestinal de flebotomíneos. Os anticoagulantes são imprescindíveis para evitar a coagulação do sangue em experimentos cujos flebotomíneos são alimentados através de membrana. EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), Citrato de sódio e Heparina estão entre os mais usados em hematologia. O nosso objetivo foi avaliar dois anticoagulantes que estão entre os mais amplamente utilizados: Citrato de sódio e Heparina. Nos experimentos onde utilizou-se Citrato de sódio como anticoagulante para sangue humano, observou-se um grande impacto deste composto na atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*. Quando fêmeas desta espécie alimentam-se diretamente do sangue de hospedeiros mamíferos, observa-se um aumento significativo da atividade tripsinolítica à medida que a digestão progride, com pico

de atividade entre 36 e 48 horas após o repasto sanguíneo, como observado por Santos e colaboradores (2014). Quando o repasto foi realizado em alimentador artificial utilizando-se sangue humano citratado, não observamos um aumento da atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis* 48 horas após o repasto em comparação com a atividade registrada a 24 horas após a alimentação (figura 9), da mesma forma que observamos para o repasto em hospedeiro vertebrado. Isto levanta questões importantes quanto à interferência de anticoagulantes na fisiologia intestinal de artrópodes hematófagos, principalmente porque repastos artificiais em membranas são comumente utilizados para administração de uma ampla gama de compostos para estudos fisiológicos. Vários experimentos desta natureza não levam em conta a interferência que o tipo de anticoagulante utilizado pode trazer para o experimento em questão, o que pode levar a erros inerentes ao composto que está sendo testado.

O anticoagulante que mostrou melhor resultado em nossos experimentos foi a Heparina, uma vez que este composto apresentou o resultado mais próximo da alimentação realizada diretamente no hospedeiro mamífero (figura 10). Entretanto, vale ressaltar que a Heparina também causa impacto na atividade tripsinolítica intestinal do inseto vetor, embora este seja menor comparado ao Citrato de sódio. Por este motivo, várias dosagens daquele anticoagulante foram testadas e a menor dosagem possível para se evitar a coagulação de sangue humano foi a de 2 U/mL de sangue. Em um outro estudo, a Heparina também apresentou menor interferência no desenvolvimento de triatomíneos e na replicação de *Trypanosoma cruzi* no intestino do inseto vetor (Helena & Garcia 1995). Volf e colaboradores (2001) observaram que o uso de Heparina reduziu a atividade de tripsina em 12 e 72 horas após a alimentação. Contudo, a dosagem utilizada por estes pesquisadores tinha uma concentração final de 500 U/mL, ou seja, uma dosagem 250 vezes maior do que a utilizada em nossos experimentos. Da mesma forma, Schlein & Jacobson (1998) observaram diminuição de cerca de 30% na atividade de protease em fêmeas alimentadas com sangue heparinizado. Desse modo, a escolha do anticoagulante e suas dosagens em experimentos de alimentação artificial em artrópodes vetores poderia interferir sobremaneira nos resultados esperados e deveriam sempre ser avaliados com extremo critério.

Outra questão importante avaliada foi se o uso de antibióticos de amplo espectro nas dosagens utilizadas causaria alguma mudança na atividade tripsinolítica no intestino do inseto. Nós observamos que durante os experimentos em que realizamos alimentação artificial

dos flebotomíneos com anticoagulantes (Citrato de Sódio ou Heparina) houve um aumento na atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* tratadas com antibiótico em comparação com os insetos não tratados 48 horas após a alimentação. (Figuras 9 e 10). Este fenômeno não foi observado quando os flebotomíneos alimentaram diretamente de um hospedeiro humano (figura 8). Desta maneira, os efeitos benéficos que o uso de antibióticos de largo espectro causaria para o desenvolvimento de *Leishmania* no intestino de *L. longipalpis* se contrastam com o aumento da atividade tripsinolítica observada em alimentações artificiais onde anticoagulantes são administrados juntamente com antibióticos.

