

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular – IOC

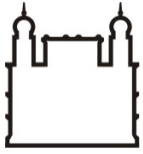
**A complexidade da interação *Leishmania-*
flebotomíneo:
Do estudo de moléculas envolvidas na adesão
do parasita ao tubo digestivo à análise do papel
de citocinas-*like* na modulação da resposta
imune do vetor**

Tatiana Di Blasi

Orientadora: Dra. Yara M. Traub Csekö

Rio de Janeiro

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular - IOC

**A complexidade da interação *Leishmania*-flebotomíneo:
Do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao
tubo digestivo à análise do papel de citocinas-*like* na
modulação da resposta imune do vetor**

TATIANA DI BLASI

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof. Dra. Yara M. Traub Csekö

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D544 Di Blasi, Tatiana

A complexidade da interação *Leishmania*-flebotomíneo: do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao tubo digestivo à análise do papel de citocinas-*like* na modulação da resposta imune do vetor / Tatiana Di Blasi. – Rio de Janeiro, 2016.

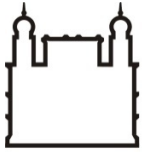
xvii, 87 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 68-74

1. FLAG1/SMP1. 2. TGF- β . 3. Interação. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**A complexidade da interação *Leishmania*-flebotomíneo:
Do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao
tubo digestivo à análise do papel de citocinas-*like* na
modulação da resposta imune do vetor**

Tatiana Di Blasi

Orientadora: Prof. Dra. Yara M. Traub Csekö

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Patricia de Azambuja Penna	IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof. Dra. Ana Cristina Bahia Nascimento	UFRJ
Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira	UFRJ
Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant`Anna	UFMG (1º suplente)
Prof. Dra. Daniele Pereira de Castro	IOC/FIOCRUZ (2º suplente)

Rio de Janeiro, 20 de outubro de 2016.

*Dedico este trabalho
à minha família e amigos*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, agradeço à minha família: meus pais Eduardo e Fátima, minha madrasta Cleci, minha avó Concetta que foram fundamentais na minha criação; agradeço também a minha tia Irene por todo o apoio, meus irmãos Pietro e Lorenzo e minha cunhada Mariana.
- À minha orientadora Dra. Yara Maria Traub Cseko, pelo apoio e orientação durante todo meu caminho na vida científica para chegar nesse momento. E por ter me oferecido oportunidades incríveis para que eu pudesse crescer como profissional e pessoa;
- Ao grupo do meu laboratório pelo companheirismo durante todo o doutorado: Tempone, Erich, Andrea, Vi, David, João, Gabriel, Daisy, Thaís, Dani, Monique, Lívia...;
- Ao Dr. Marcelo Ramalho-Ortigão e seu grupo que me receberam de braços abertos em seu laboratório no Kansas (EUA) e me ajudaram com os experimentos.
- Ao Dr. Erich Telleria, que mais do que um colega de trabalho é um grande amigo! Obrigada pela ajuda com os experimentos, pelas conversas e pelo apoio sempre que precisei. Como diz Marina: É o nosso psicólogo de plantão! Rsrtrs
- Ao M. Sc. João Ortigão, pela base que me deu durante Iniciação Científica: foi o meu melhor professor de Biologia Molecular... apesar dos horários malucos de trabalho. E que, além de orientador, se tornou um amigo de verdade.
- Aos amigos Di, Maykon e Marina, os melhores que alguém poderia querer! Amo vocês migos!!! Obrigada por aguentarem meus áudios intermináveis no whatsapp...rsrs
- Ao grupo da faculdade que não vejo com a frequência que gostaria: Vanessa, Matheus, Mineiro, Julia, Paty e Pri;

- Aos meus amigos queridos Pedro, Rodrigo, Orlando e Carol ou “A Máfia”, pelos mais de 15 anos de amizade. Amigos como vocês são difíceis de encontrar, mas impossíveis de esquecer!
- Aos membros da banca e à revisora por terem aceito o convite;
- Às plataformas tecnológicas pelo serviço prestado com muita eficiência.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

“Se soubesse que o mundo se desintegraria amanhã, ainda assim plantaria a minha macieira. O que me assusta não é a violência de poucos, mas a omissão de muitos.”

(Martin Luther King)

Resumo

As leishmanioses são causadas pelo parasita *Leishmania* e transmitidas ao vertebrado pela picada do flebotomíneo. Durante o ciclo no vetor, uma etapa crucial ocorre ao fim da digestão com a adesão dos parasitas ao epitélio intestinal do inseto. Nosso grupo anteriormente determinou o papel da proteína flagelar FLAG1/SMP1 de *L. major* na adesão ao tubo digestivo de *P. papatasi*. Neste trabalho foram feitos ensaios de interação entre *L. major* e *L. i. chagasi* X células embrionárias LL5 e PP9, e também experimentos de inibição da interação entre células PP9 e *L. major* com adição de proteína recombinante FLAG/MBP. Os resultados mostraram que apesar de haver adesão, a proteína FLAG1/SMP1 parece não ter um envolvimento nesse processo de interação com células embrionárias. Em paralelo, fizemos uma busca por possíveis moléculas ligantes de FLAG1/SMP1, através de experimentos de *pull down* tanto com lisados de células PP9 quanto de intestinos dissecados de *P. papatasi*. Nos ensaios com células PP9 identificamos 6 genes de interesse codificantes para proteínas associadas à membrana. Todos esses genes são expressos tanto em intestino quanto em carcaça de *P. papatasi*. Nos ensaios de *pull down* com intestinos, identificamos um gene que codifica para uma proteína ligante de ácido hialurônico (AH). Esse gene tem uma tendência a aumento da expressão em intestinos em relação à carcaça de fêmeas não alimentadas. Realizamos também ensaios de microscopia confocal em tubos digestivos pré-incubados com a proteína recombinante FLAG/MBP. Confirmamos que FLAG1/SMP1 interage com o epitélio intestinal de *P. papatasi*.

Outra etapa importante da interação parasita-vetor é a resposta imune ativada pela *Leishmania* dentro do inseto. Nosso grupo detectou previamente a superexpressão de uma TGF- β de *L. longipalpis* (LITGF- β) 72h após infecção por *L. i. chagasi*. Esse gene foi silenciado com o objetivo de testar o efeito da depleção de LITGF- β sobre a resposta imune do inseto. Observamos que a redução de LITGF- β gerou um aumento do peptídeo antimicrobiano (PAM) cecropina. Investigamos o efeito do silenciamento em fêmeas infectadas com *L. i. chagasi*. Com a redução de LITGF- β , há uma redução drástica de infecção a partir de 48h, além de um aumento da expressão dos PAMs cecropina e defensina 2, além de iNOS indicando que LITGF- β pode regular negativamente a expressão de moléculas efetoras da imunidade. Para confirmar os dados obtidos no silenciamento, alimentamos *L.*

longipalpis com *L. i. chagasi* e anticorpo anti-TGF- β . Observamos uma maior infecção no grupo alimentado com anticorpo após 96h. Posteriormente, verificamos por western blot que o anticorpo utilizado reconhece TGF- β presente no sangue usado nas alimentações e, possivelmente, o bloqueio dessas moléculas causou o aumento do número de parasitas. Com isso, concluímos que a TGF- β do sangue tem um efeito inicial de ativação da resposta imune com produção de moléculas efetoras. E que, posteriormente, o contato da *Leishmania* com o intestino pode estar causando uma ativação do gene LITGF- β e uma regulação negativa desses efetores imunes.

Abstract

Leishmaniasis are caused by the protozoan *Leishmania* and transmitted to the vertebrate host through the bite of sandflies. Inside the vector a crucial step occurs at the end of digestion, with the adhesion of the parasite's flagellum to the midgut epithelium. Previously, our group observed that a *L. major* flagellar protein named FLAG1/SMP1 has a role in parasite adhesion to the *P. papatasi* midgut. In the present work, we performed interaction assays between *Leishmania* and embryonic LL5 and PP9 cells and also experiments of adhesion inhibition between PP9 cells and *L. major* by adding different concentrations of FLAG/MBP recombinant protein. The results showed that, although we observed adhesion, the protein FLAG1/SMP1 is not involved in this interaction process. In parallel, we performed pull down experiments in order to search for FLAG1/SMP1 ligands in PP9 cells and dissected guts of *P. papatasi* lysates. In the assays with PP9 cells we identified 6 putative candidate genes coding for membrane proteins. All of the selected genes are expressed in both gut and carcass. From the pull down assays with dissected guts, we identified a gene coding for a hyaluronan-binding protein. This gene has an increased expression in guts of nonfed females comparing to carcass. We also carried out confocal microscopy experiments using midguts pre-incubated with the recombinant protein FLAG/MBP, and confirmed that FLAG1/SMP1 directly interacts with the epithelium of *P. papatasi*.

Another important step of the parasite-vector interaction is the immune response that is activated by *Leishmania* infection. Our group previously detected the overexpression of a TGF- β from *L. longipalpis* (LITGF- β) at 72h after infection with *L. i. chagasi*. Aiming to test the effect of LITGF- β depletion we performed a gene silencing experiment, and observed that LITGF- β reduction causes an increase of the antimicrobial peptide (AMP) cecropin and also iNOS, indicating that LITGF- β is probably regulating negatively the expression of immunity effector genes. LITGF- β silencing in infected flies caused a strong reduction in the *L. i. chagasi* infection after 48h and also an increased expression of the AMPs cecropin and defensin 2, and also iNOS. To confirm the data obtained with the silencing, we fed *L. longipalpis* with *L. i. chagasi* plus antibody anti- LITGF- β , and observed that the antibody fed group had an increased infection load at 96h. We then performed western blot assays and determined that the antibody used in the previous experiments recognized the

mammalian TGF- β present in the blood used during the artificial feedings. Consequently, the blocking of this mammalian molecule was probably responsible for the increase in the number of parasites. Thereby we can assume that in *L. longipalpis* the mammalian TGF- β caused an initial activation of the immune response and that, at a later time point, the *Leishmania* contact with the gut or the increase of NOS might be causing an activation of LLTGF- β and a negative regulation of immune effectors.

Lista de Tabelas:

Tabela 1.1- Relação das espécies de <i>Leishmania</i> causadoras das diferentes manifestações clínicas da doença.....	3
Tabela 1.2- Relação das espécies de flebotomíneos vetoras das diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	12
Tabela 3.1- Quadro de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	29
Tabela 4.1- Lista de proteínas selecionadas a partir do sequenciamento do “pull down” com potencial de interação com a proteína flagelar FLAG1/SMP1.	42

Lista de Figuras:

Figura 1.1: Formas clínicas das Leishmanioses.....	2
Figura 1.2: Incidência de LC nas Américas.....	5
Figura 1.3: Novos casos de Leishmaniose Visceral pelo mundo	6
Figura 1.4: Distribuição de casos de LV por município nas Américas.....	7
Figura 1.5: Esquema com as fases de desenvolvimento do flebotomíneo <i>L. longipalpis</i>	8
Figura 1.6: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	9
Figura 1.7: Estrutura do axonema	13
Figura 1.8: Formas adquiridas pela <i>Leishmania</i> durante seu ciclo de vida	16
Figura 1.9: Ciclo da <i>Leishmania</i> no vetor flebotomíneo	16
Figura 1.9: Ciclo da <i>Leishmania</i> no vetor flebotomíneo	16
Figura 1.10: Vias de imunidade IMD e Toll em insetos	21
Figura 4.1: Triplicata experimental de “pull down” com extrato protéico total de células embrionárias PP9.....	41
Figura 4.2: PCR quantitativo dos genes 1 (ATP-binding cassette subfamily E member1), 2 (Vesicle associated protein), 3 (Faz-associated protein), 4(NIPSNAP	

protein), 5 (PDGF- e VEGF-receptor related) e 6 (Sortin nexin) em carcaça e tubo digestivo de fêmeas de <i>P. papatasi</i>	45
Figura 4.3: Ensaio de adesão entre células embrionárias de flebotomíneos e leishmanias	48
Figura 4.4: Ensaio de microscopia confocal para detecção da proteína recombinante FLAG/MBP potencialmente aderida a intestinos dissecados de <i>P.papatasi</i>	50
Figura 4.5: Grupo controle do ensaio de microscopia confocal para detecção da proteína recombinante FLAG/MBP potencialmente aderida a intestinos dissecados de <i>P.papatasi</i>	51
Figura 4.6: Duplicata de ensaio de “pull down” com extrato total de tubos digestivos dissecados de <i>P. papatasi</i>	53
Figura 4.7: PCR quantitativo para o gene de proteína ligante de Hyaluronan em carcaça e tubo digestivo de fêmeas de <i>P.papatasi</i>	55
Figura 4.8: PCR quantitativo para análise de expressão do gene LITGF- β em fêmeas silenciadas para Cactus	57
Figura 4.9: PCR quantitativo para análise de expressão do gene de LITGF- β em insetos injetados com dsTGF- β	58
Figura 4.10: PCR quantitativo para análise de expressão de genes ligados a resposta imune em fêmeas silenciadas para TGF- β	59
Figura 4.11: PCR quantitativo para confirmação do silenciamento em fêmeas injetadas com dsLITGF- β e infectadas com <i>L.i.chagasi</i>	61
Figura 4.12: PCR quantitativo dos genes iNOS, Cecropina e Defensina após infecção de fêmeas injetadas com dsLITGF- β ou ds β Gal	62
Figura 4.13: PCR quantitativo para confirmação do silenciamento em fêmeas injetadas com dsLITGF- β e infectadas com <i>L.i.chagasi</i>	62
Figura 4.14: Alimentação artificial de fêmeas de <i>L.longipalpis</i> com sangue contendo <i>L.i.chagasi</i> e anticorpo anti-TGF- β ou soro pré-imune	63
Figura 4.15: Western Blot para detecção de TGF- β	64

ÍNDICE

I- Introdução.....	1
1.1- A Doença	1
1.2- Epidemiologia.....	4
1.3- O Parasita	7
1.3.1- A estrutura flagelar e seu papel no ciclo infectivo no vetor	9
1.4- O Vetor.....	11
1.5- O Ciclo da <i>Leishmania</i> no Hospedeiro Invertebrado	15
1.6- Fatores Relacionados com a Interação Parasita-Vetor	17
1.6.1- Envolvimento de FLAG1/SMP1 na Interação.....	19
1.7- Imunidade em Insetos	20
1.7.1- Resposta Imune em Flebotomíneos	22
1.7.2- Fator de crescimento e transformação- β (TGF- β).....	22
II- Objetivos.....	25
2.1- Gerais.....	25
2.2- Específicos.....	25
2.2.1- Proteína FLAG1/SMP1.....	25
2.2.2- TGF- β de <i>L. longipalpis</i>	25
III- Material e Métodos	26
3.1- Tampões e soluções	26
3.1.1- PBS 10X (Phosphate-buffered Saline) (1L)	26
3.1.2- TBS (Tris-buffered Saline) (1L)	26
3.1.3- Tampão de Lise	26
3.1.4- Tampão de Lavagem	26
3.1.5- Tampão de amostra para gel de poliacrilamida 5X	26
3.1.6- Tampão de Transferência 1X (1L)	27
3.2- Meios de cultura.....	27
3.2.1- Meio LB (Luria-Bertani)	27
3.2.2- Meio LB-agar.....	27
3.2.3- Meio L15 suplementado	27

3.2.4- Meio 199 suplementado	27
3.3- Cultura de parasitos	28
3.4- Cultura de células embrionárias de <i>L. longipalpis</i> (LL5) e de <i>P. papatasi</i> (PP9)	28
3.5- Insetos.....	28
3.6- Oligonucleotídeos	28
3.7- Extração de RNA total.....	30
3.8- Tratamento do RNA total extraído com DNase.....	30
3.9- Síntese de cDNA.....	30
3.10- PCR quantitativo	31
3.11- Incubação de <i>Leishmania sp.</i> com células embrionárias LL5 e PP9	31
3.12- Purificação das proteínas induzidas FLAG/MBP e MBP por coluna de maltose	32
3.13- Extratos proteicos de células embrionárias PP9 e de intestinos dissecados de <i>P.papatasi</i>	33
3.14- Acoplamento das proteínas recombinantes purificadas a resina de Sepharose	33
3.15- Experimentos de “pull down”	34
3.16- Sequenciamento das amostras de “pull down” por espectrometria de massa	34
3.17- Microscopia confocal para avaliação de interação de proteína recombinante FLAG1/SMP1com intestinos dissecados de <i>P.papatasi</i>	35
3.18- Western Blotting para detecção de TGF β	35
3.19- Silenciamento do gene de TGF- β por interferência de RNA	36
3.20- Infecção por <i>L. i. chagasi</i> de insetos silenciados para o gene LITGF- β	37
3.21- Infecção artificial de <i>L. longipalpis</i> por <i>L. i. infantum</i> com anticorpo policlonal anti-TGF- β	37
3.22- Construção de gráficos e análise estatística	38
IV- Resultados e Discussão.....	39
4.1 - Capítulo 1 – FLAG1/SMP1	39
4.1.1- Interação de <i>Leishmania sp.</i> com células embrionárias LL5 e PP9	39

4.1.2- Análise de proteômica e de expressão gênica a partir de <i>pull down</i> com extrato de células PP9	41
4.1.3- Microscopia confocal para avaliação de interação de proteína recombinante FLAG1/SMP1 com intestinos dissecados de <i>P.papatasi</i>	49
4.1.4- <i>Pull down</i> com extrato de intestino dissecado de <i>P. papatasi</i>	52
4.2 – Capítulo 2 – TGF- β	55
4.2.1- Possível regulação de LITGF- β pela via Toll.....	56
4.2.2- Silenciamento do gene LITGF- β em <i>L.longipalpis</i> e análise de expressão de moléculas possivelmente relacionadas com a via de TGF- β	57
4.2.3- Infecção por <i>L. i. chagasi</i> em insetos silenciados para LITGF- β e observação do efeito em genes possivelmente relacionados com essa via	60
4.2.4- Análise da taxa de infecção em <i>L. longipalpis</i> alimentados com <i>L. i. chagasi</i> e anticorpo policlonal anti- LITGF- β	63
V- Conclusões	66
5.1 - Capítulo 1 – FLAG1/SMP1	66
5.2 – Capítulo 2 – TGF- β	66
VI- Referências Bibliográficas	68
VII- Anexos.....	75
Anexo I	75
Anexo II – parte 1	75
Anexo II – parte 2	78
Anexo III	79

I – INTRODUÇÃO

1.1 – A DOENÇA:

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas que constituem um grave problema de saúde pública. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas ao hospedeiro vertebrado por vetores da subfamília Phlebotominae. Com dezenas de países já tendo registrado casos de Leishmaniose, temos o Brasil como uma das regiões com maior incidência da doença (WHO 2015).

Esse grupo de doenças apresenta manifestações clínicas distintas, dependendo, entre outras coisas, da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica desencadeada no vertebrado. Além disso, vêm se discutindo também o papel dos vetores nessas diferentes formas de apresentação da doença, já que características específicas dos mesmos, como componentes da saliva (Qureshi, Asahina et al. 1996), teriam capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado (Warburg, Saraiva et al. 1994). As formas clínicas das leishmanioses são: a Leishmaniose Visceral (LV) (Figura 1.1A) e a Leishmaniose Cutânea (LC) (Figura 1.1B); esta última podendo ter variações clínicas conhecidas como Leishmaniose Mucocutânea (LM) (Figura 1.1C) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Figura 1.1D).

O quadro clínico da LC é caracterizado por ulcerações que se iniciam no local de inoculação dos parasitas, podendo ser únicas ou múltiplas, dependendo do número de picadas pelo vetor infectado ou da disseminação do parasita (Figura 1.1B) (Gontijo and de Carvalho Mde 2003). A LCD, uma variação da LC, apresenta classicamente lesões difusas não-ulceradas espalhadas por toda epiderme e grande quantidade de amastigotas. São lesões que geralmente não cicatrizam espontaneamente e são resistentes ao tratamento (Figura 1.1D). A LM, uma condição de difícil tratamento e associada à infecção por *L. braziliensis*, é caracterizada pelo aparecimento de lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens que podem ocorrer meses ou anos após a lesão inicial (Figura 1.1C) (Gontijo and de Carvalho Mde 2003).

Os sintomas associados à LV são: febre, palidez de mucosas, esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia, e progressivo emagrecimento (Figura 1.1A) (Neves, Melo et al. 2007). No Brasil, ela é causada pelo protozoário

Leishmania infantum chagasi (Cunha and Chagas 1937) e transmitida principalmente pelo vetor flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz 1912).

As principais espécies de *Leishmania* envolvidas na promoção das diversas manifestações clínicas da doença estão relacionadas na Tabela 1.1 abaixo.

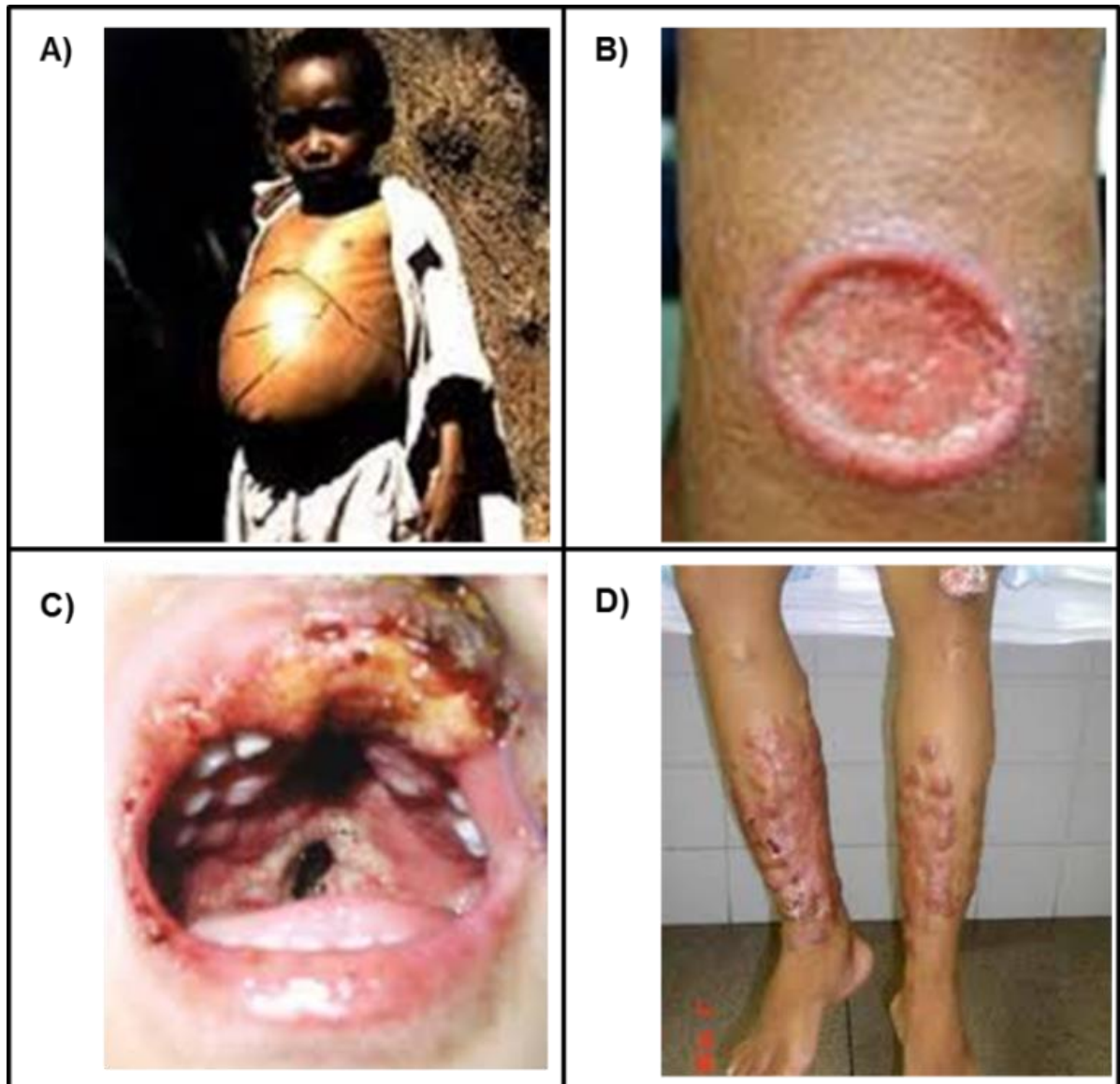


Figura 1.1: Formas clínicas das Leishmanioses: A) Leishmaniose Visceral; B) Leishmaniose Cutânea; C) Leishmaniose Mucocutânea; D) Leishmaniose Cutânea Difusa.

Com relação à taxonomia, a denominação da espécie *L. i. chagasi* é tema de debate entre os especialistas da área. Existem duas hipóteses para o surgimento dessa espécie no continente americano: a primeira seria a de que a doença já estava presente antes da separação do continente americano da África e, portanto,

o processo de especiação em *L. i. chagasi* se deu após o processo de separação. Alguns trabalhos têm mostrado que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* apresentam diferenças genotípicas e fenotípicas suficientes para que sejam classificadas separadamente. Esses trabalhos sugerem a nomenclatura: *Leishmania infantum infantum* e *L. i. chagasi* (Ellis and Crampton 1991, Lainson and Rangel 2005).

Tabela 1.1: Relação das espécies de *Leishmania* causadoras das diferentes manifestações clínicas da doença.

Formas clínicas	Espécies de <i>Leishmania</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>
Leishmaniose Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) i. infantum</i> <i>L. (L.) i. chagasi</i>

A segunda hipótese sugere que o parasita presente nas Américas seria *L. infantum* importada do Velho Mundo na época da colonização do continente. Recentemente, um estudo amplo mostrou, através de tipagem multilocus de microsátélites, que a espécie *L. infantum* foi importada em diferentes momentos para as Américas a partir do sudoeste europeu (Kuhls, Alam et al. 2011).

1.2 – EPIDEMIOLOGIA:

Inicialmente consideradas exclusivamente rurais, as leishmanioses nos últimos 20 anos vêm ganhando o cenário urbano de forma preocupante. Atualmente, são prevalentes em 98 países, com cerca de 1,3 milhões de novos casos ao ano, causando de 20.000 a 50.000 mortes. Estima-se que mais de 300 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco nesses locais (WHO 2015).

A LC é caracterizada por ter uma ampla distribuição mundial, sendo que nas Américas há casos relatados desde o México até o norte da Argentina (Figura 1.2). Por apresentar uma alta complexidade quanto à diversidade de agentes (diferentes espécies de *Leishmania* podem causar esse quadro clínico), de reservatórios e de vetores, o controle da LC no Brasil tem apresentado um alto grau de dificuldade (Ministério-da-Saúde 2007).

A LV apresenta um quadro clínico de alta gravidade, podendo levar a óbito se não tratado adequadamente. Desde o início do século, vem crescendo a preocupação com casos de co-infecção com doenças imunossupressoras como a AIDS (Ministério-da-Saúde 2006). Até março de 2010, a co-infecção de leishmaniose e HIV tornou-se endêmica em 35 países.

Superada apenas pela malária, a leishmaniose visceral constitui a segunda maior causa de mortes por doenças parasitárias no mundo, com cerca de 500.000 novos casos e uma taxa de mortalidade que chega a 10% anualmente (Chappuis F 2007, WHO 2010) (Figura 1.3). No Brasil, a doença se concentra nas regiões Norte e Nordeste, com cerca de 70% de todos os casos registrados (Figura 1.4) (Ministério-da-Saúde 2006, Oliveira, Saraiva et al. 2011).

Nos últimos 30 anos, têm-se observado o aumento da incidência da doença e sua expansão para as áreas urbanas (Dantas-Torres and Brandao-Filho 2006, Oliveira, Saraiva et al. 2011, Conti, Moura Lane et al. 2016). Dentre os fatores que vêm contribuindo para essa expansão estão: o movimento de êxodo rural; as contínuas alterações do meio ambiente (causadas por processos contínuos de desmatamento, queimadas, construções de barragens, hidrelétricas entre outros), redução da qualidade de vida da população e adaptação do vetor a essas alterações ambientais. Além disso, o pouco incentivo à pesquisa da doença acaba por retardar o desenvolvimento de novas formas de tratamento e controle.

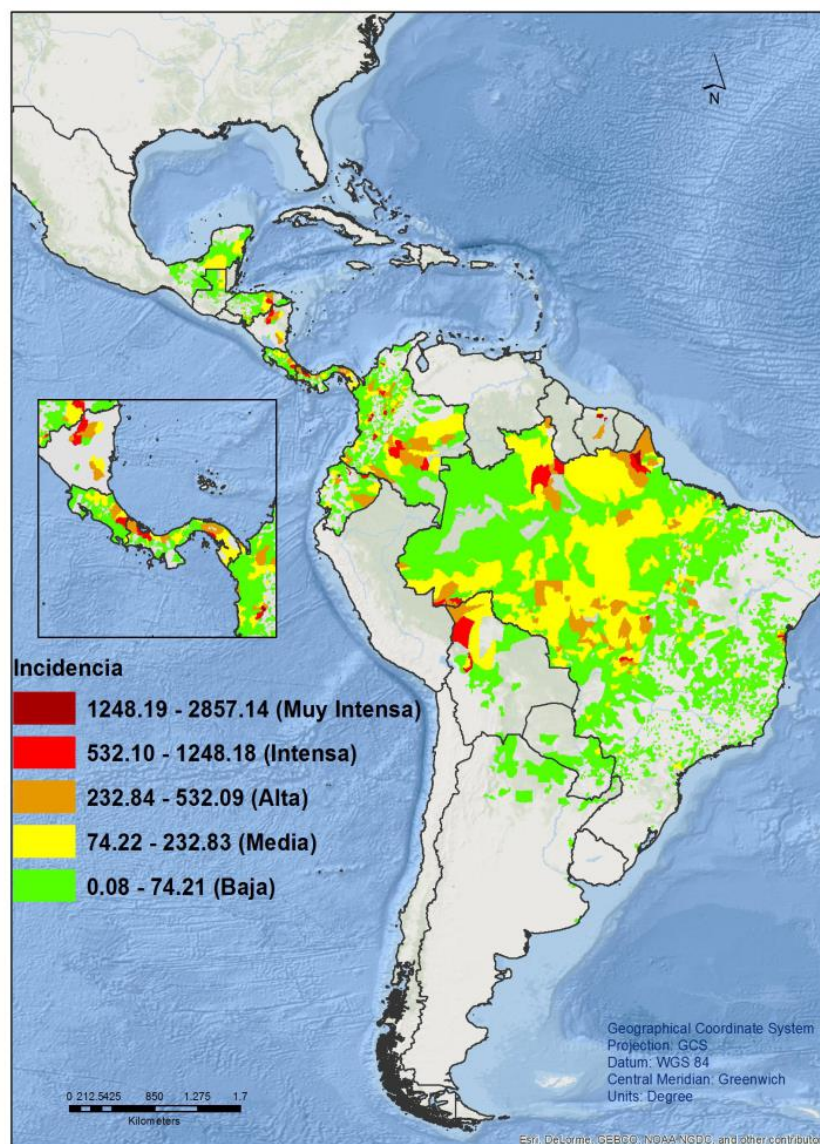


Figura 1.2: Incidência de LC nas Américas, por 100.000 habitantes por município (SisLeish 2015).

No caso específico do processo de urbanização da LV, há registros em diversas cidades brasileiras como Santarém (PA), Belo Horizonte (MG), Palmas (TO), Campo Grande (Da Silva, Williams et al. 1990), Cuiabá (MT) (Oliveira, Saraiva et al. 2011) e Rio de Janeiro (Marzochi 2016). A LV clássica, em nosso país, acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças menores de 10 anos (Gontijo 2004). Na transmissão da doença são descritos dois ciclos clássicos: um silvestre, tendo como principais reservatórios as raposas selvagens (*Vetulus pseudalopex* and *Dusicyon thous*) e outro doméstico, com o cachorro sendo o reservatório. Em ambos os ciclos

de transmissão o homem é considerado hospedeiro acidental (Conti, Moura Lane et al. 2016).

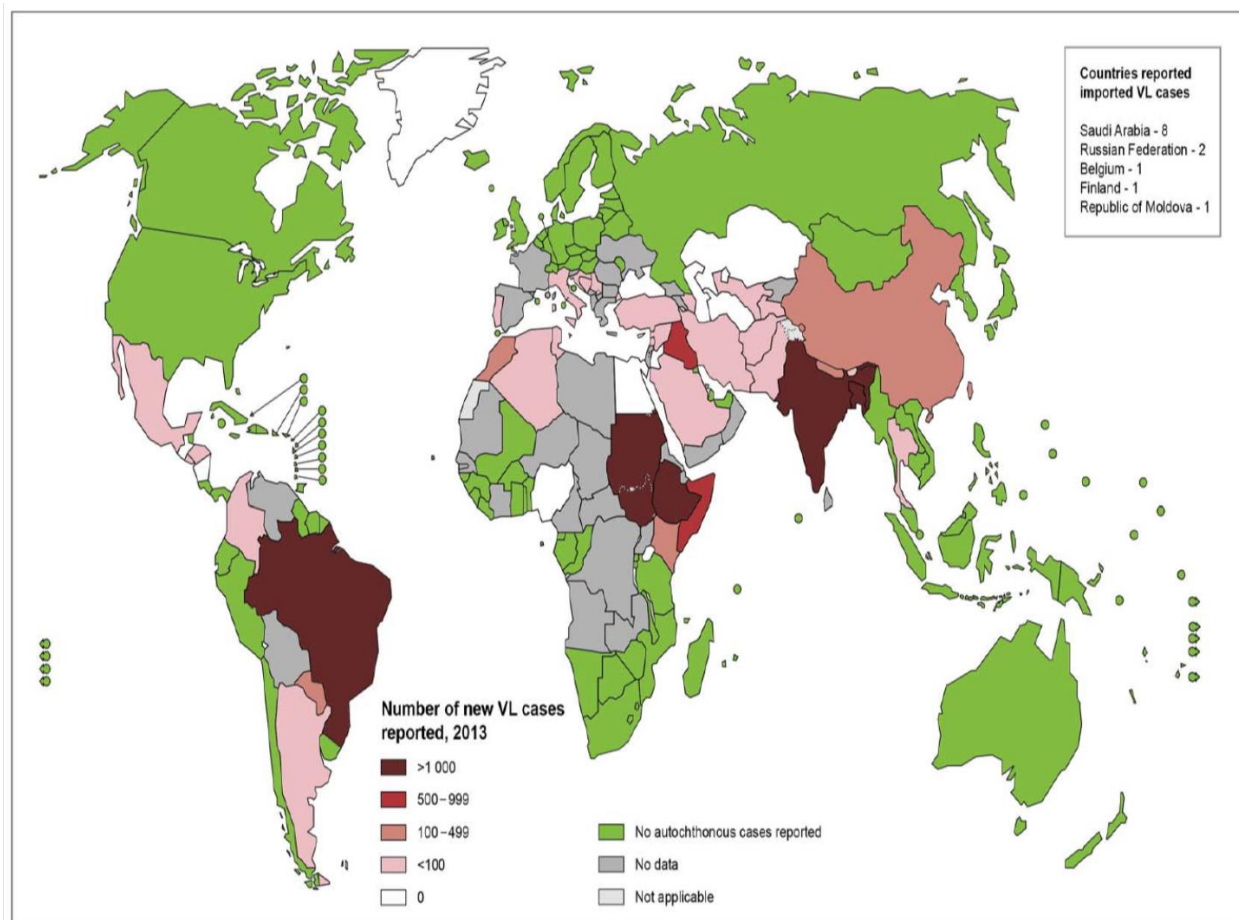


Figura 1.3: Novos casos de Leishmaniose Visceral pelo mundo em 2013, segundo WHO

(http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1)

No Brasil, o primeiro registro de LV e detecção do parasita foram realizados por Penna em 1934 (Penna 1934). Posteriormente, em 1937, foi feita a descrição e caracterização do ciclo biológico da *Leishmania* e sua correlação com o vetor *L. longipalpis* (Cunha and Chagas 1937).

De uma forma geral, podemos observar a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, nos diferentes tipos de leishmanioses, com a manutenção de casos em áreas rurais ou próximas ao mesmo tempo em que há o surgimento de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes da expansão industrial e econômica como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições

ambientais e sanitárias altamente favoráveis à transmissão da doença (Ministério-da-Saúde 2007).

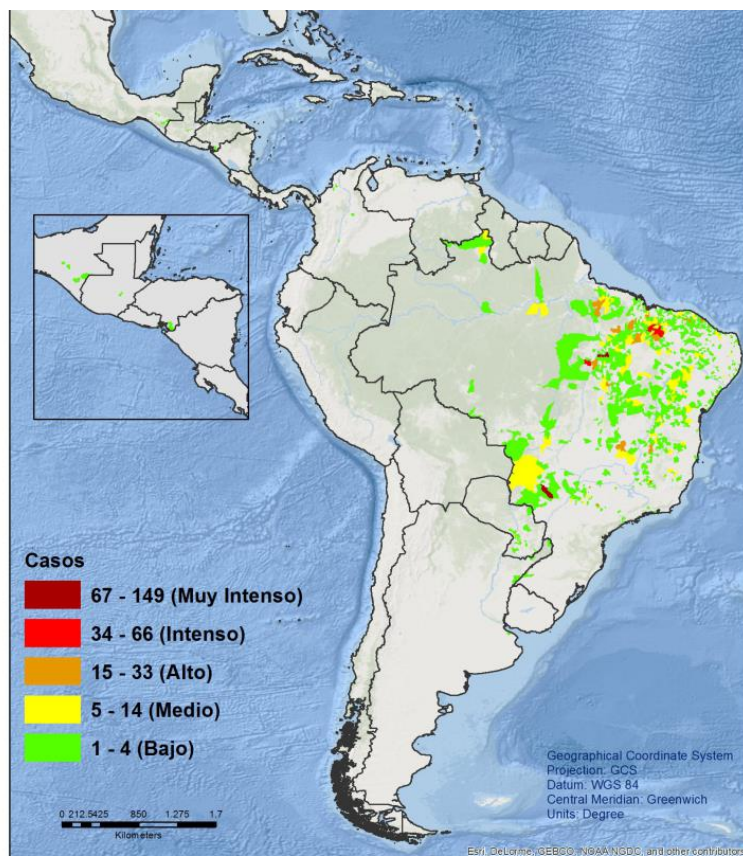


Figura 1.4: Distribuição de casos de LV por município nas Américas (SisLeish 2015).

1.3 – O PARASITA:

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Os cinetoplastídeos caracterizam-se principalmente pela presença do cinetoplasto (Neves, Melo et al. 2007). Essa estrutura, dentro da mitocôndria, consiste em material genômico (kDNA) na forma de algumas dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que são responsáveis pela codificação de diversas proteínas mitocondriais e RNA ribossomal.

Os cinetoplastídeos podem ser divididos entre os biflagelados bodonídeos e os monoflagelados tripanossomatídeos. Esses últimos representam o grupo mais diversificado e bem adaptado dentre os parasitas flagelados, com uma variedade enorme de possíveis hospedeiros (Lukes, Skalicky et al. 2014).

O gênero *Leishmania* é constituído por organismos heteroxenos que possuem dois estágios principais durante o desenvolvimento de seu ciclo de vida (Figura 1.5): uma forma de amastigota aflagelada e intracelular, no hospedeiro vertebrado, e uma forma promastigota flagelada no hospedeiro invertebrado (Figura 1.8a) (Neves, Melo et al. 2007).

Formas amastigotas do parasita, infectando as células do sistema mononuclear fagocitário, são ingeridas pelo flebotomíneo juntamente com o sangue. Na região do intestino médio desses insetos, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, com morfologia ovalada e de flagelo com comprimento similar ao do corpo celular. A diferenciação em formas promastigotas dentro do intestino do inseto é imprescindível para a sobrevivência das leishmanias tendo em vista que a forma flagelada é resistente ao ambiente rico em enzimas digestivas devido à presença das moléculas lipofosfoglicano (LPG) e proteofosfoglicano (PPG) que se apresentam em sua superfície e secretados (Secundino, Kimblin et al. 2010).

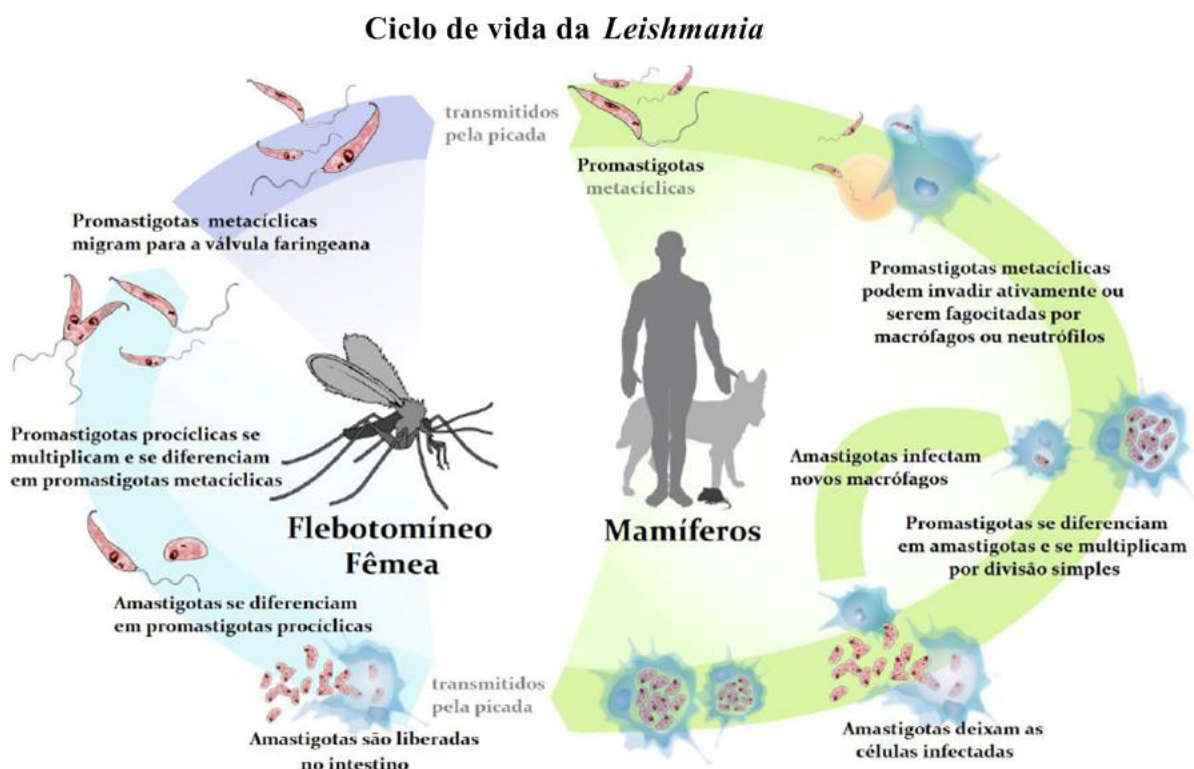


Figura 1.5: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*

(http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerar_canina.html)

Já ao fim do tempo de digestão, os protozoários, que passam por intenso processo de proliferação e diferenciação, assumem uma forma fina, longa e muito ativa chamada de promastigota metacíclica (Neves, Melo et al. 2007). Essa forma, recoberta por moléculas de LPG é infectiva para os vertebrados.

1.3.1- A estrutura flagelar e seu papel no ciclo infectivo no vetor:

A mobilidade do flagelo em organismos eucarióticos geralmente está associada ao axonema. Sua estrutura clássica consiste em 9 dupletes de microtúbulos, arranjados de modo a formar um cilindro, e conectados de forma equidistante e paralelamente ao eixo do flagelo. Na região central, existem dois microtúbulos paralelos individuais que se conectam às outras estruturas por meio de um conjunto de mais de 250 tipos diferentes de proteínas (Figura 1.6) (Kruger and Engstler 2015).

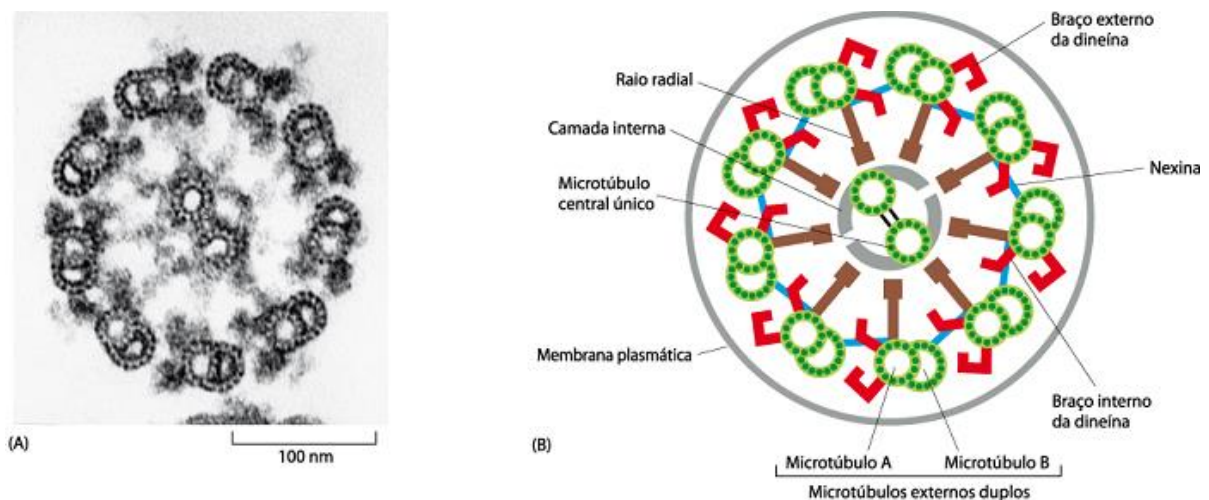


Figura 1.6: Estrutura do axonema. (A) Microfotografia eletrônica de secção transversal de flagelo de uma célula eucariótica. (B) Esquema das partes que compõem um flagelo ou cílio. <http://www.dacelulaaosistema.uff.br/?p=113>

Tripanossomatídeos em geral possuem um flagelo e apresentam mobilidade durante a maior parte de seu ciclo de vida. Até mesmo quando assumem a forma amastigota, sem motilidade, mantêm um flagelo rudimentar restrito à região da bolsa flagelar (Bates 2008). Nas formas promastigotas, o flagelo exerce papel

fundamental, tanto na interação direta com o epitélio intestinal do vetor, possivelmente prevenindo, a eliminação das mesmas após a digestão sanguínea; como na movimentação/quimiotaxia dos parasitas em direção a porção anterior do tubo digestivo (Kruger and Engstler 2015).

Nesses organismos o flagelo está localizado na porção anterior do corpo celular, emergindo de uma estrutura conhecida como bolsa flagelar, que nada mais é do que uma invaginação da membrana da célula com intensa e restrita atividade endocítica e exocítica (Landfear and Ignatushchenko 2001). É nessa região, que possui receptores e sítios de ancoragem específicos, que ocorre todo o transporte de vesículas do parasita em qualquer estágio do seu ciclo de vida (Field and Carrington 2009).

O axonema no flagelo está interligado a uma estrutura acessória filamentar não convencional que percorre todo o seu comprimento: o bastão paraflagelar, que possui um papel importante na motilidade (Portman and Gull 2010).

O comprimento do flagelo varia de acordo com o estágio das promastigotas e se caracteriza como uma estrutura dinâmica que está constantemente sendo renovada. Esse processo de renovação utiliza o aparato de transporte intraflagelar (TIF) para a movimentação de tubulina e outros componentes flagelares para ambas as extremidades do flagelo. Fazem parte desse processo também as cinesinas, proteínas motoras que, quando superexpressas, promovem encurtamento do flagelo e causam o efeito oposto quando tem sua expressão gênica reduzida (Marshall and Rosenbaum 2001).

Além das funções relatadas acima, o flagelo tem um papel importante na adesão da *Leishmania* ao epitélio intestinal dos flebotomíneos. Um mecanismo conhecido é a formação de hemidesmossomos na porção apical do flagelo (Tetley and Vickerman 1985, Maga and LeBowitz 1999). Essas estruturas foram identificadas em regiões sem vilosidades como o intestino anterior e a válvula estomodeal do inseto. Outro mecanismo, observado no intestino médio dos flebotomíneos, é a inserção do flagelo entre as microvilosidades intestinais, promovendo a interação de moléculas de membrana da *Leishmania* com receptores das células intestinais. Apesar disso, um ensaio de infecção artificial, utilizando uma cepa de *L. braziliensis* aflagelada, mostrou que mesmo na ausência do flagelo a infecção em *L. longipalpis* persistiu (Zauli, Yokoyama-Yasunaka et al. 2012). Com isso, constatamos que ainda há muito a ser desvendado com relação ao real papel do flagelo na instalação da infecção no invertebrado.