No inseto vetor, o desenvolvimento de *Leishmania* se restringe ao aparelho digestivo. Após o repasto infectante, há diversas barreiras naturais para o desenvolvimento satisfatório do parasito. Entre elas podemos citar: secreção de enzimas proteolíticas, a presença da matriz peritrófica e reações imunes inatas. À medida que a digestão progride, os parasitos precisam se ligar ao epitélio do intestino médio para evitar a expulsão dos mesmos juntamente com as excretas oriundas do final da digestão (Kamhawi, 2006; Dostálová & Volf 2012). Por estes motivos, selecionaram-se evolutivamente nestes parasitos adaptações que ajudam a garantir a sua sobrevivência em seus insetos vetores. Essas adaptações incluem secreção de fosfoglicanos por *Leishmania*, que protegem o parasita de enzimas digestivas; produção de quitinases que degradam a válvula de estomodeu (Rogers et al. 2008) e secreção de um neuropeptídeo que diminui o peristaltismo do intestino, facilitando sua ligação ao intestino para evitar sua expulsão (Kamhawi, 2006).

Durante seu ciclo evolutivo em flebotomíneos, *Leishmania* sofre sua primeira diferenciação ao transformar-se da forma amastigota para a forma promastigota ainda no interior do bolo alimentar localizado intestino médio do inseto. Durante esta fase de transição os parasitos são muito 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. *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 desta espécie de *Leishmania* em um vetor que não seja o natural (Borovsky D 1987).

Considerando o exposto acima, nós testamos várias concentrações do açúcar aminado Galactosamina com o objetivo de reduzir a atividade tripsinolítica intestinal de *L. longipalpis*. Nossos resultados mostraram que a concentração de 15 mM foi suficiente para reduzir significativamente a atividade tripsinolítica no intestino dos flebotomíneos (figura 11) sem, contudo, paralisar a digestão ou fragilizá-los, reduzindo a sobrevivência. Esse fato é relevante porque uma dosagem muito alta de Galactosamina poderia acarretar consequências não desejadas nos experimentos, tais como a morte prematura dos flebotomíneos e alteração na taxa de fecundidade. Volf e colaboradores (2001), ao alimentar fêmeas da espécie de flebotomíneo *P. duboscqi* com sangue humano suplementado com 50 mM de Galactosamina observaram um aumento na mortalidade dos flebotomíneos entre o primeiro e quarto dia pós repasto infectante, defecação prematura e diminuição na fecundidade. Os mesmos cogitaram 2 hipóteses para estes fatos: o efeito tóxico de Galactosamina ou a interação deste carboidrato com as lectinas do intestino médio, envolvidas com a digestão. É provável que ao se reduzir muito a atividade tripsinolítica usando uma dosagem alta de Galactosamina, o sangue ficaria totalmente retido no abdômen sem ser digerido, gerando por exemplo um aumento excessivo na quantidade de microrganismos que se desenvolvem no bolo alimentar. Este não é um fator desejado nos experimentos com infecção, pois o inseto pode morrer antes das observações e procedimentos programados, além de causar um impacto no desenvolvimento de *Leishmania* no intestino por exclusão competitiva (Sant'Anna et al. 2014). Em nossos experimentos, os tratamentos dos insetos com concentrações bem menores de Galactosamina foram efetivos para reduzir a atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* sem paralisar a digestão.

Para melhor entender e ampliar nosso entendimento de como açúcares interferem na atividade tripsinolítica de flebotomíneos, alimentamos fêmeas de *L. longipalpis* com sangue humano heparinizado e suplementado também com Galactose ou Glicosamina. A Galactosamina e Glicosamina diferenciam-se da Galactose por possuírem um grupamento amino (-NH₂) no carbono 2 no lugar de uma hidroxila (-OH). A Galactosamina e Glicosamina são isômeros (compostos diferentes com mesma fórmula molecular) que

diferenciam-se por possuírem uma hidroxila na posição axial no carbono 4 (Galactosamina) ou uma hidroxila na posição equatorial do mesmo carbono (Glicosamina) (Figura15).