1.4 – O VETOR:

Como mencionado anteriormente, as leishmanioses são transmitidas por fêmeas de flebotomíneos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Existem atualmente, mais de 800 espécies de flebotomíneos descritas, sendo cerca de 450 no Novo Mundo e o restante no Velho Mundo (Akhoundi, Kuhls et al. 2016). Dentre essas espécies em todo o mundo, em torno de 60 são capazes de transmitir a *Leishmania* e apenas 30 tem real relevância epidemiológica (Sharma and Singh 2008).

Embora ainda haja discussão com respeito à classificação dos gêneros em flebotomíneos, a delimitação das espécies no Velho Mundo é mais aceita, de forma geral, do que das espécies no Novo Mundo. Apesar disso, os únicos vetores da Leishmaniose realmente comprovados são os do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo, e *Lutzomyia* no Novo Mundo (WHO 2010) (Tabela 1.2).

Os flebotomíneos adultos medem de 2 a 3 mm, apresentam intensa pilosidade por todo corpo e, assim como qualquer outro díptero, são holometábolos. Seu ciclo de desenvolvimento compreende uma fase de ovo, uma fase de larva com quatro estágios (L1 a L4), uma fase de pupa chegando, por fim, à fase adulta (Figura 1.7) (Dantas-Torres and Brandao-Filho 2006). Os ovos, larvas e pupas desenvolvem-se em microambientes não aquáticos, com alta umidade e ricos em matéria orgânica (Dillon 2008). O tempo de desenvolvimento do ovo até chegar ao adulto pode variar de acordo com as diferentes condições do hábitat, por exemplo, altas temperaturas encurtam o ciclo de vida do inseto. Entretanto, em condições ideais de laboratório, o ciclo leva de 5 a 6 semanas para a emergência de adultos, havendo predominância de machos nas primeiras semanas.

Os flebotomíneos na fase adulta apresentam comportamento alimentar diferenciados de acordo com o sexo. A alimentação sanguínea é exclusiva das fêmeas por ser imprescindível para o desenvolvimento dos ovos. Ocasionalmente, traços de sangue nos estômagos de machos já foram encontrados, entretanto, como suas probóscides não são capazes de penetrar na pele intacta, acredita-se que o sangue pode ter sido obtido de feridas (WHO 2010). Apesar disso, não existem evidências de que machos possam agir como vetores da leishmaniose, sendo isso uma exclusividade das fêmeas.

Durante o processo de aquisição do sangue, o inseto promove, com seu aparelho bucal, a laceração dos tecidos superficiais da pele no vertebrado. Isso gera

uma resposta imediata com ativação do sistema hemostático na tentativa de conter o sangramento. O inseto, por sua vez, desenvolveu estratégias para burlar essas reações do hospedeiro. Em sua saliva, injetada no momento da picada, estão presentes diversos componentes que promovem a vasodilatação e tem ação anti-coagulante. Todos esses componentes químicos que viabilizarão a ingestão de sangue pelo inseto, também facilitarão a entrada de *Leishmania* no sistema do vertebrado (Charlab, Valenzuela et al. 1999, Dantas-Torres and Brandao-Filho 2006).

Tabela 1.2: Relação das espécies de flebotomíneos vetoras das diferentes espécies de *Leishmania*.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Distribuição geográfica	Vetores
<i>L. donovani</i>	China, Índia, Nepal, Bangladesh, África	<i>P. alexandri</i> , <i>P. argentipes</i> , <i>P. martini</i> , <i>P. orientalis</i>
<i>L. i. infantum</i>	Sul da Europa, Leste do Mediterrâneo, China	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. chinensis</i> , <i>P. major</i>
<i>L. major</i>	Oriente Médio, Sudoeste da Ásia, África	<i>P. papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i>
<i>L. tropica</i>	Oriente Médio, Sudoeste da Ásia, África	<i>P. sergenti</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. aethiopica</i>	África Oriental	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>
<i>L. i. chagasi</i>	América Central e do Sul	<i>L. Longipalpis</i>
<i>L. mexicana</i>	América Central	<i>L. olmeca</i>
<i>L. amazonensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. flaviscutellata</i>
<i>L. braziliensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. wellcomei</i> , <i>L. carrerai</i>
<i>L. guyanensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. umbratilis</i> , <i>L. anduzei</i>
<i>L. panamensis</i>	América Central e do Sul	<i>L. trapidoi</i>

O tubo digestivo dos flebotomíneos torna-se o principal foco ao se estudar a interação *Leishmania*-vetor. É uma estrutura completa com início na probóscide (canal alimentar no qual está localizada a bomba cibarial que é o órgão de sucção para assimilação do alimento) seguida do tubo digestivo que é dividido em anterior, médio, posterior e ânus.

A digestão sanguínea e absorção dos nutrientes ocorrem no intestino médio. Ali também temos o maior contato do inseto com as leishmanias. As células dessa região são responsáveis pela secreção da matriz peritrófica (MP) e de enzimas digestivas, absorção e transporte de nutrientes. Também aqui temos a transformação das leishmanias para formas infectantes (promastigotas metacíclicas).

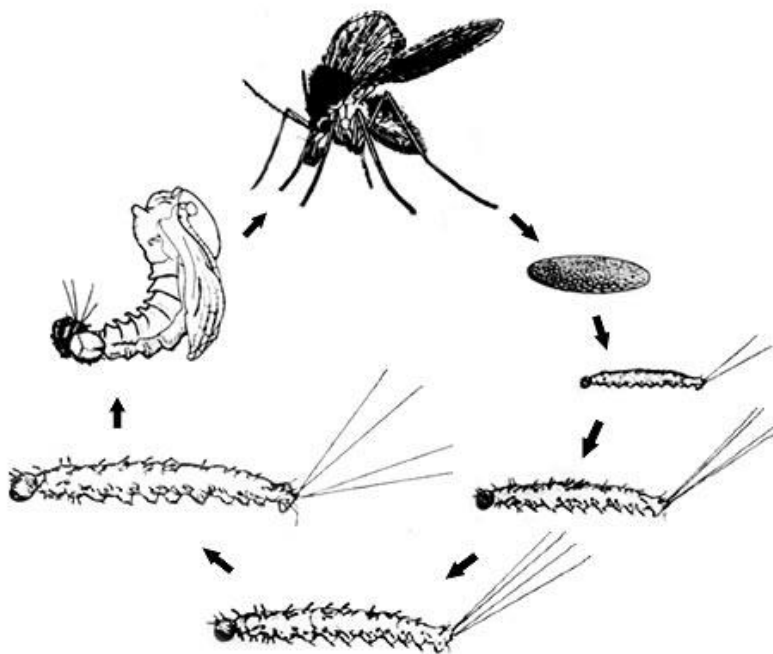


Figura 1.7: Esquema com as fases de desenvolvimento do flebotomíneo *L. longipalpis*: ovo, larvas (L1 a L4), pupa e adulto. (Dillon 2008).

A MP é uma membrana composta por quitina e glicoproteínas. Essa trama de fibrilas de quitina é sustentada por proteínas ligadoras de quitina e glicanos que preenchem o espaço intersticial criando, assim, uma estrutura semi-permeável sensível a alterações de pH. Além de atuar como barreira física na compartimentalização da digestão, proteção contra as enzimas digestivas e contra microorganismos; também tem função de barreira química atuando na inativação de toxinas ingeridas.

A matriz peritrófica pode ser de tipo 1 (MP1) ou de tipo 2 (MP2). A de tipo 1 é produzida pelas células intestinais e recobre grande parte do intestino médio. É encontrada em Coleoptera, Dictyoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, larvas de Lepidoptera e em adultos hematófagos da ordem

Diptera. No caso dos insetos hematófagos, é produzida nas primeiras horas após a ingestão de sangue e envolve todo o bolo alimentar. Tende a ter uma espessura maior do que a matriz de tipo 2 (Hegedus, Erlandson et al. 2009). Recentemente, foi demonstrado que a degradação precoce da MP1 em *L. longipalpis* leva a um encurtamento do tempo de postura e diminuição da produção de ovos (Araujo, Telleria et al. 2012).

A MP2, produzida por células na região da cárdia, apresenta uma estrutura mais organizada com 1 a 3 camadas. Está presente em ordens como Embiodea, alguns organismos de Lepidoptera e estágios imaturos de Diptera. Reveste continuamente o tubo digestivo independentemente da ingestão de alimento (Moskalyk, Oo et al. 1996).

De forma geral, a competência de uma espécie para se tornar vetor depende de uma série de fatores intrínsecos que permitirão ou não que o parasita, no caso a *Leishmania*, seja capaz de sobreviver, se desenvolver, diferenciar e por fim infectar outro organismo. Um exemplo disso é, como mencionado anteriormente, a saliva do inseto que possui substâncias que exercem uma dupla função: a de facilitar a alimentação do inseto e também a de auxiliar a entrada do parasita em um novo hospedeiro (Ramalho-Ortigao, Saraiva et al. 2010).

Além disso, temos a grande diversidade de espécies de flebotomíneos com capacidade vetorial variada. Por exemplo, a diferenciação que vem ocorrendo entre as populações de *L. longipalpis*, causada pela imposição de barreiras naturais estaria influenciando em sua capacidade vetorial e fortalecendo a idéia de formação de um complexo de espécies (Soares and Turco 2003, Souza, Andrade-Coelho et al. 2009).

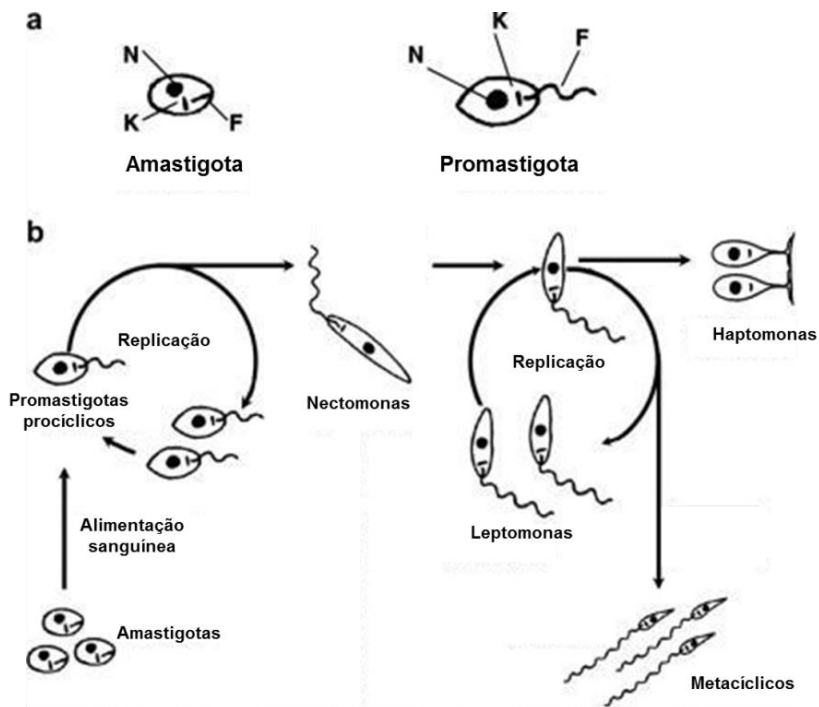
Com isso, a relação *Leishmania* – vetor sugere a ocorrência de um paralelismo evolutivo entre as diferentes espécies do parasita e seus respectivos vetores flebotomíneos. A interação desses insetos com as diferentes espécies de *Leishmania* pode ocorrer de forma específica, na qual uma espécie de flebotomíneo suporta a infecção de apenas uma espécie de *Leishmania*; ou de forma permissiva, na qual o flebotomíneo permite o desenvolvimento de diferentes espécies do parasita (WHO 2010).

1.5 – O CICLO DA *LEISHMANIA* NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO:

O ciclo no flebotomíneo se inicia quando a fêmea se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado com formas amastigotas de *Leishmania sp.*. No intestino médio do inseto, inicia-se o processo de digestão do sangue e também o estímulo à diferenciação dos parasitas para uma forma promastigota procíclica que é mais resistente a esse novo cenário rico em enzimas digestivas e radicais livres. Nas horas seguintes da digestão, as promastigotas iniciam um intenso processo de multiplicação e diferenciação que se estende até após a eliminação dos restos da alimentação.

Ao término da digestão, com a degradação da MP, os parasitas migram para a região anterior do intestino médio onde vão se aderir inserindo seus flagelos entre as microvilosidades das células intestinais (Neves, Melo et al. 2007). Como dito anteriormente, nesse momento, as leishmanias estão sofrendo intensa multiplicação e diferenciação, culminando com a migração de formas diferenciadas para a porção anterior do tubo digestivo. A esse processo damos o nome de metaciclogênese.

Ao longo de todo o ciclo da *Leishmania* dentro do flebotomíneo, podemos observar a presença de cinco diferentes formas promastigotas (Rogers 2004): as formas procíclicas transformadas a partir das amastigotas e que sofrem uma primeira etapa de intensa multiplicação dentro do bolo alimentar; as nectomonas, formas não replicantes e responsáveis pela migração para a região anterior do epitélio intestinal; as leptomonas, diferenciadas à partir das nectomonas, produzem uma segunda fase de intensa multiplicação na região torácica e da válvula estomodeal e são responsáveis pela produção de um material viscoso de proteofosfoglicanos (PSG); as formas haptomonas, de origem indefinida, permanecem aderidas, via hemidesmossomos, ao epitélio da válvula estomodeal; e, por fim, os metacíclicos capazes de secretar uma quitinase que compromete a estrutura da válvula estomodeal o que faz com que, no momento do repasto sanguíneo, o inseto não consiga reter o sangue e as formas infectantes do parasito sejam regurgitadas no local da picada (Schlein, Jacobson et al. 1992) (Figura 1.8b). As formas promastigotas metacíclicas são infectivas para o vertebrado e resistentes à lise pelo sistema complemento (Kamhawi 2006). O tempo aproximado para a *Leishmania* completar seu ciclo de vida no vetor gira em torno de uma a duas semanas dependendo da espécie (Figura 1.9).



Adaptado de Paz *et al.*, 2010. (Paz 2010)

Figura 1.8: Formas adquiridas pela *Leishmania* durante seu ciclo de vida. (A) Divisão clássica das formas encontradas em vertebrados (Amastigota) e invertebrados (Promastigota). (B) Variedades de formas promastigotas encontradas dentro do intestino do vetor.

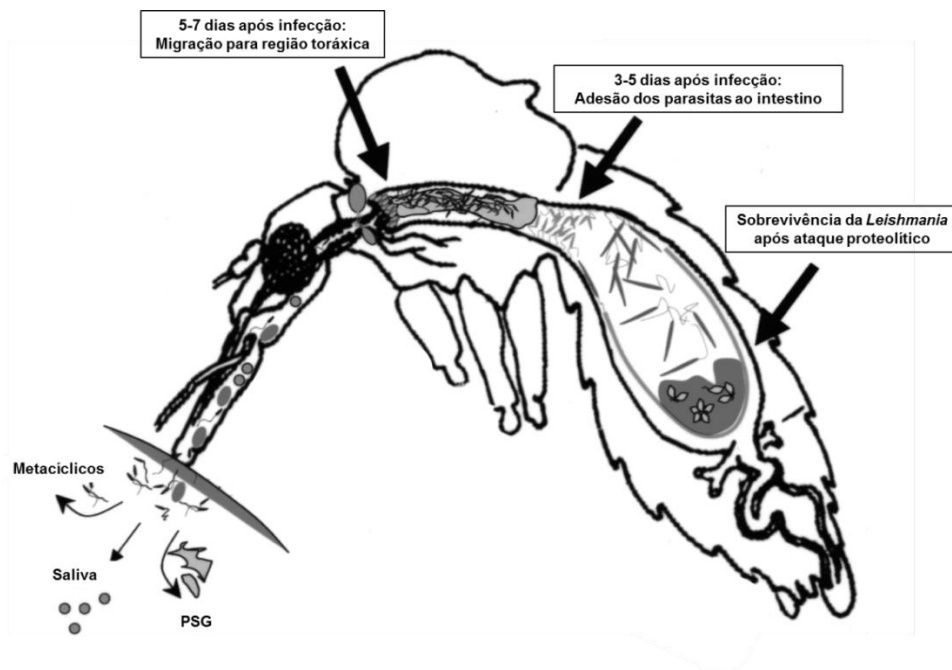


Figura 1.9: Ciclo da *Leishmania* no vetor flebotomíneo. Adaptado de Ramalho-Ortigão M. *et al* (Ramalho-Ortigão, Saraiva et al. 2010).

1.6 – FATORES RELACIONADOS COM A INTERAÇÃO PARASITA-VETOR:

A interação entre flebotomíneos e leishmanias é um processo extremamente complexo que envolve aspectos diversos de ambos os organismos. Para que se possa agir de forma eficaz na eliminação da doença, faz-se necessária a compreensão desses diversos fatores.

Nesse sentido, a ação de proteases digestivas figura como um dos principais empecilhos para a sobrevivência dos parasitas. Nas primeiras horas de infecção, a maior parte das leishmanias é morta por ação dessas enzimas, tendo em vista que, nesse momento, os parasitas encontram-se num processo de transição de formas amastigotas para promastigotas e estão mais susceptíveis. Essa sensibilidade tende a diminuir conforme a diferenciação para a forma flagelada é completada (Ramalho-Ortigao, Saraiva et al. 2010).

Um fator que exerce um papel fundamental na proteção da *Leishmania* durante a digestão é a MP. Pimenta *et al* (Pimenta, Modi et al. 1997) mostraram que a compartimentalização do sangue com os parasitos proporciona uma proteção contra a ação das enzimas digestivas, visto que a inexistência da MP provoca a morte dos protozoários e torna impossível a continuidade da infecção.

As enzimas digestivas tripsina e quimiotripsina são responsáveis pela maior parte da digestão do sangue pelo inseto. Entretanto, parece haver uma conexão dessas enzimas com o processo de infecção das leishmanias. Estudos prévios sugerem que a atividade das tripsinas em *Phlebotomus papatasi* previne a infecção por *Leishmania donovani*; o que não ocorre com a infecção por *Leishmania major*, sugerindo uma capacidade dessa última de modular a atividade das enzimas em questão (Borovsky and Schlein 1987). Em *L. longipalpis* infectado com *L. i. chagasi* foi observada uma redução da atividade de tripsina nos horários de 12h e 48h após a infecção sugerindo uma participação do parasita nessa modulação (Telleria, de Araujo et al. 2010).

Uma das etapas mais importantes para o desenvolvimento do ciclo do parasita no vetor consiste no momento de maior interação com o epitélio intestinal com interação do flagelo com receptores das células epiteliais. Nesse sentido, uma das moléculas mais estudadas em *Leishmania* e que sabidamente possui a capacidade de aderir ao intestino é o LPG (Soares and Turco 2003).

Os primeiros trabalhos sobre o LPG em *Leishmania* mostraram se tratar de um glicoconjugado majoritário formado por unidades repetitivas de

Gal β 1,4Man α 1-4-PO $_4^-$ ancoradas em uma estrutura GPI (Glicosilfosfatidilinositol) e que recobre toda superfície celular (Pimenta, da Silva et al. 1989). Em 1992, Pimenta *et al.* (Pimenta, Turco et al. 1992) demonstraram, em ensaio *ex vivo*, a importância do LPG ao inibir a adesão de *L. major* a intestinos dissecados de *P. papatasi*, incubando previamente esses tecidos com moléculas de LPG purificadas de cultura. Foi mostrado também a capacidade desse glicoconjugado em ligar-se diretamente com intestinos dissecados de *P. papatasi*. Posteriormente, outros trabalhos, utilizando *Leishmania* mutada para o LPG, confirmaram os resultados obtidos por Pimenta *et al.* (Butcher, Turco et al. 1996, Sacks, Modi et al. 2000, Myskova, Svobodova et al. 2007). Foi demonstrado também que durante a metacicloênese o LPG sofre alterações estruturais na sua cadeia de açúcares, o que faz com que os parasitas já “maduros” (formas metacíclicas) percam a capacidade de se manterem aderidos ao epitélio intestinal; permitindo, assim, a migração dos mesmos para a região anterior do tubo digestivo (Mahoney, Sacks et al. 1999).

A participação do LPG na adesão, entretanto, não abrange todos os casos. Ensaio com vetores permissivos mostram que, mesmo na ausência do glicoconjugado, a infecção é capaz de ser bem sucedida (Myskova, Svobodova et al. 2007). Svárovská *et al.* (Svarovska, Ant et al. 2010) demonstraram que flebotomíneos permissivos e específicos infectados com *L. major* mutante para LPG apresentavam níveis de infecção diferenciados. Nas espécies permissivas *P. perniciosus* e *P. argentipes*, a infecção por *L. major* mutada não perturbou o sucesso da infecção. Em contrapartida, no vetor específico *P. duboscqi*, houve uma redução significativa do número de parasitos. Esses dados demonstram a real complexidade dos processos de interação *Leishmania*-vetor e abre possibilidades de pesquisas de novas moléculas que participem desse processo de adesão.

Em 2002, estudos mostraram que moléculas da família das lectinas, que são conhecidas ligantes de carboidratos, recobriam quase que a totalidade da superfície celular no intestino médio de *P. duboscqi* (Volf, Skarupova et al. 2002). Devido às propriedades bioquímicas dessas moléculas, levantou-se a possibilidade das mesmas serem possíveis ligantes de LPG. E, de fato, Kamhawai *et al.* (Kamhawi, Ramalho-Ortigao et al. 2004) identificaram uma galectina, da família das lectinas, em *P. papatasi* capaz de funcionar como receptor de LPG de *L. major*.

1.6.1 – Envolvimento de FLAG1/SMP1 na interação:

Estudos prévios utilizando anticorpo monoclonal (Ismach, Cianci et al. 1989) gerado a partir de frações enriquecidas de flagelo de *L. braziliensis*, e que reconhecia uma proteína de aproximadamente 13,2 kDa, mostraram um possível papel dessa molécula na interação parasita-vetor. Warburg *et al.* (Warburg, Tesh et al. 1989) mostraram que frações enriquecidas com flagelo de *L. major* pré-incubadas com o anticorpo acima descrito, tinham uma adesão 42% menor em tubos digestivos dissecados de *P. papatasi*. Posteriormente, essa proteína flagelar foi identificada, caracterizada e denominada FLAG1/SMP1 (Rojas 1997, Di-Blasi, Lobo et al. 2015) (Anexo I).

A análise bioquímica e funcional de FLAG1/SMP1 mostrou que é uma molécula exclusiva de flagelo, que sofre adição de resíduos miristil e palmitil, e é pertencente à família das pequenas proteínas miristiladas. A adição desses ácidos graxos à proteína é imprescindível para que a mesma possa ser endereçada à membrana plasmática (Tull, Vince et al. 2004). Na membrana, FLAG1/SMP1 exerce um papel fundamental na manutenção da estrutura flagelar, visto que Tull *et al.* (Tull, Naderer et al. 2010) observaram que *L. major* nocaute para o gene de FLAG1/SMP1 apresentou um flagelo atrofiado, estruturalmente desorganizado e com pouquíssima motilidade.

Mais recentemente, o anticorpo monoclonal anti-FLAG1/SMP1 foi utilizado em ensaios de inibição de adesão *ex vivo* e *in vivo* (Di-Blasi, Lobo et al. 2015) (Anexo I). Nos ensaios *ex vivo* o anticorpo foi incubado, juntamente com *L. major* ou *L. i. chagasi*, com intestinos dissecados de *P. papatasi* e *L. longipalpis* respectivamente. Nos ensaios *in vivo*, foram utilizados os mesmos pares *Leishmania*-vetor para realização de infecção artificial também com adição de anticorpo monoclonal anti-FLAG1/SMP1. Esses experimentos mostraram que no par do Novo Mundo *L. longipalpis* e *L. i. chagasi*, não houve inibição de adesão; entretanto, no par do Velho Mundo *P. papatasi* e *L. major*, observou-se uma inibição significativa na adesão de parasitas, no grupo com anticorpo, em ambos os ensaios *ex vivo* e *in vivo*. Esses resultados revelaram um panorama interessante que mostra a complexidade dos processos de interação, que podem variar de acordo com o par *Leishmania*-vetor estudado.

1.7 – IMUNIDADE EM INSETOS:

Assim como em outros seres vivos, nos insetos o exoesqueleto é a primeira barreira a ter contato com microorganismos potencialmente invasores. E, apesar de bastante eficaz, esta barreira nem sempre é suficiente para impedir a entrada de patógenos e, conseqüentemente, a instalação de um processo infeccioso. Em insetos a imunidade inata consiste no conjunto de respostas ativadas mediante invasão por algum agente externo.

Devido à complexidade no estudo de imunidade em mamíferos, as pesquisas foram direcionadas para a utilização de organismos mais simples, como a *Drosophila melanogaster*, que acabou por se tornar um modelo muito importante na área de imunidade inata. Além disso, a existência de certo grau de conservação evolutiva entre *D.melanogaster* e mamíferos, fortalece mais ainda a relevância do estudo de imunidade inata em modelos como esse, mais simples e fáceis de manipular. Isso permitiu uma expansão considerável no estudo de imunidade de insetos em geral, com ênfase em vetores.

Os insetos, de maneira geral, são organismos extremamente resistentes, capazes de suportar as mais diversas alterações ambientais e climáticas, com constante exposição a inúmeros patógenos. Apesar dos insetos não possuírem uma resposta imune como a de mamíferos, não existem dúvidas sobre a capacidade desses organismos para montar uma resposta inata imediata de defesa, fundamental para a sobrevivência (Lowenberger 2001).

Nos insetos, os principais mecanismos de defesa são por ativação de resposta celular, mediada pelas células da hemolinfa chamadas de hemócitos, e uma variação do que se conhece por resposta humoral em mamíferos. Os hemócitos são células de origem mesodérmica que se diferenciam em tipos celulares com funções específicas associadas, dentre as quais estão a fagocitose e o encapsulamento de microorganismos (Aggarwal and Silverman 2008). Como resposta humoral, temos a ativação de cascatas proteolíticas que regulam a coagulação e a melanização da hemolinfa, a produção de espécies reativas de oxigênio e de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Wang and Ligoxygakis 2006, Aggarwal and Silverman 2008).

A produção de PAMs é um dos principais mecanismos de defesa nos insetos e é regulada por duas vias de imunidade bem descritas: a via Toll e a via IMD. A

ativação de ambas as vias é mediada, em geral, por receptores PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins). Na via Toll, esses receptores ativam uma cascata de serina-proteases que culmina com a clivagem e liberação da citocina Spätzle que, por sua vez, liga-se a um dos membros da família de receptores Toll. Essa ligação libera uma cascata de fosforilação que culmina com a translocação de DIF e Dorsal para o núcleo e a produção de AMPs como Defensina, Drosomicina e Cecropina (Figura 1.10) (Silverman 2008, Valanne, Wang et al. 2011).

A segunda via imune, IMD (“Immune Deficiency”), é bem semelhante à via de TNF (“Tumour Necrosis Factor”) de mamíferos. O reconhecimento de patógenos pelos receptores PGRPs desencadeia uma cascata de sinalização do complexo IMD, levando a translocação do fator Relish para o núcleo e síntese de outros tipos de PAMs (Figura 1.10) (Lemaitre 2004).

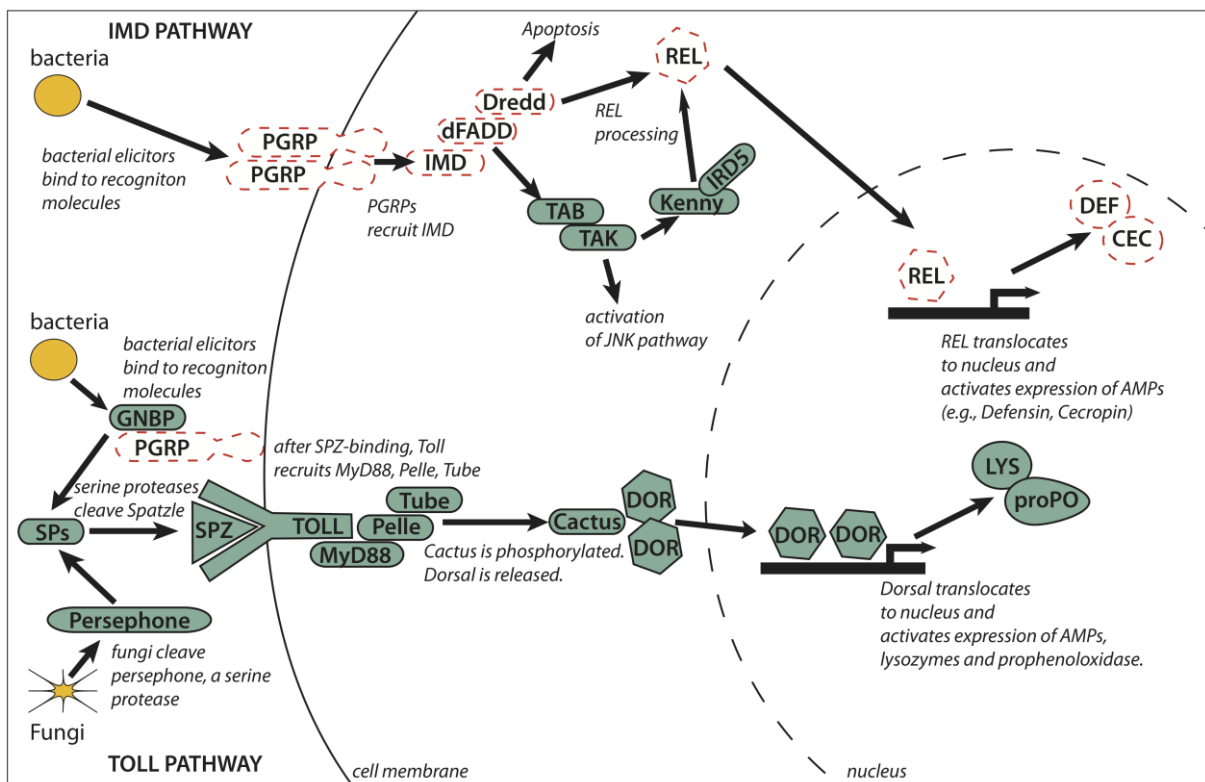


Figura 1.10: Vias de imunidade IMD (superior) e Toll (inferior) em insetos (International Aphid Genomics 2010).

A maior parte das moléculas relacionadas com imunidade (como os PAMs) é produzida em um órgão semelhante ao fígado de mamíferos, chamado corpo gorduroso, que é a principal estrutura de resposta efetiva contra patógenos. Apesar disso, vêm aumentando as evidências de que outros órgãos de invertebrados teriam participação na produção de moléculas efetoras da imunidade. Nesse contexto, o

intestino médio parece ter papel na produção de defensinas em *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Richman, Dimopoulos et al. 1997, Lowenberger 2001).

1.7.1 – Resposta imune em flebotomíneos:

A pesquisa em flebotomíneos é mais recente, mas vem mostrando uma alta conservação em relação às vias de imunidade e seu papel na produção de PAMs. No que diz respeito à via IMD, observou-se que fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *L. mexicana* apresentavam uma redução da expressão de caspar – repressor da via – em tempos tardios pós-infecção (3 e 6 dias). Além disso, o silenciamento desse mesmo gene provocou uma redução da infecção tanto por *L. mexicana* quanto por *L. i. chagasi* (Telleria, Sant'Anna et al. 2012). O estudo mostra que a ativação de efetores da via IMD é capaz de reduzir significativamente a infecção em *L. longipalpis*.

Em *P. duboscqi* houve aumento da expressão de defensina após o desafio com bactéria e *L. major* (Boulanger, Lowenberger et al. 2004). E em *L. longipalpis*, a infecção por diferentes espécies de bactérias, patogênicas e não patogênicas, e por *L. mexicana* também foi capaz de modular a expressão de uma defensina (Telleria, Sant'Anna et al. 2013). Esses dados sugerem uma possível modulação da resposta imune pelos patógenos, provavelmente através da via Toll, gerando o aumento da expressão ou inibição de defensina.

Em modelo de células embrionárias LL5 de *L. longipalpis*, foi observado o aumento da expressão de Cecropina e Defensina 2 frente ao silenciamento dos repressores, tanto da via Toll quanto da via IMD. Além disso, desafios com diferentes tipos de bactérias e com *L. i. chagasi* demonstraram a capacidade dessas células de modularem respostas via Toll e IMD com alteração da expressão de PAMs e outros efetores das respectivas vias (Tinoco-Nunes, Telleria et al. 2016).

1.7.2 – Fator de crescimento e transformação- β (TGF- β):

Em vertebrados, superfamília das TGF- β é composta por citocinas que abrangem uma gama de funções que vão desde proliferação, diferenciação e morte celular, até regulação hormonal, adesão, inibição ou ativação de resposta imune, entre outros. Apesar da variedade de respostas mediadas pelas TGF- β , os

componentes de sua via de sinalização são bastante conservados ao longo da evolução (Kingsley 1994).

As proteínas dessa superfamília são inicialmente traduzidas como proteínas precursoras com um pró-domínio N-terminal, que é importante para a formação da estrutura tridimensional (“folding”) e uma região C-terminal biologicamente ativa e altamente conservada, possuindo de 6 a 9 cisteínas (Kingsley 1994). A clivagem da proteína precursora por furinas e convertases, libera o peptídeo maduro que é secretado na forma de homo ou heterodímero (Massague 1990).

As moléculas de TGF- β transmitem o sinal através de receptores transmembrana serina/treonina kinase de tipo I ou II. Geralmente, a cascata de sinalização é mediada por moléculas Smads, entretanto há também a via de transdução de sinal independente de Smad, que gera ativação por meio da via MAPK (Weiss and Attisano 2013).

Essa superfamília possui mais de 30 membros em mamíferos, todos eles com estrutura dimérica e com a presença do motivo de cisteínas. Muitos membros já foram identificados também em outros organismos como sapos, peixes, vermes e moscas (Weiss and Attisano 2013). Baseado em características estruturais conservadas e homologia de sequências, as TGF- β s foram agrupadas em 3 subfamílias:

- Subfamília DVR (“Decapentaplegic-Vg-related”): com membros amplamente distribuídos no reino animal como as BMPs (“bone morphogenic proteins”) e as GDFs (“Growth differentiation factors”), apresentam funções relacionadas com desenvolvimento de tecidos e órgãos, reparo tecidual e desenvolvimentos de resposta imune adaptativa (Herpin, Lelong et al. 2004).

- Subfamília TGF- β “strictu sensu”: presente apenas em vertebrados, que são proteínas multifuncionais, envolvidas no desenvolvimento, reparo tecidual, hematopoiese, entre outros. Além disso, também desempenham papel importante no desenvolvimento da resposta imune e apresentam atividade anti-inflamatória (Herpin, Lelong et al. 2004).

- Subfamília das ativinas/inibinas: em mamíferos, seus membros estão envolvidos na regulação hormonal, por exemplo, regulando negativamente o hormônio FSH (Rivier, Rivier et al. 1986). Estão também relacionados com regulação da resposta imune inata. Estudos recentes mostram a importância da expressão dessas moléculas para a homeostase do sistema imune (Aleman-Muench and Soldevila 2012). Em *Drosophila*, as ativinas são importantes para as funções

neuronal e de crescimento durante o desenvolvimento (Ellis, Parker et al. 2010, Ageta and Tsuchida 2011) além de estarem relacionadas a processos de diferenciação (Brummel, Abdollah et al. 1999).

Além da produção de PAMs, o intestino médio tem sido apontado como um dos responsáveis pela produção de citocinas-*like*, moléculas capazes de regular a resposta imune. Em *Drosophila*, observou-se o efeito das moléculas dpp e daw, pertencentes à superfamília das TGF- β , na regulação da resposta imune. A citocina dpp, produzida também no intestino, é induzida por injúria física e infecção, e regula a resposta por PAMs (Clark, Woodcock et al. 2011).

No vetor da malária *Anopheles stephensi* foi identificado o gene As60A, codificante para uma TGF- β da subfamília DVR, expressa no intestino médio desses insetos (Crampton and Luckhart 2001a, Crampton and Luckhart 2001b). Dados do mesmo grupo mostram também uma possível ação desse gene na regulação de expressão de iNOS e da infecção pelo *Plasmodium* (Price, Ermentrout et al. 2013).

Anteriormente, nosso grupo identificou um cDNA de TGF- β em fêmeas de *L. longipalpis*. Análises de bioinformática constataram que o gene de TGF- β em questão possui alta similaridade com a família das ativinas.

Experimentos de “Western Blot” em fêmeas alimentadas revelaram um aumento progressivo de TGF- β no tubo digestivo até o tempo de 120h após a alimentação sanguínea (Marques 2005). Posteriormente, análises de PCR semi-quantitativo para o gene de TGF- β constataram um aumento significativo de sua expressão em fêmeas de *L. longipalpis* 72 horas após a infecção com *L. i. chagasi* (resultados não publicados).

Esses resultados prévios sugeriram um possível envolvimento desta molécula com imunidade inata do flebotomíneo *L. longipalpis*.

O estudo dos aspectos moleculares que envolvem a interação *Leishmania*-vetor é fundamental para que possamos compreender o que pode estar influenciando o desenvolvimento da *Leishmania* no inseto e com isso, no futuro, sermos capazes de desenvolver estratégias mais eficazes de combate a essa doença.

II – OBJETIVOS

2.1- GERAIS:

- Identificar moléculas expressas em flebotomíneos com potencial para interagir com a proteína flagelar FLAG1/SMP1.
- Determinar o papel da citocina LITGF- β na interação de *L. i. chagasi* com *L. longipalpis*.

2.2- ESPECÍFICOS:

2.2.1- Proteína FLAG1/SMP1:

- Verificar a capacidade de adesão de *L. major* e *L. i. chagasi* à cultura de células embrionárias LL5 e PP9;
- Determinar a capacidade da proteína FLAG recombinante em se ligar a tubo digestivo dissecado de *P. papatasi* por imunofluorescência indireta;
- Identificar proteínas de *P. papatasi* capazes de interagir com FLAG1/SMP1.

2.2.2- TGF- β de *L. longipalpis*:

- Avaliar o efeito do silenciamento de TGF- β na expressão de genes potencialmente regulados por essa citocina;
- Analisar o efeito do silenciamento de TGF- β sobre a taxa de infecção por *L. i. chagasi* em fêmeas de *L. longipalpis*.

III – MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Tampões e soluções:

3.1.1- PBS 10X (Phosphate-buffered Saline) (1L):

NaCl.....85,0g

Na₂HPO₄.2H₂O.....15,5g

NaH₂PO₄.H₂O.....2,3g

Ajustar pH para 7,2 - 7,4

3.1.2- TBS (Tris-buffered Saline) (1L):

Tris base.....24g

NaCl.....84g

Ajustar pH para 7,4

3.1.3- Tampão de Lise:

Tris-HCl (pH 7,4).....20mM

NaCl.....100mM

Tween-20.....0,2%

Coquetel de inibidores de proteases (ROCHE).....1X

3.1.4- Tampão de Lavagem:

Tris- HCl.....20mM

EDTA.....1mM

NaCl.....200 mM

Coquetel de inibidores de proteases (ROCHE).....1X

3.1.5- Tampão de amostra para gel de poliacrilamida 5X:

Tris-HCl (pH 6,8).....250mM

SDS.....10 %

Azul de bromofenol.....0,5 %

Glicerol.....50 %

β-mercaptoetanol.....500 mM

3.1.6- Tampão de Transferência 1X (1L):

Tris base.....3g
Glicina.....14,4g
Etanol.....200ml

3.2- Meios de cultura:

3.2.1- Meio LB (Luria-Bertani)

Triptona.....10 g/L
Extrato de levedura.....5 g/L
NaCl.....5 g/L
Ajuste do pH para 7,2 – 7,4.

3.2.2- Meio LB-agar

Triptona.....10 g/L
Extrato de levedura.....5 g/L
NaCl.....5 g/L
Agar.....15 g/L

3.2.3- Meio L15 suplementado

Meio comercial L-15.....1X
Streptomicina.....100 U/ml
Penicilina.....100 g/ml
Hepes.....10 mM
Meio Triptose fosfato.....10 %
Soro fetal bovino inativado.....10 %

3.2.4- Meio 199 suplementado

Meio 199 (Gibco).....1X
Hepes 1M, pH 7,4.....40 mM
Adenina 10mM.....100 µM
Biotina (0,1% em etanol).....1 ml
Hemina.....2,5 µg/ml
Penicilina.....100 U/ml
Estreptomicina (10mg/ml).....100 µg/ml

3.3- Cultura de parasitos:

As formas promastigotas de *L. major* (MHOM/IL/80/FN) e *L. i. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) foram cultivadas a 25°C em meio 199 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi).

Os parasitos promastigotas foram coletados após 3 dias de cultura, na fase exponencial de crescimento com a predominância de formas procíclicas.

3.4- Cultura de células embrionárias de *L. longipalpis* (LL5) e de *P. papatasi* (PP9):

Células LL5 e PP9 foram mantidas a 30°C em meio L15 (Sigma), suplementado com 10% SFBi, penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 U/mL.

3.5- Insetos:

L. longipalpis foram obtidos a partir de colônia de insetos provenientes de Jacobina (Bahia), já estabelecida no laboratório.

Uma parte dos insetos da espécie *L. longipalpis*, utilizados nos experimentos de incubação com anticorpo anti-TGF-β, e todos os *P. papatasi* foram obtidos nas colônias estabelecidas no laboratório do Professor Marcelo Ramalho Ortigão, na Universidade Estadual do Kansas, onde parte dos experimentos foram realizados. Essas colônias foram estabelecidas com espécimes provenientes de Jacobina (Bahia), no caso de *L. longipalpis*, e Israel no caso de *P. papatasi*.

3.6- Oligonucleotídeos:

Os oligonucleotídeos utilizados na execução dos ensaios (Tabela 2.1) foram desenhados com base nas sequências depositadas no GenBank.

Tabela 3.1: Quadro de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Nome	Sequência	Gene alvo	Utilização
bgal LP1	TGG CGC CCC TAG ATG TGA TGG CAC CCT GAT TGA	Adaptador + β -galactosidade	Silenciamento gênico
bgal RP1	TGG CGC CCC TAG ATG TCA TTG CCC AGA GAC CAG A	Adaptador + β -galactosidade	Silenciamento gênico
T7+adaptor	CCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT GGC GCC CCT AGA TG	T7 + Adaptador	Silenciamento gênico
dsTGFB-AM097567-F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCT ATC ATG CCT ACT TC	LITGF β	Silenciamento gênico
dsTGFB-AM097567-R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCA AAA CTT TCT GTG TG	LITGF β	Silenciamento gênico
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T7	Silenciamento gênico
LIRP49F	GAC CGA TAT GCC AAG CTA AAG CA	Subunidade - proteína ribossomal	PCR tempo real - Expressão
LIRP49R	GGG GAG CAT GTG GCG TGT CTT	Subunidade - proteína ribossomal	PCR tempo real - Expressão
LITGFb 97567-F	CTC TTC TAC TTG GAC AGC AA	LITGF β	PCR tempo real - Expressão
LITGFb 97567-R	CAT ACA GCC GCA TCC TTC	LITGF β	PCR tempo real - Expressão
Leish-Actin Fwd	GTC GTC GAT AAA GCC GAA GGT GGT T	Actina	PCR tempo real - Expressão
Leish-Actin Rev	TTG GGC CAG ACT CGT CGT ACT CGC T	Actina	PCR tempo real - Expressão
Defensin4-F	ATC CAT CCT TTA TGC AAC CG	Defensina 2	PCR tempo real - Expressão
Defensin4-R	GCC TTT GAG TCG CAG TAT CC	Defensina 2	PCR tempo real - Expressão
Cecropina-F	TGG CAG TCC TGA CCA CTG GA	Cecropina	PCR tempo real - Expressão
Cecropina-R	CTT CTC CAC TGA ACG GTG AAC G	Cecropina	PCR tempo real - Expressão
LuloAtacina-F	AGGCTGATCCTCTGGGTCCTGT	Atacina	PCR tempo real - Expressão
LuloAtacina-R	ATGGGCATGGCAGCGTCTCT	Atacina	PCR tempo real - Expressão
SHP-RT-F	TCA GAC ACA GGA ATG GGG AC	SHP-1	PCR tempo real - Expressão
SHP-RT-R	TAC GTC TCT CCT CCT TGC CA	SHP-1	PCR tempo real - Expressão
Cactus-RT-F	CTA ATC CGA ATG AAT CCC TAC CC	Cactus	PCR tempo real - Expressão
Cactus-RT-R	GAC CCA CGA TCA CGG CTA GA	Cactus	PCR tempo real - Expressão
LLiNOS-FWD	TGGCTGTCGCAATTTGTGTG	inducible Nitric Oxide Synthase	PCR tempo real - Expressão
LLiNOS-REV	CCGCAATGTTACCTCAACC	inducible Nitric Oxide Synthase	PCR tempo real - Expressão
HYALURONAN FWD	GGTACCCAAGCAACATCCTG	Hyaluronan	PCR tempo real - Expressão
HYALURONAN REV	TGCGCAAATTTGACTGTGGT	Hyaluronan	PCR tempo real - Expressão

3.7- Extração de RNA total:

A obtenção de RNA total foi feita utilizando o reagente TRIzol (Ambion), seguindo protocolo do fabricante. Foram adicionados 500 µl de reagente por amostra, seguido por ruptura dos tecidos/células com um pistilo. Foi feita uma centrifugação a 12000 x g, 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 ml. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, foram adicionados 200 a 300µl de clorofórmio, e os tubos foram agitados vigorosamente e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Este material foi centrifugado por 15 minutos a 12000 x g a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, evitando assim a contaminação pelo DNA contido na interfase aquosa/ orgânica. Ao novo tubo foi adicionado 1 µl do polímero Glycoblue (Ambion) e isopropanol na proporção de 1:1, promovendo a precipitação do RNA por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e uma lavagem do pellet obtido com etanol 75%. Após a secagem do material a temperatura ambiente, o mesmo foi ressuscitado em 10 µl de água MilliQ. Todos os RNAs extraídos foram quantificados em um NanoDrop e armazenados a -80°C.

3.8- Tratamento do RNA total extraído com DNase:

Os RNAs foram tratados utilizando “DNA-free Kit” (Ambion). Foram tratados até 5 µg de RNA utilizando 2 unidades de enzima por reação. As amostras foram então incubadas a 37°C por até 2 horas seguido pela adição 1 µl de “DNase Inactivation Reagent” para cada 10 µl de volume final. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugadas a 10.000xg por 1,5 minuto e o sobrenadante, transferido para um novo tubo.

3.9- Síntese de cDNA:

Para a síntese da fita complementar foi utilizado o kit “SuperScript III First-Strand Synthesis” (Invitrogen) e o protocolo adaptado do fabricante.

O RNA tratado com DNase foi utilizado na primeira parte da reação em que foram adicionados 1 µl de oligo(dT)₁₈ e 1 µl de dNTP 10mM. Essa mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e no gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 4 µl de tampão 5x, 1 µl de 0,1M DTT, 1 µl de RNase OUT e 1 µl de SuperScript III RT. A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 2 horas e 70°C por 15 minutos.

3.10- PCR quantitativo:

Os RNAs extraídos e empregados na síntese de cDNA, foram utilizados nos experimentos de PCR em tempo real realizados em duplicata experimental com duas a três replicatas biológicas.

Na reação, foram empregados 6µl de SYBRGreen 2x Mix (Applied Biosystems), 4µl de cDNA diluído 1:20 e 2 µl de um mix com oligonucleotídeos senso e anti-senso a 2,5µM. Os pares de oligos utilizados seguem discriminados na tabela 3.1.

O termociclador utilizado foi o Applied Biosystems 7500 e o ciclo de amplificação foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 42 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os cálculos para quantificação da expressão gênica relativa foram feitos com o método $\Delta\Delta Ct$.