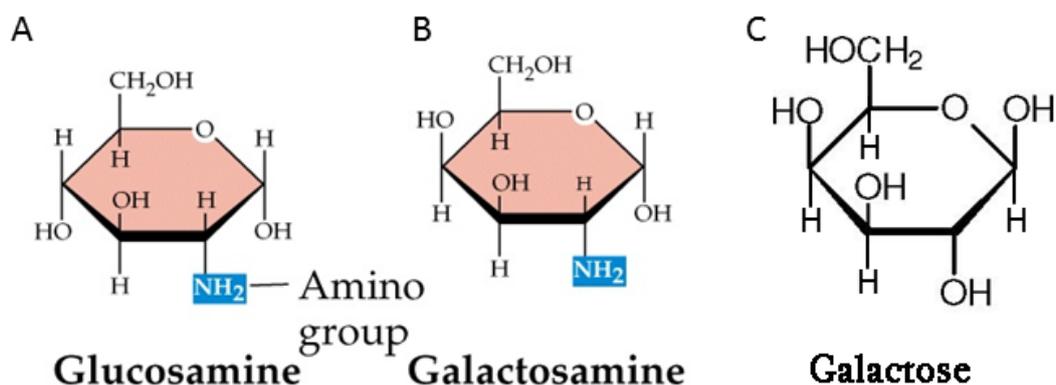


Figura 15: Estruturas cíclicas dos açúcares glicosamina (A), galactosamina (B) e galactose (C). Adaptado de Lehninger, Nelson e Cox, Principles of Biochemistry, 2 Ed, 1993.

Interessantemente, a suplementação de sangue humano com Galactose e Glicosamina não reduziram a atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*. Observou-se um aumento desta atividade em insetos que receberam sangue suplementado com Galactose a 48 horas após o repasto (figura 13). Este fenômeno não foi observado por Volf e colaboradores (2001), ao testar esse mesmo carboidrato em alimentação artificial utilizando-se *P. duboscqi*. Este aumento na atividade tripsinolítica pela suplementação exógena de Galactose provavelmente ocorreu pela ativação da produção de tripsina por um mecanismo ainda por nós desconhecido. Entretanto, este aumento da atividade de tripsina por Galactose poderia ser melhor explorado na manipulação da capacidade vetorial de *L. longipalpis*, uma vez que o aumento da atividade de tripsina no intestino deste inseto vetor pode ser deletério para *Leishmania*.

Em especial, vale a pena destacar que a suplementação de sangue humano com Glicosamina (uma molécula muito semelhante a Galactosamina) não exerce o mesmo efeito de redução da atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*. Provavelmente, a Galactosamina entra nos enterócitos e modifica de alguma forma o metabolismo dos mesmos de uma maneira que afeta o estímulo para produção de proteases.

Um dos fatores que controlam a produção de proteases digestivas em insetos hematófagos é o fornecimento de aminoácidos para os enterócitos (Noriega et al. 1999, Brandon et al. 2008, Santos et al. 2014). Por este motivo, após a realização do repasto sanguíneo pelas fêmeas de *L. longipalpis*, tem-se um aumento considerável da produção de enzimas digestivas com o objetivo de digerir o sangue ingerido. Sabe-se que as enzimas responsáveis pela digestão das proteínas em flebotomíneos (principalmente as tripsinas) são mais ativas em pHs ligeiramente alcalinos, o qual é observado justamente após a ingestão de sangue pelas fêmeas (Santos et al. 2014). O pico dessa atividade se dá em torno de 36 horas pós-repasto. Se o fornecimento de aminoácidos para os enterócitos for interrompida por qualquer razão, por exemplo, por utilização de uma elevada concentração de inibidores de protease, a interrupção é interpretada como o fim da digestão e o inseto defeca o sangue sem digestão (Santos et al. 2014).