3.11- Incubação de *Leishmania sp.* com células embrionárias LL5 e PP9:

No dia anterior ao experimento, células PP9 e LL5 foram plaqueadas em placa de 96 poços (5×10^4 células/ poço). No dia seguinte, culturas de *L. i. chagasi* e *L. major* foram lavadas 3 vezes com TBS 1x e os parasitas contados em câmara de Neubauer. A cada poço foram adicionados 5×10^5 parasitas em meio Schneider. Cada amostra foi feita em triplicata e cada tipo celular foi incubado com as duas espécies de *Leishmania*. Os parasitas foram incubados a 27°C por 1,5h, 3h, 6h e 12h. Após esse tempo, as células foram cuidadosamente lavadas 2 vezes com PBS pH7,4 e 100µl de TRIzol foram adicionados a cada poço. Foi realizada a extração de RNA total seguindo protocolo do fabricante.

Em paralelo, foi realizado um experimento de competição de adesão das leishmanias às células embrionárias, seguindo os mesmos parâmetros especificados acima. No mesmo momento em que as leishmanias foram adicionadas aos poços com as células LL5 e PP9, foram adicionadas concentrações crescentes de 100ng, 500ng e 1000ng das proteínas recombinantes FLAG/MBP e MBP (controle). Esse material também foi processado em TRIzol e o RNA total extraído seguindo protocolo do fabricante.

3.12- Purificação das proteínas induzidas FLAG/MBP e MBP por coluna de maltose:

As proteínas FLAG/MBP e MBP foram induzidas a partir dos clones obtidos previamente em nosso laboratório (Lobo 2008). O vetor de expressão utilizado na clonagem foi pMAL-c4X (Biolabs). A clonagem do gene nesse vetor promoveu a expressão de FLAG fusionada a proteína de ligação a maltose (MBP).

Os clones contendo o inserto correto (FLAG) e aqueles apenas com o plasmídeo foram estocados em glicerol 10% a - 80°C. Para a expressão dessas proteínas, 5 µl de cada plasmídeo foram inoculados em 10 ml de meio LB e incubados por 16 horas a 37°C. Dessa cultura inicial, foi coletado 1 ml para uma nova diluição em um Erlenmeyer de 500 ml. A cultura foi posta em agitação a 200 rpm e temperatura de 37°C e a densidade óptica (OD₆₀₀) monitorada até alcançar o valor ótimo de 0,6 quando foram adicionados 1mM de IPTG para induzir a expressão. A cultura foi incubada com IPTG por 3 horas já que, por experimentos realizados previamente, se sabia que a proteína era mais expressa após 2 horas de indução e que se apresentava no estado solúvel.

As culturas foram centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o pellet de bactérias ressuscitado em 10 ml de Tampão de Lise. As amostras foram sonicadas no gelo por 6 ciclos de 20 segundos cada, centrifugadas a 16.000 x g por 40 a 60 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. As frações do sobrenadante foram separadas e armazenadas a -80°C para posterior purificação das proteínas. Os extratos de proteínas induzidas foram quantificados pelo Método de Bradford (Bradford 1976).

As proteínas FLAG/MBP e MBP foram purificadas segundo protocolo do fabricante do vetor “pMAL protein fusion and purification system” (Biolabs).

Em dois tubos Falcon de 15ml foram adicionados 2ml de resina de amilose (Biolabs) que foram lavadas com 8ml de Tampão de Lavagem por 3 vezes com centrifugações a 1.000 rpm por 10 minutos. O volume correspondente a 6 mg de cada extrato total induzido obtido no sobrenadante foi adicionado aos dois tubos com resina seguido por 5ml do Tampão de Lavagem. O extrato foi incubado com a resina a 4°C por 16 horas em agitação e as proteínas FLAG/MBP e MBP foram eluídas das respectivas resinas pela adição de 1 ml de Tampão de Lavagem acrescido de 10 mM de maltose. Retirou-se de cada resina 5 frações de 1ml de proteína purificada, que foram devidamente quantificadas e guardadas a -80°C.

3.13- Extratos proteicos de células embrionárias PP9 e de intestinos dissecados de *P. papatasi*:

Os extratos totais de PP9 foram obtidos utilizando Tampão de Lise. As células foram primeiramente lavadas 3 vezes com PBS 1X com centrifugações a 1000 x g e ressuspensas com 1ml de Tampão de Lise por 5×10^6 células. As amostras foram sonicadas com 6 pulsos de 30 segundos e o extrato total foi quantificado pelo Método de Bradford (Bradford 1976).

“Pools” com cerca de 200 intestinos dissecados de *P. papatasi*, 72h após alimentação sanguínea e já sem sangue, foram mantidos em 500 µl de Tampão de Lise. Essas amostras foram então sonicadas com 10 pulsos de 30 segundos e o extrato total foi quantificado por utilizando o kit “Micro BCA Protein Assay” (ThermoScientific).

3.14- Acoplamento das proteínas recombinantes purificadas a resina de Sepharose:

Cerca de 5mg de proteínas FLAG/MBP e MBP foram utilizadas para acoplamento na resina de sefarose “CNBr-activated Sepharose 4B” (GE Healthcare), utilizando o protocolo do fabricante. Após o procedimento, as resinas foram armazenadas a 4°C com 0,05% de azida sódica.

3.15- Experimentos de *pull down*:

Nesses experimentos, foram utilizadas como “iscas” as proteínas FLAG/MBP e MBP purificadas por resina de amilose (Biolabs) e fixadas em resina “CNBr-activated Sepharose 4B” (GE Healthcare).

Nos experimentos com extratos de células, 200 µl a 300 µl de ambas as resinas foram lavadas duas vezes com 1 ml de Tampão de Lise e ~200 µg de extrato protéico de PP9 em Tampão de Lise e 10mM de CaCl₂ foram adicionados. As resinas com o extrato foram incubadas a 25°C por 2 horas sob agitação, o sobrenadante foi retirado e a resina foi lavada duas vezes com 1 ml de Tampão de Lise com centrifugações de 1000 x g por 10 minutos a 4°C.

Para o “pull down” com extrato protéico de intestino dissecado de *P. papatasi*, 50 µl de cada resina foram lavadas duas vezes com 500 µl de Tampão de Lise e, em seguida, incubadas, por 2 horas a temperatura ambiente, com 50 µg de extrato total e 10 mM de CaCl₂ cada. Logo após, o sobrenadante foi removido e as resinas lavadas 2 vezes com Tampão de Lise.

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE): a um volume de 20 µl de cada resina, adicionou-se 4 µl de tampão de amostra de proteína. Essas amostras foram fervidas por 5 minutos, centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida. Após a corrida a 100V por 2 horas o gel foi corado pela prata através do “Pierce Silver Stain Kit” (ThermoScientific).

3.16- Sequenciamento das amostras de “pull down” por espectrometria de massa:

As colunas teste (resina FLAG/MBP) e controle (resina MBP) do gel de SDS-PAGE foram excisadas, colocadas em tubos estéreis de 1,5ml e enviadas para sequenciamento.

O experimento com extrato de células PP9 foi enviado para a plataforma de espectrometria de massa PDTIS/FIOCRUZ-RJ, onde foi purificado do gel, tripsinizado e sequenciado com o aparelho LC-ESI-IONTRAP (ThermoScientific).

O experimento com extrato de intestinos dissecados de *P. papatasi* foi enviado para plataforma “Biotechnology/ proteomics Core Lab” em Kansas State

University e sequenciado no aparelho “Bruker Daltonics Ultraflex III MALDI TOF/TOF Mass Spectrometer”.

3.17- Microscopia confocal para avaliação de interação de proteína recombinante FLAG1/SMP1 com intestinos dissecados de *P.papatasi*:

Para avaliarmos capacidade de adesão da proteína recombinante FLAG/MBP a intestinos de fêmeas de *P. papatasi*, fizemos a dissecação de aproximadamente 10 intestinos por grupo de fêmeas 72h após alimentação sanguínea. Os intestinos, em tampão PBS, foram então abertos de forma a expor o lúmen e fixados com 2% paraformaldeído por 20 minutos a 4°C. Após duas lavagens consecutivas com PBS gelado, as amostras foram bloqueadas com 1% Albumina Sérica Bovina (ASB) + 100µg/ml de proteína recombinante MBP por 1 hora a temperatura ambiente. Metade dos intestinos foram mantidos na solução de bloqueio (grupo controle) enquanto a outra metade foi incubada por 30 minutos com proteína recombinante FLAG/MBP em PBS/ASB 1% (grupo teste). Ambos os grupos foram, lavados 2 vezes com PBS-tween 0,3% e incubados por 1 hora a 4°C com anticorpo policlonal anti-FLAG a 1:100. Após essa incubação, os intestinos foram lavados 3 vezes com PBS-tween 0,3% e incubados por 1 hora com anticorpo secundário Alexa 594 anti-rabbit a 1:1.000. Após repetir o mesmo procedimento de lavagem, os intestinos foram incubados por 5 minutos com DAPI (10µg/ml), lavados novamente e montados em lâminas para microscopia utilizando o ProLong® Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

As lâminas prontas foram mantidas a 4°C. e analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss 700, com aumentos de 20X e 40X, na plataforma confocal de “College of Veterinary Medicine” em “Kansas State University”, Kansas-EUA.

3.18- Western Blotting para detecção de TGF-β:

Para detecção da proteína TGF-β por *western blot* utilizamos pools de 5 insetos inteiros alimentados com açúcar (0h) ou sangue de hamster nos horários de

2h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Utilizamos também 5 µl de sangue de hamster e de coelho para aplicação direta no gel.

As amostras foram maceradas e homogeneizadas com tampão de amostra para gel de acrilamida 1X. Foram então fervidas a 95°C por 5 minutos, centrifugadas a velocidade máxima por 1 minuto e o sobrenadante usado para aplicação em gel de SDS-PAGE 12%.

Em seguida, as amostras separadas pela corrida do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 2 horas a 4°C em Tampão de Transferência 1X padrão.

As membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-TGFβ a 1:500 por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com tampão TBS-tween 0,05% e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-rabbit (SantaCruz) a 1:40000. Após nova lavagem, as membranas foram tratadas com o kit “SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate” (ThermoScientific) e reveladas em câmara escura com filme fotográfico com tempos de exposição que variaram de 30 segundos a 5 minutos.

3.19- Silenciamento do gene de TGF-β por interferência de RNA:

O silenciamento de TGF-β foi realizado com a injeção de RNA dupla-fita (dsRNA) na região do tórax de *L. longipalpis*. A síntese de dsRNA foi realizada através do kit T7 Megascript (Ambion) com fragmentos amplificados por PCR. A dupla fita do cDNA do gene para β-Galactosidase (dsβGal) foi utilizada como controle (dupla-fita não relacionada) de silenciamento nesses experimentos. O material utilizado na geração de dsTGF-β foi obtido à partir de cDNA de tubos digestivos de fêmeas após 24 horas da alimentação sanguínea gerando um fragmento de aproximadamente 400pb.

As PCRs foram realizadas utilizando um par de primers (Tabela 3.1) com extremidades 5` codificando para a região promotora T7. A PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os produtos das PCRs foram purificados e concentrados através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O material foi então quantificado no equipamento Nanodrop e utilizado na síntese de RNA dupla-fita.

O volume de 32 μ l de ds β Gal ou dsTGF- β (4 μ g/ μ l aproximadamente) foi introduzido no tórax de flebotomíneos, com 4 a 6 dias de vida previamente anestesiados em gelo, com o auxílio de um micro-injetor (Nanoject, Drummond) e microcapilares de vidro. Após as injeções, os insetos foram mantidos em câmara úmida e alimentados com solução açucarada.

Para as extrações de RNA, "pools" de 5 insetos de cada grupo foram coletados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção.

3.20- Infecção por *L. i. chagasi* de insetos silenciados para o gene LITGF- β :

Fêmeas de *L. longipalpis* com cerca de 5 a 6 dias de idade foram utilizadas nos experimentos de silenciamento seguidos de infecção. Primeiramente, foi feita a microinjeção com dsLITGF- β e ds β Gal como descrito no item anterior. Cerca de 24h após as injeções, os insetos foram submetidos a infecção por *L. i. chagasi*.

Os dois grupos foram alimentados artificialmente no aparelho hemotek com 0,5ml de sangue de hamster contendo 1×10^7 *L. i. chagasi*/ml. O sangue, previamente retirado através de uma punção cardíaca, foi centrifugado a 3.000 xg por 10 minutos, as hemácias lavadas três vezes com PBS e o plasma inativado a 56°C por 45 minutos. Após o período de alimentação de cerca de 2 horas, os insetos foram mantidos com solução açucarada.

Pools de 5 fêmeas foram retirados nos horários de 24h, 48h e 72h após a infecção e colocados em solução de TRIzol para posterior extração de RNA.

3.21- Infecção artificial de *L. longipalpis* por *L. i. chagasi* com anticorpo policlonal anti-TGF- β :

Inicialmente os anticorpos IgG presentes no soro do coelho foram quantificados através do kit "Easy-Titer IgG Assay" (Thermo Scientific). Esse protocolo baseia-se na construção de uma curva padrão com o reagente controle para IgG, fornecido pelo kit, e preparação de pelo menos 2 diluições da amostra alvo. Esses preparados são incubados com esferas reativas a IgG por 5 minutos e analisados em um espectrofotômetro a 405 nm ou 340 nm. A concentração de IgG foi determinada pela seguinte fórmula: $d = d_1 + (g - g_1) / (g_2 - g_1) \cdot (d_2 - d_1)$, no qual d é

a concentração de IgG da amostra alvo em ng/ml, d_1 é a menor concentração da curva-padrão, g é a absorbância da amostra, g_1 é a menor absorbância da curva-padrão, g_2 é o maior valor de absorbância da curva-padrão, d_2 é a maior concentração da curva-padrão.

Com a concentração de anticorpo no soro determinada, os experimentos de alimentação foram realizados da seguinte forma: dois grupos com aproximadamente 100 fêmeas foram alimentadas artificialmente com 500 μ l de sangue de camundongo contendo $2,5 \times 10^6$ *L. i. infantum*. No grupo teste, foi adicionado ao sangue com parasitos anticorpo policlonal anti-TGF β na proporção de 1:250. Após a alimentação, as fêmeas engurgitadas foram separadas.

72 horas após a infecção, 6 a 8 insetos de cada grupo foram dissecados e analisados em Câmara de Neubauer quanto à presença de parasitos. Esse experimento foi realizado 2 vezes.

3.22- Construção de gráficos e análise estatística:

Todos os gráficos apresentados neste trabalho foram construídos pelo programa GraphPad Prism 5 no formato de gráfico de pontos ou de colunas.

As análises estatísticas foram realizadas pelo mesmo programa utilizando a avaliação por “One-way Anova” aplicando o teste de múltiplas comparações de Bonferroni ou Teste-t com o pós-teste de Mann Whitney ou Wilcoxon.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Capítulo 1 – FLAG1/SMP1

4.1.1 – Análise de proteômica e de expressão gênica a partir de *pull down* com extrato de células PP9:

A adesão da *Leishmania* ao epitélio intestinal do flebotomíneo é fundamental para o sucesso da infecção. O LPG presente em toda a superfície da *Leishmania* é a principal molécula responsável por essa etapa do ciclo em vetores específicos como *P. papatasi* (Pimenta, Saraiva et al. 1994, Sacks, Pimenta et al. 1995, Kamhawi, Modi et al. 2000). A adesão ocorre através das unidades repetidas de açúcares (galactose e arabinose) nas cadeias laterais da molécula. Ensaios com *L. major* mutante para essas cadeias laterais de açúcares, indicaram a incapacidade desses mutantes em estabelecer infecção em *P. papatasi* (Butcher, Turco et al. 1996).

Além de ser responsável pela adesão LPG sofre alterações nas cadeias laterais de açúcares durante a metaciclogênese, o que promove o desligamento das formas metacíclicas e sua migração para a porção anterior do tubo digestivo (Pimenta, Turco et al. 1992).

Outros estudos mostram que lectinas são possíveis ligantes para moléculas de superfície dos parasitas. Essas proteínas estão presentes na superfície do epitélio intestinal de diversas espécies de flebotomíneos e, em ensaios *in vitro* foi observada sua capacidade de aglutinar leishmanias (Svobodova, Volf et al. 1996). De fato mais recentemente foi visto que LPG de *L. major* foi capaz de se ligar a moléculas de galectina, membro da família das lectinas, presente no tubo digestivo de *P. papatasi* (Kamhawi, Ramalho-Ortigao et al. 2004). Posteriormente, lectinas também foram associadas à adesão em intestinos de vetores permissivos como *Lutzomyia longipalpis* (Myskova, Svobodova et al. 2007).

Infecções em vetores permissivos como *L. longipalpis*, entretanto, demonstraram que LPG nesse caso não é essencial para a adesão às células intestinais (Sacks, Modi et al. 2000, Myskova, Svobodova et al. 2007, Secundino, Kimblin et al. 2010, Svarovska, Ant et al. 2010). Experimentos de infecção com *L. major knockout* para LPG mostraram que em vetores permissivos a ausência dessa molécula não prejudica a evolução da infecção, ao contrário do que acontece ao

utilizar seu vetor específico *P. papatasi*, já que a ausência de LPG depleta a infecção no inseto (Myskova, Svobodova et al. 2007, Svarovska, Ant et al. 2010). Tendo em vista esses trabalhos mais recentes (Myskova, Svobodova et al. 2007, Svarovska, Ant et al. 2010), foi fortalecida a hipótese de que outras moléculas, além do LPG, possam estar participando da adesão da *Leishmania* ao tubo digestivo do vetor.

No par *L. major* e *P. papatasi*, a importância do LPG para o sucesso da infecção é indiscutível. Entretanto, um trabalho recente do nosso grupo mostrou que outra molécula também desempenha um papel de relevância (Di-Blasi, Lobo et al. 2015) (Anexo I). Di-Blasi *et al.* mostraram que o bloqueio da proteína FLAG1/SMP1, presente no flagelo de *Leishmania*, por incubação prévia com anticorpo monoclonal específico gerou uma perda significativa da capacidade de adesão de *L. major* a intestinos dissecados de *P. papatasi*, e também que 72h após a alimentação artificial com o anticorpo e o parasita houve uma redução significativa da infecção (Anexo I).

Ainda não se sabemos como ocorre a participação de FLAG1/SMP1 no processo de interação com o epitélio intestinal. Com o intuito de identificar possíveis moléculas em *P. papatasi* com capacidade de ligar à proteína recombinante FLAG1/SMP1, foram realizados experimentos de *pull down*. Inicialmente, foram utilizados extratos de células embrionárias PP9 devido à ausência dessa espécie de flebotomíneo no continente americano. Além disso, a possibilidade de encontrarmos candidatos interessantes em um modelo cuja manipulação é mais fácil seria muito interessante, inclusive para aplicações em estudos futuros.

Foram realizados três experimentos de *pull down* independentes (Figura 4.4). No ensaio de *pull down*, as proteínas recombinantes FLAG/MBP e MBP foram acopladas à resina de Sepharose e incubadas com extrato de células embrionárias.

Comparando-se a resina FLAG com a resina controle, foram detectadas 3 regiões de alto peso molecular exclusivas do grupo FLAG (Figura 4.4 – setas). Essas regiões, somadas à banda da proteína FLAG/MBP, foram excisadas dos géis e sequenciadas na plataforma de Proteômica PDTIS/FIOCRUZ-RJ.

Com os dados obtidos foi gerada uma lista com 69 proteínas identificadas (Anexo II – parte 1). Dessa lista, foram excluídas as proteínas de menor intensidade ou que pudessem ser contaminantes adquiridos durante a preparação do gel. Ao fim dessa seleção foi gerada uma lista de 25 proteínas que foram avaliadas quanto a possíveis funções associadas (Anexo II – parte 2), sendo que nenhuma foi classificada como receptor clássico de membrana ou envolvida direta ou

indiretamente no desenvolvimento do ciclo da *Leishmania* tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado.

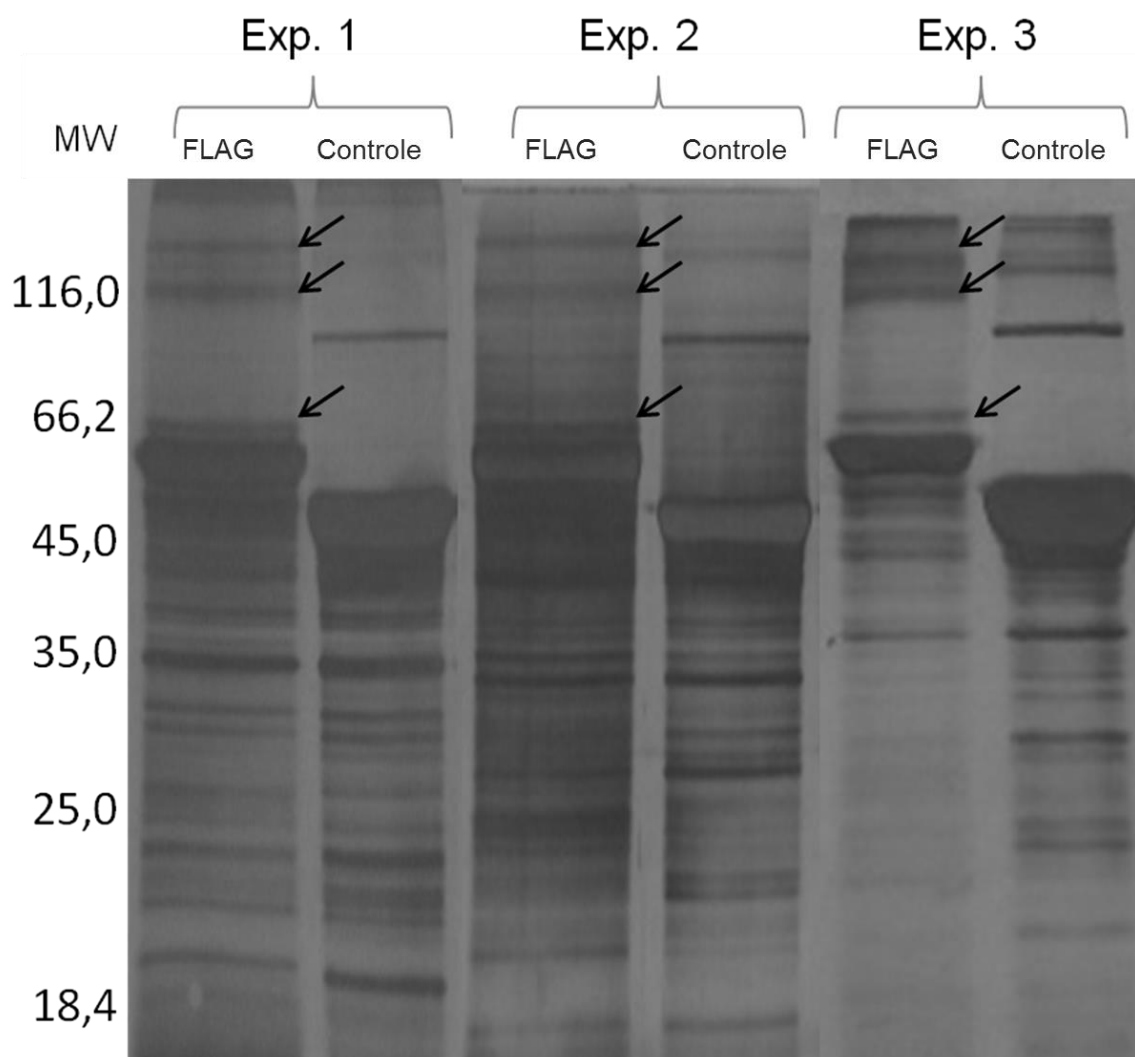


Figura 4.1: Triplicata experimental de “pull down” com extrato protéico total de células embrionárias PP9. Na coluna FLAG de cada experimento, foi utilizada FLAG/MBP acoplada à resina Sepharose; e, na coluna Controle, foi utilizada a proteína de fusão MBP acoplada à resina Sepharose. As setas no grupo FLAG indicam bandas diferentes em relação aos Controles e que são consistentes entre as replicatas.

A partir dessas 25 proteínas, foram selecionadas inicialmente seis (Tabela 4.1) por possuírem funções associadas à membrana, como transporte ou estruturais.

Tabela 4.1: Lista de proteínas selecionadas a partir do sequenciamento do “pull down” com potencial de interação com a proteína flagelar FLAG1/SMP1

Proteína ID (Vector base)	Família proteica	Função associada
Gene 1 >PPATMP000499-PA	ATP-binding cassette subfamily E member 1 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	Proteína de transporte transmembrana; manutenção da homeostase de colesterol e fosfolípídeos de membrana.
Gene 2 >PPATMP001831-PA	Vesicle associated protein, putative [<i>Aedes aegypti</i>]	Proteína associada a formação de vesículas
Gene 3 >PPATMP003116-PA	Fas-associated protein [<i>Aedes aegypti</i>]	É uma proteína de ancoragem para o receptor de <i>fas</i> , além de interagir também com moléculas TNF <i>like</i>
Gene 4 >PPATMP004610-PA	NIPSNAP protein [<i>Drosophila melanogaster</i>]	Proteína de membrana associada ao transporte de vesículas
Gene 5 >PPATMP010744-PA	PDGF- and VEGF- receptor related, isoform M [<i>Drosophila melanogaster</i>]	Receptores de membrana associados com crescimento celular e migração
Gene 6 >PPATMP000248-PA	Sortin Nexin [<i>Aedes aegypti</i>]	Associada a membrana e relacionada com tráfico intracelular e internalização de moléculas por via endossomal

A primeira proteína selecionada (gene 1 – Tabela 4.1) é uma molécula transportadora pertencente à superfamília ABC (“ATP-Binding Cassette”) que utiliza a hidrólise de ATP para movimentar diversos sistemas biológicos. Os sistemas ABC são relativamente conservados quanto à sua estrutura primária, domínios e subunidades protéicas, e já foram detectados em diversos organismos dentro de todos os reinos. São moléculas classicamente conhecidas por serem transportadores transmembrana com duas regiões hidrofóbicas de membrana e dois domínios hidrofílicos (Davidson, Dassa et al. 2008). Em bactérias, esses transportadores tem importância na manutenção da viabilidade, virulência (exportação de fatores de virulência para o meio extracelular) e patogenicidade (Henderson 1994).

O gene 2 (Tabela 4.1), codificante para uma proteína associada a vesícula (VAP), faz parte de um grupo de proteínas ligadas à membrana, conhecido como SNAREs (“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor”). Esse grupo é constituído por proteínas integrais de membrana

especializadas em fusão de membrana e tráfego de vesículas (Sollner, Whiteheart et al. 1993). Sabe-se que essas moléculas podem estar presentes na membrana de vesículas de transporte, assim como na membrana para onde essas vesículas estão direcionadas (Isenmann, Khew-Goodall et al. 1998).

O gene codificante para proteína associada a Fas (gene 3 – Tabela 4.1), pertence a uma superfamília de receptores ligados a TNF (“tumor necrosis fator”) intimamente envolvidos em diversos processos celulares como inflamação, homeostase linfocitária, apoptose e desenvolvimento de tecidos (Bodmer, Schneider et al. 2002). O complexo de proteínas associadas a *fas* podem regular vias de sinalização associadas ou não a apoptose. Sendo que, a via apoptótica é dependente da internalização do complexo de membrana enquanto que a via não-apoptótica independe da internalização dessas proteínas de *fas* (Georgel, Naitza et al. 2001, Schneider-Brachert, Heigl et al. 2013).

O gene 4 (tabela 4.1), codificante para a proteína NIPSNAP, pertence a uma família de genes associada à expressão de componentes de membranas plasmática e vesicular (Nautiyal, Sweatt et al. 2010). Apesar dos poucos estudos acerca do envolvimento desses genes nas diversas atividades biológicas, já foi observado que NIPSNAP 3 e 4 têm envolvimento na promoção da apoptose (Verhagen, Kratina et al. 2007); além disso, a proteína NIPSNAP 4 ao ser inibida em infecção por *Salmonella sp.* promove a desestabilização do tráfego de vesículas em modelo de macrófagos (Lee, Zareei et al. 2002). Em *C. elegans*, a proteína NIPSNAP1 é expressa em um operon que codifica também para proteínas SNAP-25 (associadas a membranas de vesículas), sugerindo que a família NIPSNAP pode ser um novo grupo de moléculas associadas a controle de tráfego de membrana (Seroussi, Pan et al. 1998).

Em mamíferos, estudos realizados com os receptores PDGF e VEGF (gene 5 – Tabela 4.1) mostram que essas moléculas regulam uma série de respostas celulares, dentre elas proliferação, migração celular, fatores para remodelamento dos tecidos de matriz extracelular (Hoch and Soriano 2003). Um estudo com camundongos mostrou que esses receptores tem um papel regulatório importante no intestino desses animais, como a ação na organização dos microvilos e promoção da diferenciação epitelial (Karlsson, Lindahl et al. 2000). Sabe-se também que esse receptor está presente ao longo do intestino de *D. melanogaster*.

A família de proteínas “Sorting Nexin” (SNX) (gene 6 – Tabela 4.1) constitui um grupo de moléculas associadas à membrana e envolvidas com endocitose e

tráfego de biomoléculas. A característica principal dessa família é a presença de um domínio PX que parece ter um papel importante no endereçamento dessas moléculas para regiões ricas em fosfolipídios (Worby and Dixon 2002). Além disso, as SNXs contêm vários motivos de interação proteína-proteína que podem explicar sua capacidade em formar complexos. Um exemplo disso é a proteína SNX1 de mamíferos (Kurten, Eddington et al. 2001).

Os genes codificantes para essas 6 proteínas foram analisados quanto à expressão em carcaça e tubo digestivo de *P. papatasi* alimentados com açúcar (Figura 4.5A) ou 72h após alimentação sanguínea (Figura 4.5B). Intestino e carcaça foram separados para as análises já que é essencial que se saiba o tecido em que o gene em questão é expresso. Tendo em vista que o intestino é o local onde ocorre a interação com a *Leishmania*, genes expressos exclusivamente na carcaça seriam excluídos das análises subsequentes. Esses resultados seriam um primeiro passo para a escolha de alvos mais específicos para experimentos de interação com a proteína FLAG1/SMP1 a serem realizados posteriormente.

No perfil de expressão gênica desses seis genes (Tabela 4.1) em carcaça e tubo digestivo de insetos alimentados com açúcar (Figura 4.5A), vemos um aumento significativo da expressão do gene 4 ("NIPSNAP protein") em carcaça comparada com o tubo digestivo. Os genes 1, 2, 3 e 5 não apresentaram diferença de expressão entre intestino e carcaça, indicando que não seriam genes exclusivos de intestino ou modulados pela dieta.

Posteriormente, foi realizada a quantificação relativa dos mesmos genes 1 a 6 (Tabela 4.1) em insetos 72h após alimentação sanguínea e podemos ver que há uma tendência a maior expressão de todos os genes na carcaça em comparação com tubo digestivo (Figura 4.5B). Essa diferença, entretanto, não é significativa.

Apesar dos genes selecionados serem expressos no intestino de *P. papatasi* e serem potenciais receptores, ainda não sabemos como é sua expressão ao nível proteico ou se estão localizados na membrana das células intestinais.

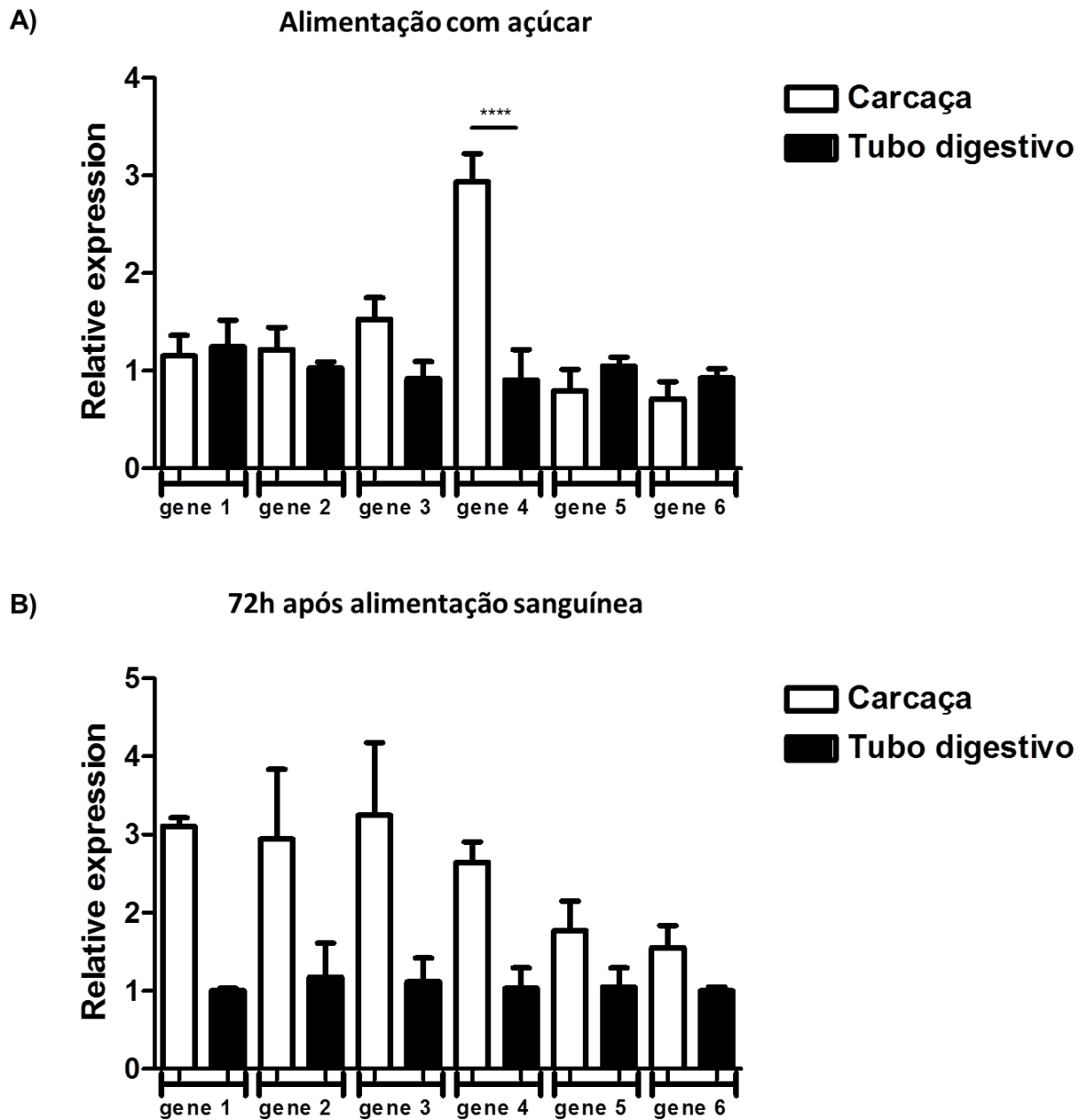


Figura 4.2: PCR quantitativo dos genes 1 (ATP-binding cassette subfamily E member1), 2 (Vesicle associated protein), 3 (Faz-associated protein), 4(NIPSNAP protein), 5 (PDGF- e VEGF-receptor related) e 6 (Sortin nexin) em carça e tubo digestivo de fêmeas de *P. papatasi* alimentados com açúcar (A) e 72h após alimentação sanguínea (B). As barras mostram o erro padrão entre as replicatas biológicas. Para os experimentos acima, foram realizados testes estatísticos One-way ANOVA, com teste de comparação múltipla de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.1.2 – Interação de *Leishmania sp.* com células embrionárias LL5 e PP9:

A busca por modelos de culturas de células para estudo da interação de insetos vetores com patógenos visa a simplificação de um sistema complexo que dificulta muito uma análise mais profunda dos mecanismos celulares envolvidos nessa interação. Nesse sentido, Fampa *et al.* (Fampa, Correa-da-Silva *et al.* 2003) observaram que diferentes espécies de tripanossomatídeos monoxênicos eram capazes de aderir e, em alguns casos, até serem endocitados por linhagens celulares de *A. gambiae* (MOS-55), *A. albopictus* (C6/36) e *L. longipalpis* (LL5).

Além disso, ensaios feitos com outra linhagem de células embrionárias de *L. longipalpis* (LuLo) mostraram que essas células eram capazes de interagir com flagelo e corpo celular de *L. i. chagasi* e *L. amazonenses* por até 72h. Estranhamente, também foram observadas a formação de projeções citoplasmáticas geradas a partir das células LuLo em direção aos parasitas (Cortes, Silva *et al.* 2011). Em outro estudo, essa interação de LuLo com *L. i. chagasi* foi observada por um período mais longo e foi constatado que, à partir do sexto dia de incubação, os parasitas foram internalizados pelas células de insetos havendo formação de amastigotas no interior dos vacúolos (Bello, Mejia *et al.* 2005). Esses dados mostram que, apesar da interação inicial via moléculas de membrana, os mecanismos envolvidos na interação de células embrionárias de flebotomíneos com *Leishmania* são bem diferentes do que ocorre no inseto adulto.

Em vista destes resultados anteriores estudamos a capacidade das células embrionárias LL5 e PP9 de *L. longipalpis* e *P. papatasi* em servir de modelo para estudo da interação. Para isso foram realizados, em paralelo aos experimentos de *pull down*, ensaios de interação dos parasitas *L. i. chagasi* e *L. major* com as células LL5 e PP9. Além disso, para analisar a aplicabilidade desses tipos celulares para simulação de interação *Leishmania*-flebotomíneo, realizamos os mesmo ensaios de interação, mas com adição de proteína recombinante FLAG/MBP para observar uma possível inibição da adesão.

A detecção dos parasitas aderidos às células foi feita através de PCR quantitativo para o gene de Actina de *Leishmania* (Tabela 3.1), utilizando como gene constitutivo RP49 de flebotomíneo (Tabela 3.1).

Primeiramente, foi avaliada a capacidade das células embrionárias LL5 e PP9 de interagir diretamente com *L. major* e *L. i. chagasi* ao longo do tempo (Figura 4.3A

e 4.3B). Como queríamos avaliar apenas adesão e não internalização, utilizamos tempos de incubação curtos de até 12h.

Foi observada uma tendência ao aumento da adesão de *L. i. chagasi* a células LL5 (Figura 4.3A) ao longo das primeiras 6 horas de incubação, seguido por um declínio. A adesão de *L. major* à LL5 manteve-se constante ao longo do tempo, porém numa intensidade bem menor se comparada ao ensaio com *L. i. chagasi*. Em relação às células PP9, *L. major* apresentou um perfil de adesão constante ao longo da incubação (Figura 4.3B). Já *L. i. chagasi* apresentou uma redução significativa na adesão nos horários de 6h e 12h (Figura 4.3B). Esses dados mostram que sim, as células embrionárias LL5 e PP9 tem a capacidade de interagir com diferentes espécies de *Leishmania*. As células PP9 aparentemente não possuem as mesmas características específicas do vetor *P. papatasi* e conseqüentemente interagem com *L. i. chagasi* de forma distinta que o inseto adulto. Isso pode ser explicado pelo fato de que as células embrionárias não são diferenciadas e, portanto seria difícil comparar com um órgão especializado como o tubo digestivo.

Em paralelo foi analisada a capacidade inibitória de concentrações crescentes da proteína recombinante FLAG/MBP na potencial adesão dos parasitas às células. No par *L. i. chagasi* a LL5 (Figura 4.3C) foi observada uma tendência ao aumento de parasitas aderidos na presença de 0,2µg FLAG/MBP somente. No grupo controle, incubado com a proteína de fusão MBP, houve uma tendência à redução da adesão, nas concentrações de 1µg e 5µg. Todas essas análises foram realizadas em relação a um grupo referência (linha pontilhada vermelha) constituído por células LL5 incubadas com *L. i. chagasi* e sem adição de proteína recombinante.

A figura 4.3D mostra, ao contrário do que é observado em *P. papatasi* adulto, que a presença da proteína FLAG/MBP não teve efeito sobre a adesão de *L. major* a células PP9. Um perfil similar foi observado no grupo controle com proteína MBP. O grupo referência (linha pontilhada vermelha) consistiu em células PP9 incubadas com *L. major* e sem adição de proteína recombinante. Esses dados mostram que o modelo de células PP9 não é adequado para o estudo da interação no caso da proteína FLAG1/SMP1. Por serem uma cultura de células embrionárias, provavelmente essas células tem um perfil de expressão mais inespecífico e, portanto não expressam todas as moléculas de superfície presentes em um tecido especializado como o epitélio intestinal do inseto adulto.

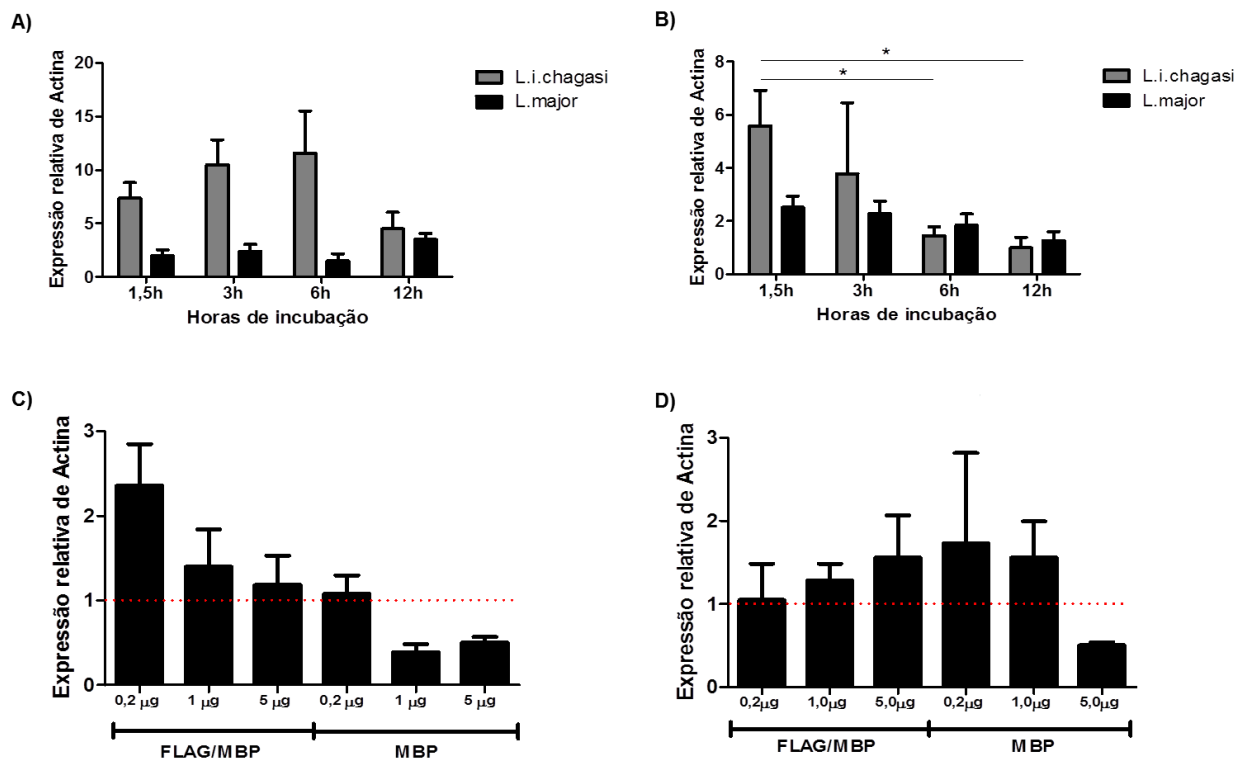


Figura 4.3: Ensaios de adesão entre células embrionárias de flebotomíneos e leishmanias. A e B: dois testes de interação de *L. i. chagasi* e *L. major* com, respectivamente, células LL5 e PP9 ao longo de tempos. C: *L. i. chagasi* foi incubada por 3h com células LL5 e concentrações crescentes (0,2µg, 1µg e 5µg) de proteína recombinante FLAG/MBP e MBP. D: *L. major* foi incubada por 3h com células PP9 e concentrações crescentes (0,2µg, 1µg e 5µg) de proteína recombinante FLAG/MBP e MBP. As barras mostram o erro padrão e a análise estatística realizada foi One-way ANOVA, com o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.1.3 – Microscopia confocal para avaliação de interação de proteína recombinante FLAG1/SMP1 com intestinos dissecados de *P. papatasi*:

Com o intuito de confirmar a capacidade de ligação da proteína FLAG1/SMP1 ao intestino de *P. papatasi*, e tentar identificar as regiões em que essa adesão está ocorrendo com maior afinidade, foram realizados experimentos de interação das proteínas FLAG/MBP e MBP com intestinos dissecados de *P. papatasi* seguido de análise por microscopia confocal.

Foram analisados cinco intestinos tanto para o grupo teste, incubado com proteína recombinante FLAG/MBP (Figura 4.4), quanto para o grupo controle,

incubado com MBP (Figura 4.5). As imagens, com aumento de 40x, focam no intestino médio.

Na figura 4.4 vemos que a marcação para FLAG/MBP está presente ao longo de todo o intestino médio de forma aparentemente uniforme. Entretanto, não é possível concluir se a marcação está presente apenas na superfície das células ou também no interior das mesmas.

As imagens da figura 4.5 mostram uma fluorescência muito fraca ou inexistente para a proteína MBP, demonstrando que a marcação observada na Figura 4.4 pertence, majoritariamente, a adesão direta da porção FLAG da proteína recombinante ao epitélio intestinal.

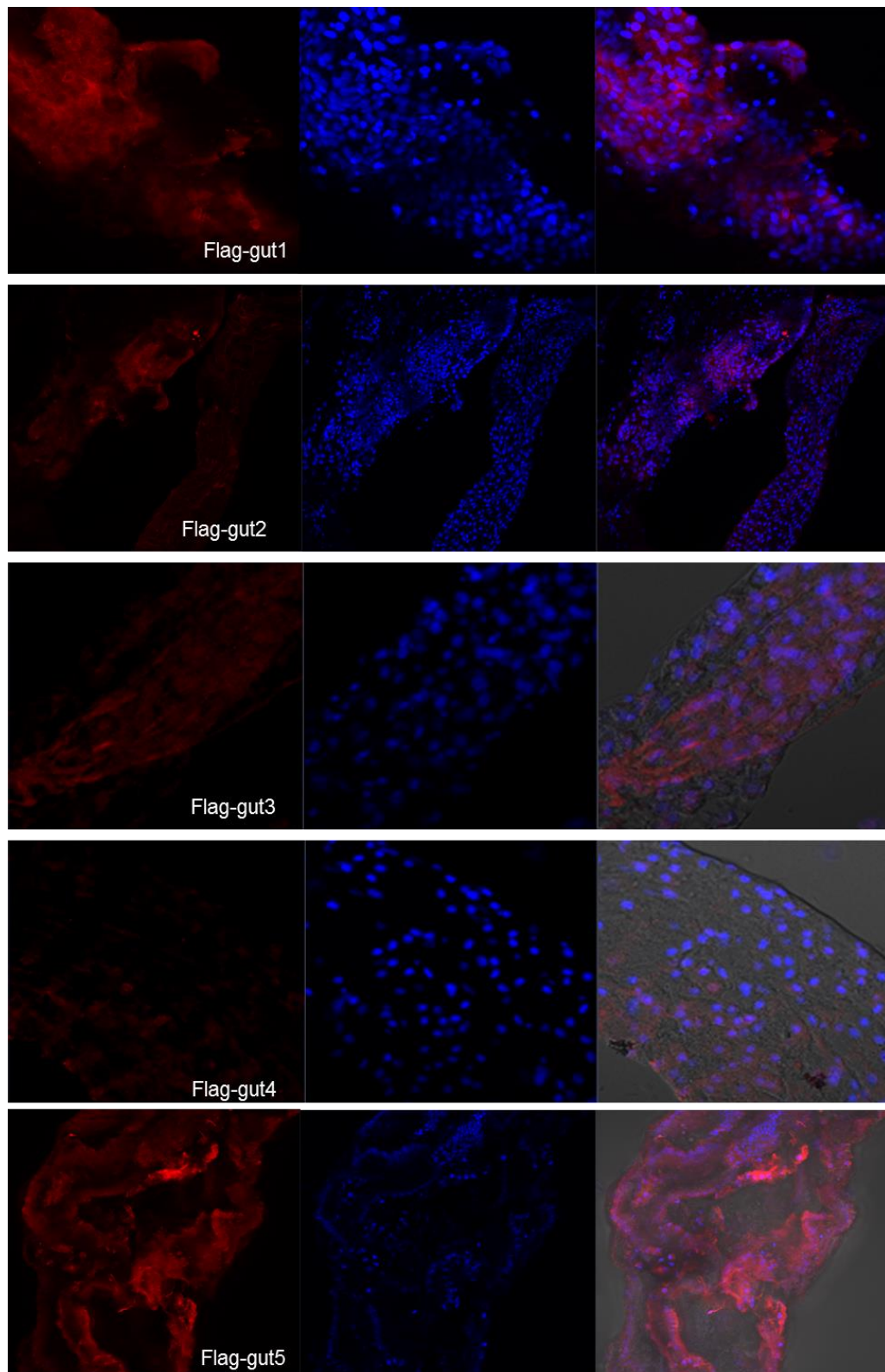


Figura 4.4: Ensaio de microscopia confocal para detecção da proteína recombinante FLAG/MBP potencialmente aderida a intestinos dissecados de *P. papatasi*. A coluna da esquerda mostra a detecção de FLAG/MBP com anticorpo secundário Alexa 594, a coluna central revela coloração do núcleo das células intestinais com DAPI e a coluna da esquerda é a sobreposição das fluorescências. Imagens com aumento de 40X.