Para entender o fenômeno de redução da atividade tripsinolítica exercido pela Galactosamina, nós tentamos reverter esse processo utilizando-se de suplementação do sangue acrescido de uma mistura de aminoácidos. Uma vez que os aminoácidos são compostos necessários para a ativação da transcrição de enzimas digestivas, e que a Galactosamina constitui-se em uma molécula igualmente pequena que contém um grupo amino na sua estrutura molecular, nós especulamos um mecanismo de competição exercido pela Galactosamina com aminoácidos nos enterócitos. Ao adicionarmos uma solução de aminoácidos na concentração de 30 mM ao sangue humano acrescentado de 15mM de Galactosamina, nós conseguimos reverter em parte a redução da atividade tripsinolítica no intestino causada pela Galactosamina. No mosquito *Aedes 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. 2008). O início da tradução de tripsinas é pelo menos em parte controlado através da via TOR (do inglês “Target of Rapamycin”) 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). O envolvimento da via TOR que é ativada por aminoácidos em *A. aegypti* foi elegantemente mostrada por Brandon e colaboradores (2008), que mostraram a fosforilação e ativação do repressor de ativação de tradução 4E-BP e da molécula que fosforila a proteína ribossomal S6, envolvida no recrutamento de ribossomos em RNA mensageiros que possuem resíduos de pirimidina em sua porção 5’ “upstream”. 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 Galactosamina, por ser uma molécula pequena e conter um grupamento amino, possivelmente compete com aminoácidos na ativação da via TOR, porém não é capaz de estimular a síntese de tripsina. Consequentemente, esta interferência causada pela Galactosamina reduz a atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*, a qual é revertida pela suplementação do repasto sanguíneo (acrescido de Galactosamina) com um excesso de uma solução de aminoácidos (concentração final de 30 mM). Entretanto, o mecanismo pelo qual a suplementação do repasto sanguíneo por aminoácidos reverte a ação da Galactosamina precisa ser melhor investigado.

Esta dissertação gerou resultados que são parte de um projeto mais amplo que tem como objetivo estudar diversos fatores que possam influenciar positivamente ou negativamente a capacidade vetorial de *L. longipalpis*, a principal espécie vetora de *L. infantum* nas Américas.

Até o momento não existe uma metodologia eficiente para produzir flebotomíneos infectados suficientemente para fazer desafios de animais vacinados. A transmissão pela picada requer insetos com bloqueio da válvula do estomodeu e da parte anterior do intestino médio (Rogers et al. 2004). Somente esses flebotomíneos são os que podem transmitir naturalmente a leishmaniose visceral. Com a metodologia atual de infecção, somente uma pequena fração de insetos infectados atingem a condição de serem transmissores, o que praticamente inviabiliza a realização de desafio natural para testes de eficiência vacinal e outros experimentos afins.

O próximo passo a ser realizado será a realização de infecções de fêmeas de *L. longipalpis* com *L. mexicana* e *L. infantum* em sangue suplementado com Galactosamina. Estamos desenvolvendo uma metodologia de detecção da infecção de *L. longipalpis* com *Leishmania*, utilizando-se primers para o gen de cópia única que codifica a DNA polimerase de *L. infantum* anteriormente utilizado (GenBank accession code AF009147) (de Ferreira et al. 2013). Interessantemente, os primers para o gen da DNA polimerase de *L. infantum* funcionaram perfeitamente para *L. mexicana* devido ao alto grau de conservância do gen da DNA polimerase. Além disso, a mistura de DNA de *L. longipalpis* com o DNA de *L.*

mexicana não inibiu a reação de PCR em tempo real, concordando com os achados de Ranasinghe e colaboradores (2008) (dados não mostrados). Infecções de *L. longipalpis* com *L. mexicana* têm sido corriqueiramente realizadas em laboratório pela rapidez de desenvolvimento desta espécie de *Leishmania* em cultura, facilidade em se obter formas amastigotas crescendo em cultura e pela sua facilidade de infectar esta espécie de flebotomíneo, produzindo infecções maduras com produção de PSG (Rogers et al. 2002, Sant'anna et al. 2009, Diaz-Albiter et al. 2012, Telleria et al. 2012, 2013).

O novo protocolo de infecção que pretendemos desenvolver envolve a manipulação da digestão e do sistema imune dos flebotomíneos ao mesmo tempo em que eles serão protegidos de infecções bacterianas e fúngicas com uso de antibióticos. Assim, acreditamos que seria possível obter insetos homoganeamente infectados com bloqueio do intestino médio anterior e da válvula do estomodeu.