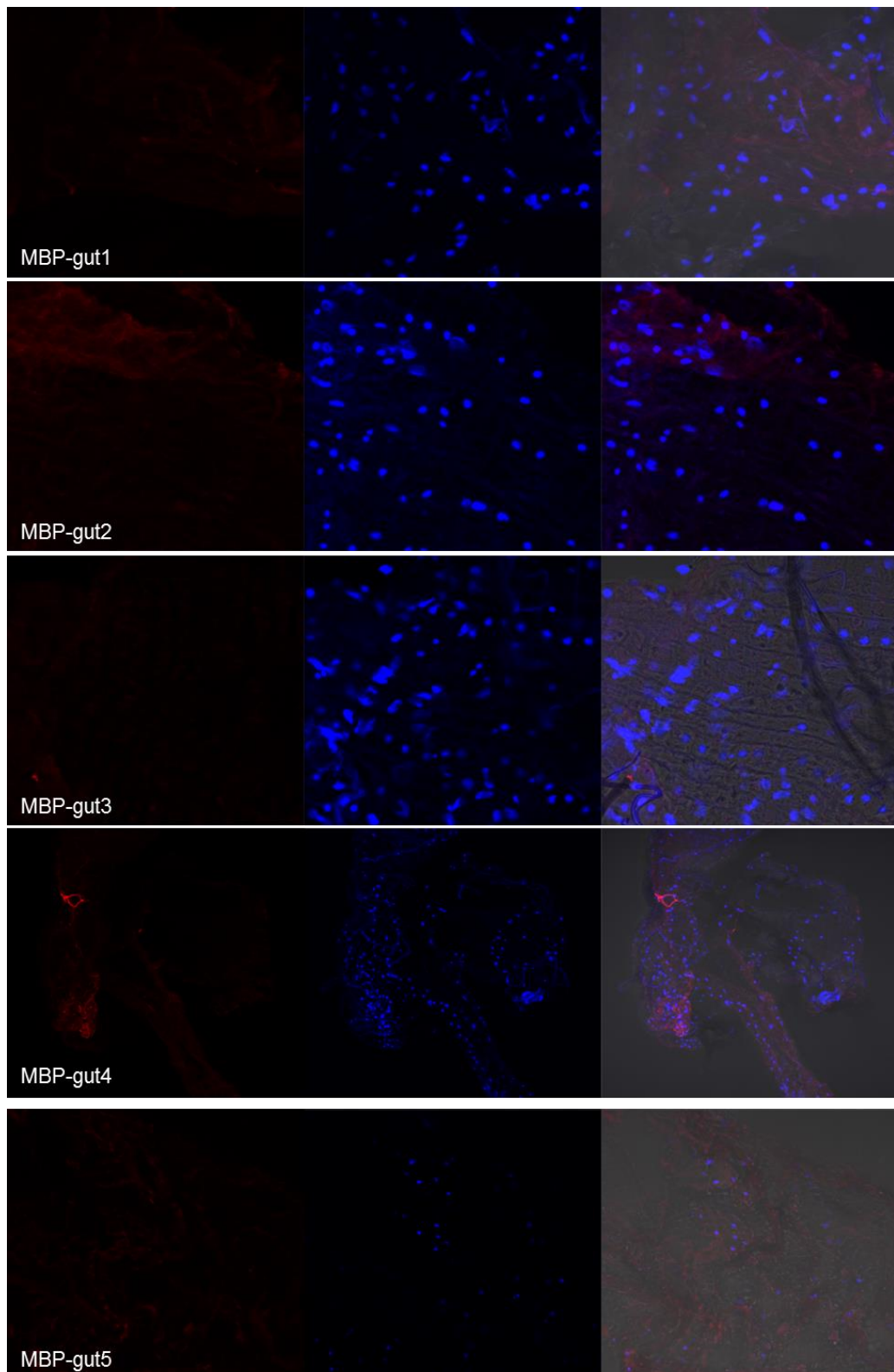


Figura 4.5: Grupo controle do ensaio de microscopia confocal para detecção da proteína recombinante FLAG/MBP potencialmente aderida a intestinos dissecados de *P. papatasi* (Figura 4.4). A coluna da esquerda mostra a marcação da a proteína de fusão MBP (anticorpo secundário Alexa 594), a central mostra coloração do núcleo das células intestinais com DAPI e a coluna da esquerda é a sobreposição das fluorescências. Imagens com aumento de 40X.

4.1.4 – Pull down com extrato de intestino dissecado de *P. papatasi*:

Durante doutorado sanduíche no laboratório do Prof. Marcelo Ramalho Ortigão na Universidade Estadual do Kansas – EUA, tive acesso a uma colônia de *P. papatasi*, o que me permitiu a realização de ensaios de interação proteína-proteína utilizando fêmeas adultas. Os ensaios de *pull down* foram efetuados utilizando extrato protéico de intestinos de *P. papatasi* dissecados 72h após alimentação sanguínea com o objetivo de identificar de forma precisa possíveis ligantes de FLAG1/SMP1.

Utilizando esses extratos de intestinos de *P. papatasi* foram realizados dois experimentos de *pull down*. Nos géis de SDS-PAGE de ambos os ensaios foi observada a presença de 3 a 4 regiões (Figura 4.6) que apareceram exclusivamente no *pull down* com a resina FLAG/MBP. A primeira região, de baixo peso molecular, aparece em torno dos 15 kDa, a segunda região, em torno dos 55 kDa, a terceira nos 75 kDa e a quarta a 130 kDa (Figura 4.6 - Exp. 2).

As colunas inteiras, tanto do grupo FLAG quanto do Controle, em ambos os géis, foram cortadas e enviadas para sequenciamento. As proteínas do Exp.1 (Figura 4.6) foram processadas e sequenciadas pela plataforma “Biotechnology/proteomics Core Lab” (Kansas State University) e as proteínas do Exp.2 (Figura 4.6) foram enviadas para a plataforma de espectrometria de massa PDTIS/FIOCRUZ-PR (Fiocruz-Curitiba).

O sequenciamento do Exp.1 (Figura 4.6) gerou uma lista de 33 proteínas (Anexo III), que foram, posteriormente, identificadas e avaliadas quanto a possíveis funções associadas. Uma análise inicial constatou que cerca de 40% dessas proteínas estão classificadas como proteínas de membrana.

A partir dessa lista de 13 proteínas associadas à membrana, a proteína ligante de Hyaluronan ou Ácido Hialurônico chamou a atenção. Recentemente, Sinnis *et al.* identificaram no vetor *A. stephensi* uma molécula pertencente ao grupo dos Glicosaminoglicanos (GAGs), o mesmo do Ácido Hialurônico, que apresenta um possível papel no ciclo infectivo do *Plasmodium* (Sinnis, Coppi et al. 2007).

Os GAGs são os heteropolissacarídeos mais abundantes em mamíferos e estão geralmente localizados na superfície de células ou na matriz extracelular. São polissacarídeos de cadeia longa com unidades dissacarídicas repetidas. Essas unidades são compostas por uma molécula de N-acetilgalactosamina ou N-acetilglicosamina e uma molécula de ácido urônico (King 2016).

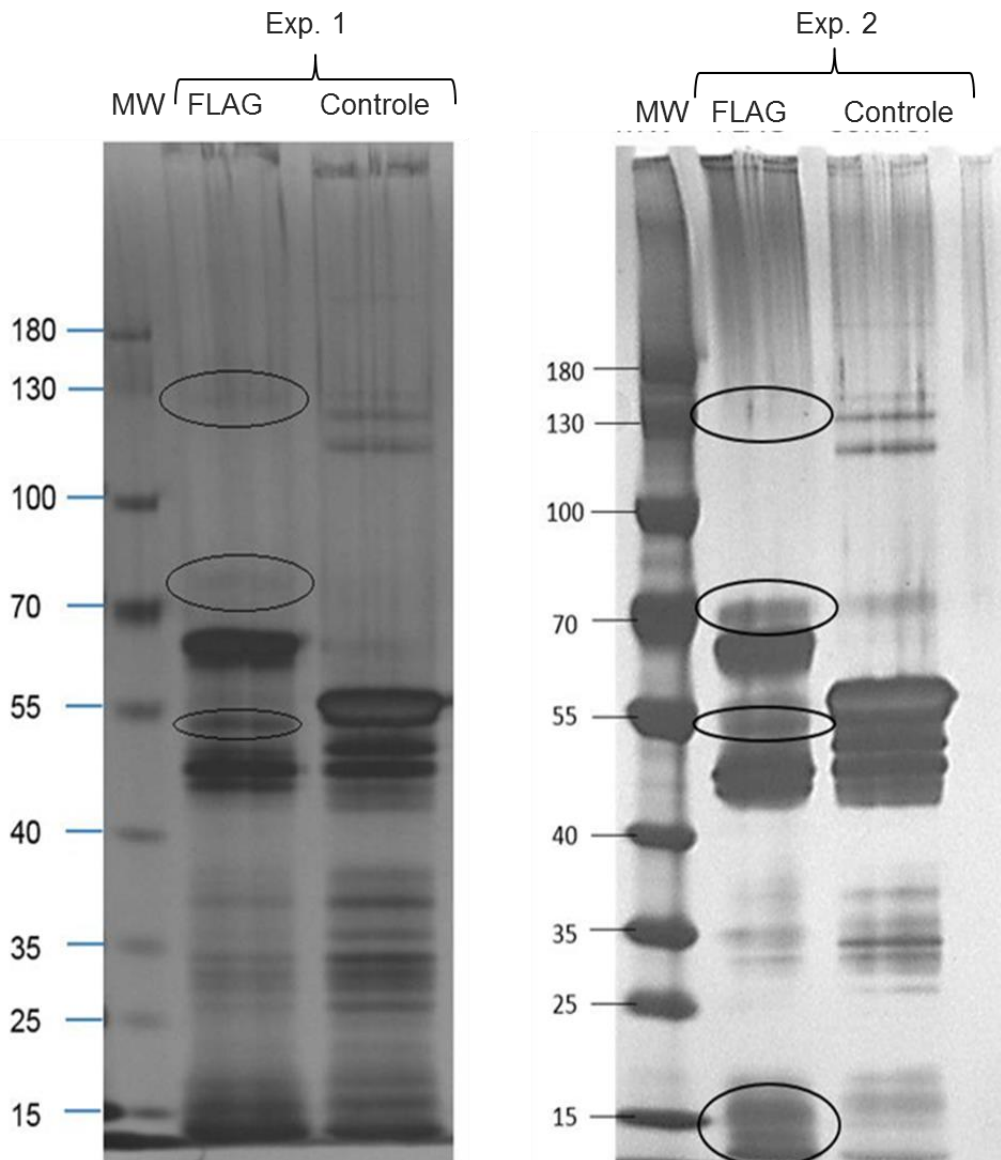


Figura 4.6: Duplicata de ensaio de “pull down” com extrato total de tubos digestivos dissecados de *P. papatasi*. No grupo FLAG, o extrato foi incubado com resina contendo a proteína recombinante FLAG/MBP e no grupo Controle, com resina contendo proteína de fusão MBP. Os círculos representam bandas de proteínas presentes exclusivamente no grupo FLAG.

Os GAGs podem ser distribuídos em quatro classes de acordo com a composição das unidades dissacarídicas: condroitina, ácido hialurônico, heparan sulfato e sulfato de queratina. Em todas essas moléculas, com exceção do ácido hialurônico, há a adição de grupos sulfato em múltiplas posições (Zaia 2009). Um estudo recente com o vetor *A. stephensi* mostrou, pela primeira vez, a presença de GAGs como heparan sulfato em mosquitos. Nesses ensaios, heparan sulfato

purificado do mosquito é capaz de se ligar à proteína de superfície apolipoproteína E do esporozoíto, sugerindo um possível papel de GAGs no processo infectivo do *Plasmodium* no vetor (Sinnis, Coppi et al. 2007).

O hyaluronan ou ácido hialurônico está presente em diversos organismos, desde bactérias até eucariotos complexos. É uma molécula envolvida em diferentes processos biológicos como regulação da resposta imune e composição da matriz extracelular. Por sua vez, as proteínas ligantes de ácido hialurônico geralmente são expressas na superfície das células e podem apresentar os mais variados perfis protéicos. Dentre as proteínas ligantes mais comuns estão receptores Toll-like, CD44, RHAMM, TNFIP6, brevican, SHAP, LYVE1, entre outros (Jiang, Liang et al. 2011).

O gene codificante para a proteína ligante de Hyaluronan foi então selecionado para análise de expressão gênica em carcaça e tubo digestivo de fêmeas de *P. papatasi*. Nos ensaios com PCR quantitativo constatamos uma tendência à maior expressão do gene no intestino em relação à carcaça de fêmeas não alimentadas de *P. papatasi*. Entretanto, esse perfil é invertido 24h após a alimentação sanguínea, havendo uma redução significativa da expressão do gene em tubo digestivo (Figura 4.7). Será muito importante observar o perfil de expressão no horário-chave de 72h após a alimentação sanguínea, quando a digestão já estiver finalizada, para observar se o gene está sendo expresso no intestino no momento do contato da *Leishmania* com o epitélio.

Além disso, a análise dos dados de sequenciamento do Exp.2 de *pull down* poderá confirmar os resultados obtidos no primeiro experimento além de detectar algum outro possível alvo de interesse.

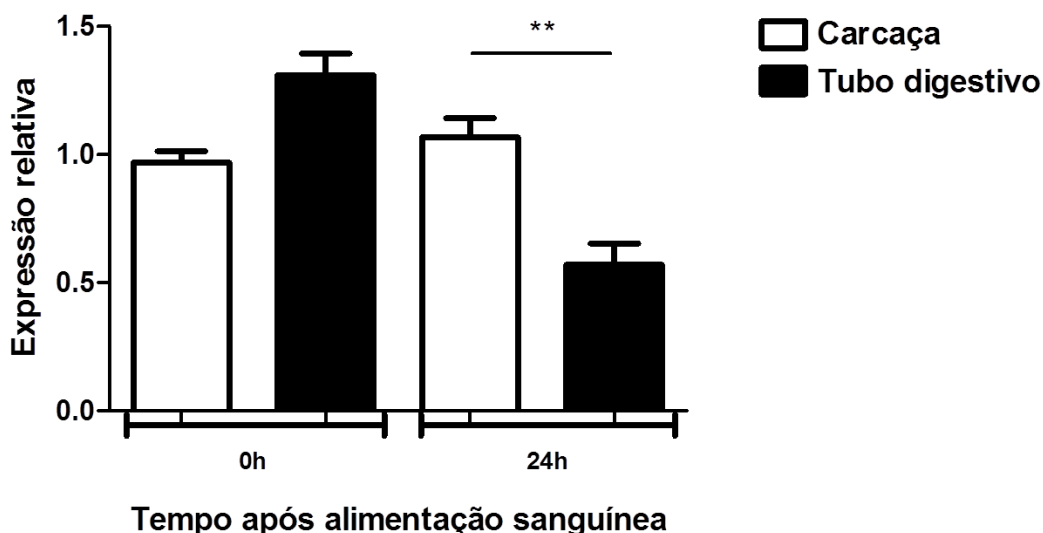


Figura 4.7: PCR quantitativo para o gene de proteína ligante de Hyaluronan em carcaça e tubo digestivo de fêmeas de *P. papatasi* alimentadas com açúcar (0h) e 24h após alimentação sanguínea. As barras mostram erro padrão e o teste estatístico realizado foi One-way ANOVA, com teste de comparação múltipla de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.2 - Capítulo 2 – TGF- β

TGF- β , muito estudada em modelos de vertebrados, é uma citocina essencial nos processos de sinalização celular e na regulação da resposta imune. Entretanto em insetos vetores, até o início século XXI, nada se sabia sobre o efeito desta citocina na resposta imune frente à infecção por um patógeno. Em 2001, Crampton A. *et al* identificaram um gene de *A. stephensi* homólogo a TGF- β cuja expressão era modulada pela infecção por *Plasmodium berghei* (Crampton and Luckhart 2001b).

Em nosso laboratório estudamos a resposta imune de flebotomíneos frente à infecção por *Leishmania* e outros patógenos. Análises de biblioteca de ESTs de fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *L. i. chagasi* revelaram um aumento significativo de transcritos relativos a estresse/defesa/oxidação em comparação ao perfil transcricional de insetos alimentados apenas com sangue. Esses dados revelam uma provável ativação da imunidade frente à presença de *Leishmania* (Pitaluga, Beteille et al. 2009). Além disso, ensaios de DDRT-PCR comparando fêmeas infectadas com *L. i. chagasi* e não infectadas, nos permitiu identificar uma série de genes diferencialmente expressos com a infecção e relacionados com a

resposta imune. Dentre eles estão homólogos a MAP-quinase, Cactus, Defensina 2 e TGF- β (Ramalho-Ortigao, Temporal et al. 2001).

Após a identificação da molécula de TGF- β de *L. longipalpis* (LITGF- β) (Ramalho-Ortigao, Temporal et al. 2001), estudamos a modulação desta citocina-*like* frente a desafios. Nesse sentido, ensaios de Western Blot com células LL5 desafiadas contra diversos patógenos mostraram um aumento da expressão de TGF- β com o desafio (Marques 2005).

Posteriormente foram realizados ensaios de expressão gênica, nos quais foi observada uma expressão constitutiva do gene de LITGF- β em fases imaturas e em adultos, machos e fêmeas, alimentados com açúcar. Frente à infecção por *L. i. chagasi*, foi constatado um aumento significativo da expressão de LITGF- β após 72h, confirmando a suspeita de que essa citocina-*like* é regulada frente à infecção (dados não publicados).

4.2.1 – Possível regulação de LITGF- β pela via Toll:

Em mamíferos, muitos trabalhos vêm mostrando a correlação entre receptores da via Toll e a regulação da expressão de TGF- β . Em fibroblastos isolados, foi observado que TLR9 promove a ativação de respostas de fibrose mediadas via TGF- β endógeno (Fang, Goncalves Marangoni et al. 2016). Wu J. et al. observaram que a infecção de fibroblastos por *S. aureus* induz a expressão de TGF- β através da ativação das TLRs 2 e 4 e das vias AP-1 e NF- κ B (Wu, Ding et al. 2016).

Tendo em vista a possível correlação entre LITGF- β e a via de imunidade Toll, investigamos a expressão do gene LITGF- β em fêmeas de *L. longipalpis* silenciadas para cactus, um repressor da via Toll. Forrest D., observou um silenciamento do gene cactus de aproximadamente 40%, 24h após a injeção chegando a 50% após 48h.

Apesar do silenciamento de cactus não ser muito expressivo, foi possível observar um aumento significativo da expressão de LITGF- β em todos os horários, sendo que os maiores níveis foram detectados em 24h e 72h após a microinjeção (Figura 4.8). O perfil de aumento da expressão de LITGF- β coincide com a ativação da via Toll promovida pelo silenciamento de cactus (Figura 4.8). Esses resultados demonstram que LITGF- β é regulada, pelo menos em parte, pela via Toll.

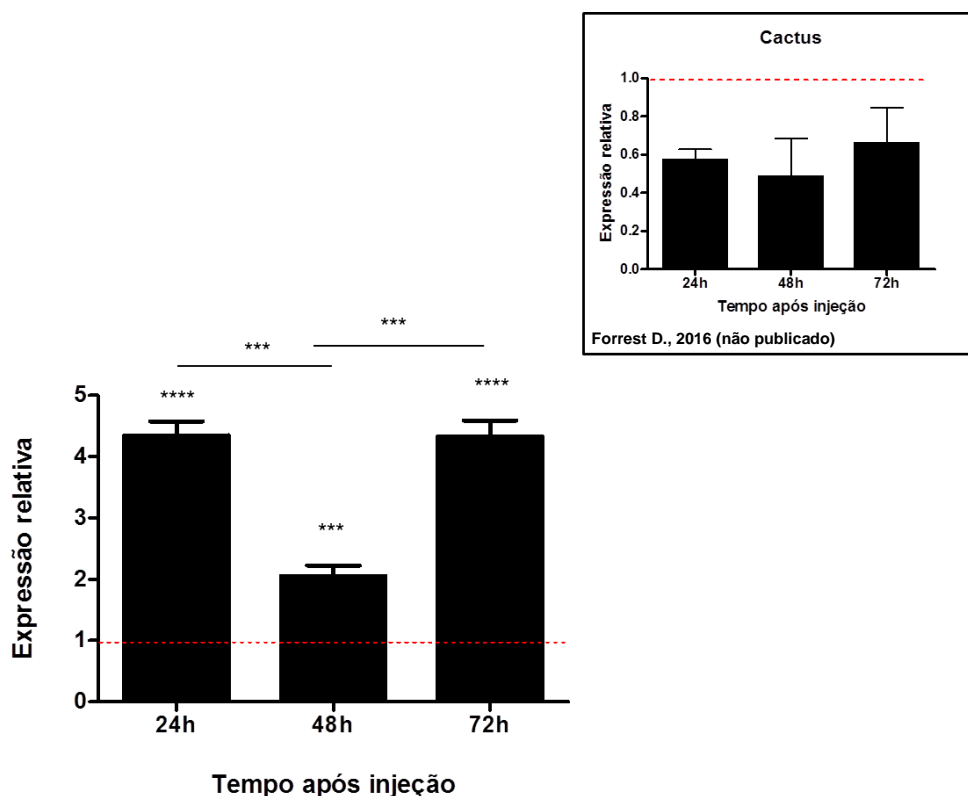


Figura 4.8: PCR quantitativo para análise de expressão do gene LITGF- β em fêmeas silenciadas para Cactus. A quantificação foi feita utilizando o cálculo de $\Delta\Delta Ct$. As barras mostram o desvio padrão entre replicatas técnicas. Foram realizados testes estatísticos One-way ANOVA, com o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. $P < 0,05$. No canto superior direito, vê-se o PCR quantitativo para cactus em insetos injetados com dsCactus, realizado por Forrest D., 2016 (não publicado).

4.2.2 – Silenciamento do gene LITGF- β em *L. longipalpis* e análise de expressão de moléculas possivelmente relacionadas com a via de TGF- β :

Com o objetivo de observar o efeito do silenciamento de LITGF- β sobre a resposta imune de fêmeas de *L. longipalpis*, foi realizada a microinjeção de dsLITGF- β e, como controle, foi usada dupla-fita de RNA para o gene não relacionado da β -Galactosidase (ds β Gal).

Foi observada uma redução de cerca de 70% na expressão de LITGF- β , quando comparado ao controle, nos tempos de 24h e 48h; chegando a 80% de silenciamento em 72h após a injeção. Em 96h e 120h, vemos o início da

recuperação da expressão padrão do gene, com taxa de silenciamento de, respectivamente, 50% e 40% (Figura 4.9).

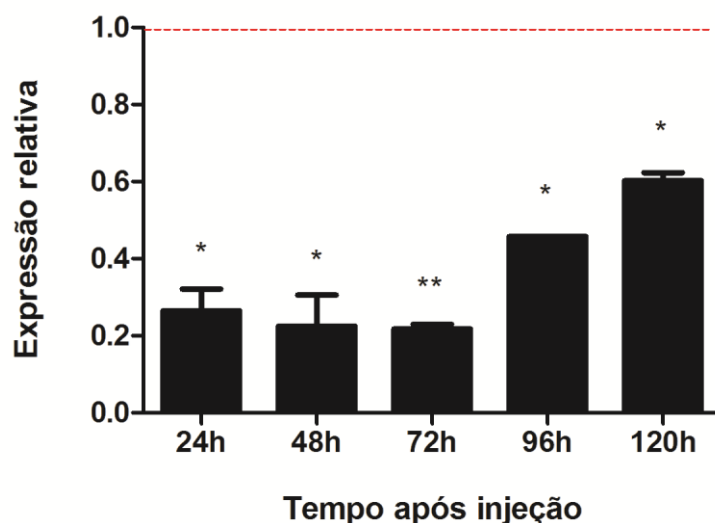


Figura 4.9: PCR quantitativo para análise de expressão do gene de LITGF- β em insetos injetados com dsTGF- β em relação ao controle, injetado com ds β Gal (linha pontilhada vermelha). O cálculo utilizado para a quantificação foi o de $\Delta\Delta$ Ct e a análise estatística foi feita com Teste t e pós-teste não paramétrico de Mann Whitney, com $P < 0,05$. As barras mostram o erro padrão.