Com esses insetos, seria possível implantarmos em Minas Gerais um sistema para desafio vacinal capaz de sustentar os estudos de grupos de pesquisa mineiros, de outros estados brasileiros e até de outros países. Uma vez implantado, esse sistema proporcionaria uma grande economia ao oferecer um método de desafio capaz de identificar e eliminar as formulações vacinais ineficazes antes do gasto com os dispendiosos e demorados testes de campo.

7. CONCLUSÕES

- A administração de uma mistura de antibióticos de largo espectro juntamente com a solução de sacarose 30% foi bastante eficaz na eliminação das bactérias cultiváveis do intestino de fêmeas de *L. longipalpis*;
- O anticoagulante que mostrou melhor resultado em nossos experimentos para uso em alimentações artificiais foi a Heparina, uma vez que este composto apresentou o resultado mais próximo da alimentação realizada diretamente no hospedeiro mamífero;
- A concentração de 15 mM de Galactosamina adicionados ao sangue na alimentação artificial foi suficiente para reduzir significativamente a atividade tripsinolítica no intestino dos flebotomíneos sem, contudo, paralisar a digestão;
- A suplementação de sangue humano com Galactose e Glicosamina não reduziram a atividade tripsinolítica do intestino de *L. longipalpis*;
- Observou-se um aumento da atividade tripsinolítica em insetos que receberam sangue suplementado com Galactose 48 horas após o repasto;
- Uma solução de aminoácidos na concentração de 30 mM ao sangue humano acrescentado de 15mM de Galactosamina, conseguiu reverter em parte a redução da atividade tripsinolítica no intestino causada pela Galactosamina;

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, Aparicio P, Aseffa A, Boer M Den, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst R Ter, López-Vélez R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 334–359.
- 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.
- Andrade-Coelho C, Santos-Mallet J, Souza N, Lins U, Meirelles M, Rangel E 2001. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 1141–1151.
- Ashford R 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269–1281.
- Backer J 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17.
- Barret A 1994. *Classification of peptidases. Methods in enzymology: proteolytic enzymes: serines and cysteine peptidases.* California, USA.
- Bates P a 2007. International Journal for Parasitology. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Billingsley P, Lehane M 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: *Biol. insect midgut.*, pp. 3–30.
- 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 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 916–922.
- Brasil 2007. Secretaria de vigilância epidemiológica em saúde. *Minist. da Saúde.*

- Brasil 2010. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse para a Saúde Pública. Boletim Eletrônico Epidemiológico. : 1–24.
- 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.
- Cavalcante R, Pereira M, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagus insects. *Parasitology* 127: 87–93.
- Chaniotis B 1974. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol* 11: 73–79.
- 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.
- Charlab R, Valenzuela J, Rowton E, E. D. and Ribeiro J 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 15155–15160.
- Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* 10: 307–310.
- Coura-Vital W 2011. Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. : 169.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. microbiol Infect. Dis.* 27: 305–318.
- 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, Ivens A, Churcher C, Holroyd N, Quail M, Rogers M 2006. Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* 88: 831–840.
- Dillon RJ, Lane R 1993. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med. Vet. Entomol.* 7: 225–232.
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling a., Charnley a. K 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.* 8: 1291–1298.

- Dostálová A, Volf P 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5: 276.
- Dostálová A, Votýpka J, Fravreau AJ, Barbian KD, Volf P, Valenzuela JG, Jochim RC 2011. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infatum*: comparison of sugar fed blood fed sand flies. *BMC Genomics* 12: 223.
- Fazito do Vale V 2008. Estudo sobre a anatomia, pH e digestão de proteínas no intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).
- 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.
- Ferreira SA de, Almeida GG, Silva SO de, Vogas GP, Fujiwara RT, Andrade ASR de, Melo MN 2013. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: 1–8.
- Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison A 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 34: 719–728.
- Gusmão D 2002a. Derris (*Lonchocarpus*) urucu (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 371–375.
- Gusmão D 2002b. O papel biológico da matriz peritrófica e microbiota intestinal na retenção de heme no lúmen intestinal de mosquitos.
- 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 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403–409.
- Helena A, Garcia I 1995. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. 28: 367–373.
- Kamhawi S 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends Parasitol.* 22: 439–445.
- Kaye P, Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9: 604–615.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279–289.

- 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.
- Lawyer PG, Ngumbi P, Anjili C, Odongo S, Mebrahtu Y, Githure J, Koech D, Roberts C 1990. Development of Leishmania major in Phlebotomus duboscqi and Sergentomyia schwetzi (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg* 43: 31–43.
- Lehane M 2005. *The Biology of blood-Sucking in insects.*
- Lindoso JAL, Lindoso AABP 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 51: 247–253.
- Livak K, Schmittgen T 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lutz A, Neiva A 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 4: 84–95.
- Molyneux D, Moore J, Maroli M 1991. Sugar in sandflies. *Parassitologia* Suppl: 431–436.
- Noriega F, Colonna A, Wells M 1999. Increase in the size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in Aedes aegypti midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 243–247.
- OPAS 2013. Leishmaniasis en las Américas: diagnóstico y tratamiento.
- 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.
- Pascoa V 2002. Aedes aegypti peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 517–523.

- Pereira Filho AA 2014. Flebotomíneos (Diptera : Psychodidae) do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses , Maranhão , Brasil : estudos da infecção por *Leishmania* spp . e da fonte alimentar.
- 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.
- Ramalho-Ortigão M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham V-M, Kamhawi S, Valenzuela JG 2007. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania*-major-infected sandflies. *BMC Genomics* 8: 300.
- Ranasinghe S, Rogers M, Hamilton J, Bates PA, Maingon R 2008. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 875–882.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA 1986. Flebotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 347–349.
- Ready P 2013. Biology of phlebotominae sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 227–250.
- Ribeiro J 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32: 463–478.
- 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.
- Rudin W, Hercker H 1982. Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. *Tiss Cell* 14: 751–758.
- 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.
- Santos VC 2010. Caracterização do mecanismo de controle do pH no tubo digestivo de Lutzomyia longipalpis (Lutz e Neiva , 1912) (Diptera : Psychodidae) e sua importância no desenvolvimento de Leishmania Ross , 1903.
- 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, Jacobson RL 1998. Resistance of Phlebotomus papatasi to infection with Leishmania donovani is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology* 117: 467–473.
- Schlein Y, Romano H 1986. Leishmania major and L. donovani: effects on proteolytic enzymes of Phlebotomus papatasi (Diptera, Psychodidae). *Exp parasitol* 62: 376-80.
- Schlein Y, Schnur L, Jacobson R 1990. Released glycoconjugate of indigenous Leishmania major enhances survival of a foreign L. major in Phlebotomus papatasi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 353–355.
- Sharma U, Singh S 2008. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal vector borne Dis.* 45: 255–272.
- 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.
- Soares R, Turco S 2003. Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75: 303–330.
- Telleria EL 2007. Caracterização de Tripsinas em Lutzomyia longipalpis – Principal Vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil. : 91.
- 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, Sant'anna MR, Alkurbi M, Pitaluga A, Dillon RJ, Traub-Csekö YM 2013. Bacterial feeding, Leishmania infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in Lutzomyia longipalpis. *Parasit. Vectors* 6.

- Telleria EL, Sant'anna MR, Ortigão-Farias JR, Pitaluga A, Dillon VM, Bates PA, Traub-Csekö YM, Dillon RJ 2012. Caspar-like Gene Depletion Reduces Leishmania Infection in Sand Fly Host *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 287: 12985–12993.
- Volf P, Kiewegová A, Nemeč A 2002. Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera, Psychodidae): Transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitol* 49: 73–77.
- 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, Dvůráková 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.
- WHO 2014. Leishmaniasis.
- Yamey G, Torreele E 2002. The world's most neglected diseases. *BMJ* 325: 176–177.
- 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)*.