Constatado o silenciamento de LITGF- β , foi avaliado o perfil de expressão de moléculas efetoras da resposta imune potencialmente reguladas por essa citocina-like. Como observado na figura 4.8, a via Toll parece ter um efeito regulatório sobre o gene de LITGF- β . Além disso, sabe-se que em modelo de células embrionárias LL5 de *L. longipalpis*, o silenciamento de cactus gera um aumento da expressão dos PAMs defensina 2 e cecropina (Tinoco-Nunes, Telleria et al. 2016). Com base nesses dados, foram selecionados para análise de expressão em insetos silenciados para LITGF- β os genes Cecropina (Figura 4.10B) e Defensina 2 (Figura 4.10C). Outro gene avaliado foi iNOS (Figura 4.10A), já que em modelos de vertebrados, como cultura de macrófagos e camundongos, TGF- β é uma das principais moléculas responsáveis pela regulação da produção de óxido nítrico (Aleman-Muench and Soldevila 2012).

Em insetos silenciados para LITGF- β , não foi possível observar modulação da expressão em nenhum dos horários analisados para o gene iNOS (Figura 4.10A) e defensina 2 (Figura 4.10C). Entretanto, quando se analisou a expressão de

cecropina observamos o aumento progressivo até 72h após a injeção (Figura 4.10B).

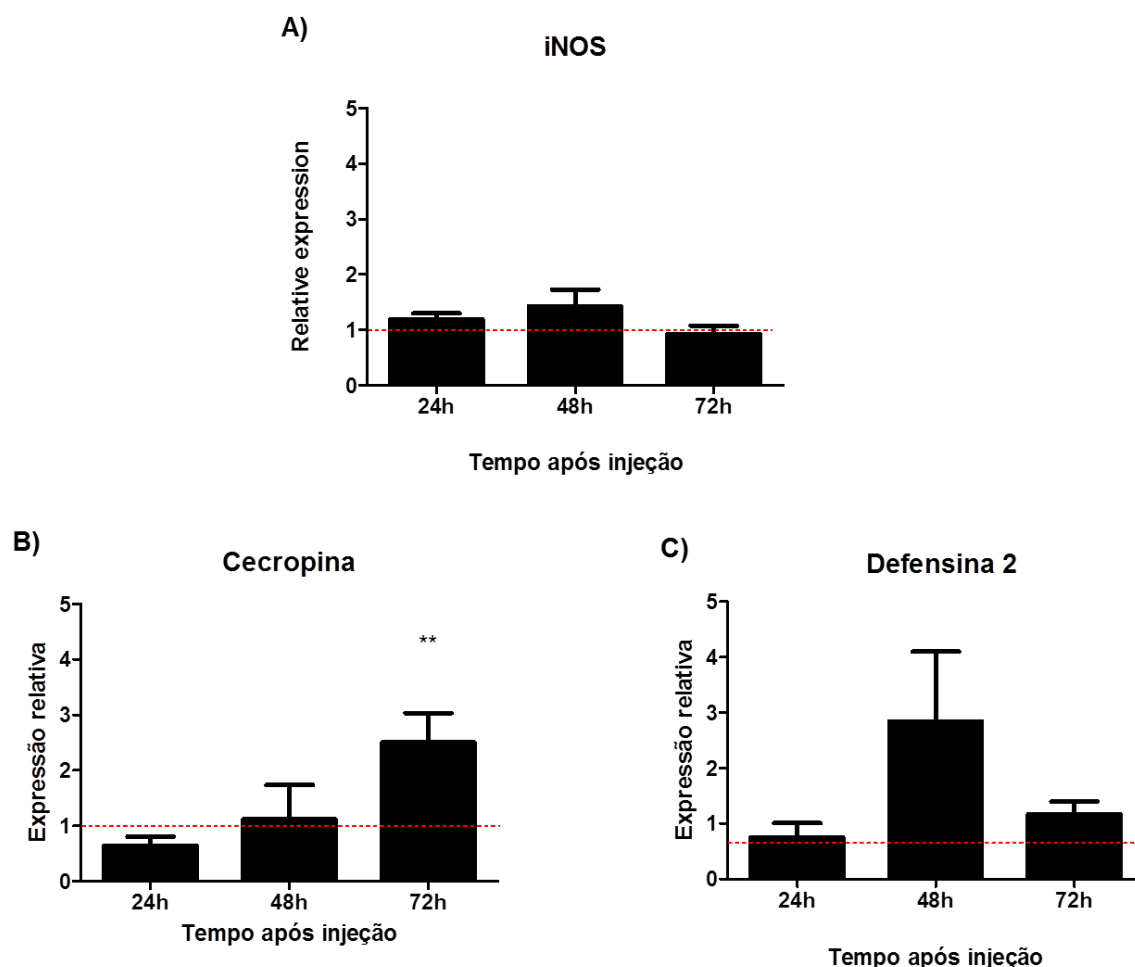


Figura 4.10: PCR quantitativo para análise de expressão de genes ligados a resposta imune em fêmeas silenciadas para TGF- β em relação às injetadas para β Gal. A expressão relativa dos genes iNOS, Cecropina e Defensina 2, nos tempos de 24h, 48h e 72h aparecem, respectivamente, nos gráficos A, B e C. As barras mostram o erro padrão. Foram realizadas análises estatísticas por Teste t e pós-teste não paramétrico de Mann Whitney, com $P < 0,05$.

Esses resultados indicam que a redução de LITGF- β pelo silenciamento, ativa levemente a resposta imune com aumento de cecropina, mas não de defensina 2 nem iNOS. Muitos trabalhos vêm demonstrando que a ação diferenciada de TGF- β dependendo da situação imunológica em que se encontra o modelo que está sendo analisado (Aleman-Muench and Soldevila 2012). Luckhart S. *et al.* demonstraram que cultura de células de *A. stephensi* após incubação com TGF- β tiveram um certo aumento da expressão de iNOS, entretanto com adição de TGF- β e desafio com a

bactéria *E. coli* esse aumento foi muito mais expressivo (Luckhart, Crampton et al. 2003).

4.2.3 – Infecção por *L. i. chagasi* em insetos silenciados para LITGF- β e observação do efeito em genes possivelmente relacionados com essa via:

Tendo sido visto o efeito de LITGF- β em diferentes moléculas das vias de imunidade em insetos silenciados, foram analisadas as consequências desse silenciamento em fêmeas infectadas por *L. i. chagasi*.

Na figura 4.11, foi visto que a presença do parasita não tem efeito sobre o silenciamento que se mantém em torno de 70% em 24h e 72h, e 50-55% em 48h após a infecção.

Com o silenciamento observado na figura 4.11, foi analisada a expressão dos efetores da via de LITGF- β : iNOS (Figura 4.12A), Cecropina (Figura 4.12B) e Defensina 2 (Figura 4.12C). Em seguida, foi observada também a taxa de infecção ao longo do tempo (Figura 13).

O silenciamento de insetos infectados promoveu um aumento de quase 3 vezes na expressão de iNOS nos tempos de 24h e 48h após infecção (Figura 4.12A). A expressão de cecropina também sofre modulação positiva com uma tendência em 48h e um aumento significativo 72h após a infecção (Figura 12B). A expressão do gene de defensina, que em insetos apenas silenciados não é modulada, nos insetos silenciados e infectados sofre um aumento significativo 48h após a infecção (Figura 12C).

Com relação a taxa de infecção, foi observado um efeito forte do silenciamento sobre a sobrevivência dos parasitas, demonstrado pelo aumento inicial da expressão de *actina* de *Leishmania sp.* 24h após a infecção, seguido por uma forte queda em 48h que se intensifica 72h após a infecção (Figura 4.13). Essa redução drástica de *L. i. chagasi* pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo aumento considerável da expressão dos PAMs defensina e cecropina além de iNOS nos primeiros dias de infecção.

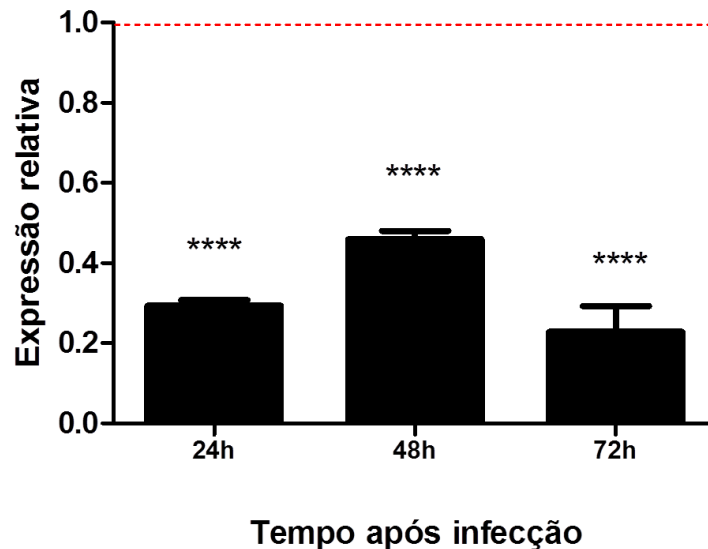


Figura 4.11: PCR quantitativo para confirmação do silenciamento em fêmeas injetadas com dsLITGF- β e infectadas com *L. i. chagasi*. Os cálculos de $\Delta\Delta Ct$ foram feitos em relação ao controle de fêmeas injetadas para ds βGal e infectadas. Para análise estatística, realizou-se Teste t e pós-teste não paramétrico de Mann Whitney, com $P < 0,05$. As barras mostram o desvio padrão.

Comparando-se os ensaios de silenciamento e silenciamento mais infecção, podemos observar que iNOS em insetos apenas silenciados não é modulado (Figura 4.10A), mas com a infecção tem sua expressão aumentada em quase 3 vezes em 24h e 48h (Figura 4.12A). Os genes de cecropina e defensina 2 que tem um aumento de 3 vezes com o silenciamento (Figuras 4.10B e C), na presença de *L. i. chagasi* esse aumento chega a 10 vezes para cecropina (Figura 4.12B) e até 8 vezes para defensina 2 (Figura 4.12C). Podemos concluir então que a molécula LITGF- β possui um papel de regulador negativo dos efetores imunes analisados, tendo em vista que o silenciamento em flebotomíneos infectados com *L. i. chagasi* promove uma ativação ainda maior da expressão desses genes.

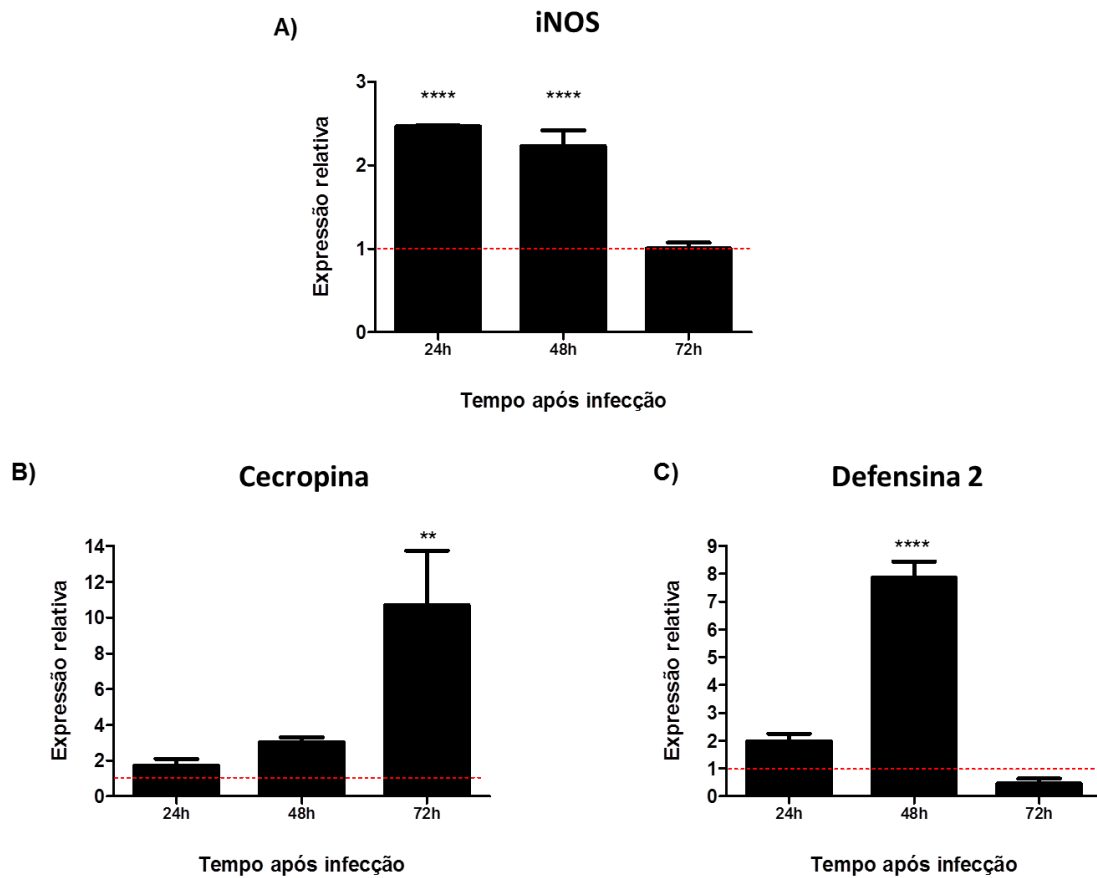


Figura 4.12: Análise por PCR quantitativo da expressão dos genes iNOS (A), Cecropina (B) e Defensina (C) nos tempos de 24h, 48h e 72h após infecção de fêmeas injetadas com dsLITGF- β ou ds β Gal. Para a análise estatística, foi realizado Teste t e pós-teste não paramétrico de Mann Whitney, com $P < 0,05$. As barras mostram o desvio padrão entre as replicatas técnicas.

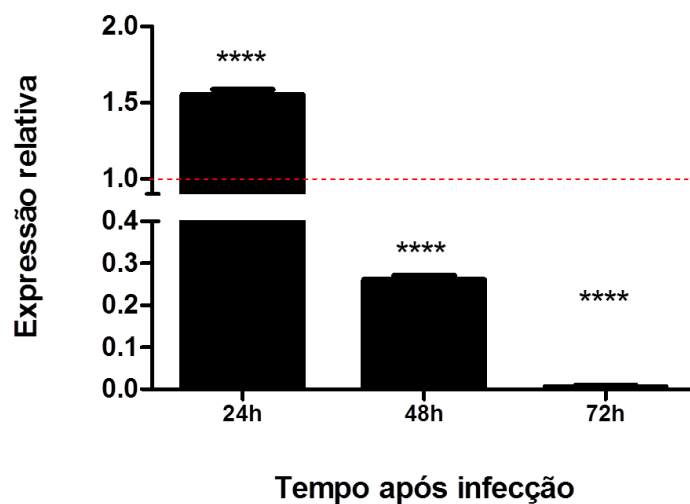


Figura 4.13: PCR quantitativo para análise da taxa de infecção com expressão relativa do gene de Actina de *Leishmania* em insetos silenciados. Os cálculos de $\Delta\Delta$ Ct foram feitos em relação ao controle de fêmeas injetadas para ds β Gal e infectadas. No gráfico, realizou-se

Teste t e pós-teste de Mann Whitney, com $P < 0,05$. As barras mostram o desvio padrão entre as replicatas técnicas.

4.2.4 – Análise da taxa de infecção em *L. longipalpis* alimentados com *L. i. chagasi* e anticorpo policlonal anti- LITGF- β :

Experimentos com fêmeas de *L. longipalpis*, previamente realizados pelo nosso grupo mostraram um aumento da expressão de LITGF- β 72h após a infecção por *L. i. chagasi*. Como base nesses dados, analisamos mais a fundo o possível papel dessa molécula na infecção por *Leishmania*.

Para corroborar os dados obtidos nos experimentos de silenciamento, foram realizados ensaios de infecção na presença de anticorpo policlonal anti- LITGF- β para observar o efeito desse anticorpo na sobrevivência dos parasitos ao longo da infecção. Para isso, foi feita contagem individual de parasitas presentes em cada fêmea de *L. longipalpis* nos grupos com e sem anticorpo.

Foi observado um aumento não significativo de parasitas no grupo alimentado com anticorpo nos horários de 24h, 48h e 72h após a infecção. No tempo de 96h, esse aumento na infecção persiste e é significativo quando comparado com o grupo controle, sem anticorpo (Figura 4.14).

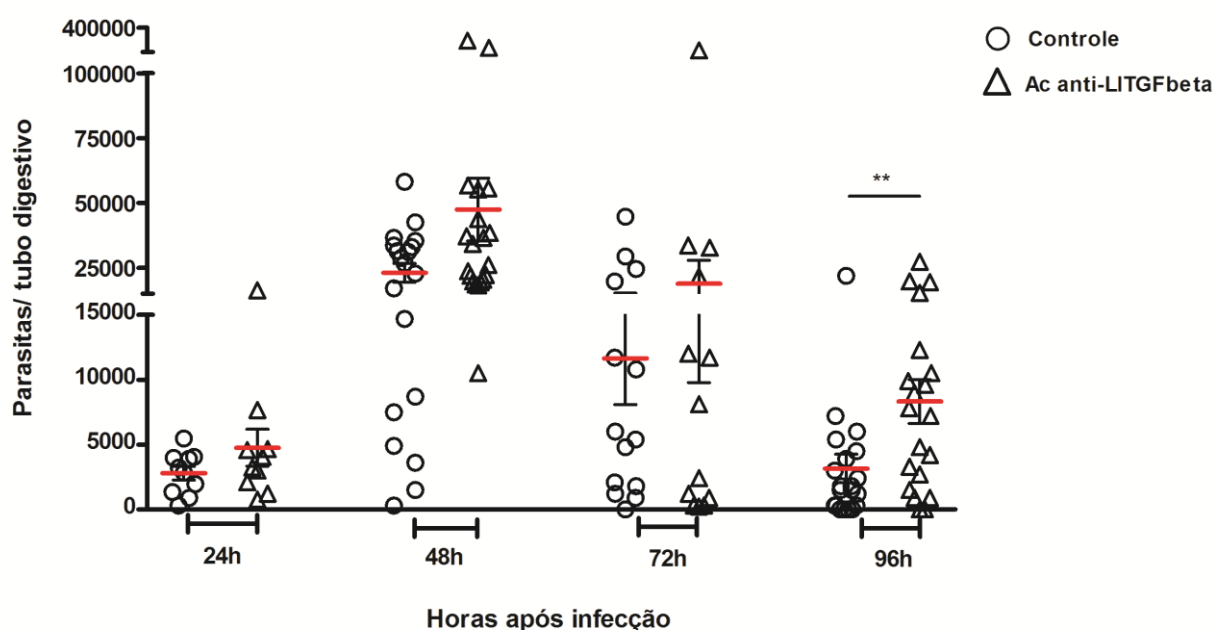


Figura 4.14: Alimentação artificial de fêmeas de *L. longipalpis* com sangue contendo *L. i. chagasi* e anticorpo anti-TGF- β (triângulos) ou soro pré-imune (círculos). Cada triângulo ou

círculo representa um indivíduo analisado. Para comparação entre os dois grupos dentro de cada horário, foi realizado teste t com pós-teste de Wilcoxon, $P < 0,05$. As barras mostram o erro padrão entre as replicatas biológicas.

Contraditoriamente, ao bloquearmos LITGF- β com o anticorpo observamos o aumento da infecção, um resultado oposto ao encontrado com o silenciamento do gene. Buscando possíveis explicações para os dados encontrados averiguamos que no modelo *A. stephensi*, moléculas de TGF- β de origens distintas tem efeitos complementares sobre o ciclo infectivo do *Plasmodium*. Inicialmente, a ativação de TGF- β humana (hTGF- β) presente no sangue promoveria uma regulação negativa dose-dependente da expressão de iNOS (Luckhart, Crampton et al. 2003). Concomitantemente, em horários de maior motilidade e reprodução do parasita, foi visto um aumento da expressão do gene As60A, homólogo a TGF- β , do próprio inseto, coincidindo com um aumento de iNOS (Crampton and Luckhart 2001b).

Esses dados no modelo anofelino levantaram a possibilidade do anticorpo utilizado no experimento da figura 4.14 estar bloqueando moléculas de TGF- β de mamífero contidas no sangue usado na alimentação.

Para testar a capacidade do nosso anticorpo em reconhecer TGF- β do sangue realizamos experimentos de Western Blot com fêmeas de *L. longipalpis* 0h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h após alimentação sanguínea. Além disso, utilizamos também apenas o sangue (Figura 4.15).



Adaptado de Macedo-Couto R. & Di-Blasi T.

Figura 4.15: Western Blot para detecção de TGF- β em fêmeas 0h (não alimentada), 2h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h após alimentação com sangue de hamster e 5 μ l de sangue de coelho e hamster. Como controle positivo, foi utilizada proteína recombinante His-LITGF- β (RP).

O western blot confirmou o reconhecimento do TGF- β presente no sangue de mamífero pelo anticorpo utilizado nos experimentos. Portanto acreditamos que o

bloqueio da TGF- β do sangue e não do inseto é o que está desencadeando uma resposta diferente da observada no silenciamento.

No contexto das infecções parasitárias em vertebrados, a citocina TGF- β_1 têm sido responsável tanto por regular respostas iniciais pró-inflamatórias para combater parasitas, quanto respostas tardias anti-inflamatórias para controle da resposta (Vodovotz, Zamora et al. 2004). Os estudos recentes feitos com linhagens celulares de *A. stephensi* e *A. gambiae* concluíram que baixas doses de TGF- β_1 reduzem a infecção pelo *P. falciparum* através da indução de NOS (óxido nítrico sintase). Entretanto, doses mais altas da citocina podem estar tendo um efeito contrário, reduzindo NOS. Essa regulação estaria ocorrendo via sinalização por MEK/ERK (Surachetpong, Singh et al. 2009).

Com isso, a hipótese gerada pelos dados obtidos até o momento é de que a TGF- β proveniente do sangue pode ter um efeito inicial de ativação da resposta imune com produção de moléculas efetoras. Ao ser bloqueada pelo anticorpo, não há ativação precoce da resposta imune e, conseqüentemente, vemos um aumento da infecção.

Mais tardiamente no ciclo infectivo, em torno do 3º ou 4º dia de infecção, o contato da *Leishmania* com o epitélio intestinal pode estar gerando uma ativação do gene LITGF- β e uma regulação negativa desses efetores imunes. Nos ensaios em que silenciámos especificamente a molécula pertencente ao inseto vemos uma ativação da resposta imune e, em insetos infectados, uma redução efetiva dos parasitas.

V – CONCLUSÃO

5.1 - Capítulo 1 – FLAG1/SMP1

Com os resultados obtidos dos experimentos de *pull down* com células embrionárias PP9 determinamos que existem moléculas relacionadas com a membrana celular que potencialmente podem interagir com FLAG1/SMP1. Entretanto, os experimentos de interação entre duas espécies de *Leishmania* e linhagens de células embrionárias mostraram que apesar de haver uma adesão, a molécula de FLAG1/SMP1 não está envolvida. Com isso, concluímos que as células PP9 e o epitélio intestinal de fêmeas adultas de *P. papatasi* são capazes de interagir com *L. major*, entretanto por mecanismos distintos.

Dos ensaios de *pull down* com extratos de intestinos dissecados de *P. papatasi* concluímos que a proteína ligante de ácido hialurônico representa um potencial ligante de FLAG1/SMP1 e que essa possibilidade deve ser confirmada futuramente em ensaios de interação como o sistema de duplo-híbrido.

Por fim, determinamos com os ensaios de microscopia confocal que a proteína recombinante FLAG/MBP é capaz de ligar-se diretamente a intestinos dissecados de *P. papatasi*, apesar de não ter sido possível identificar uma região específica do intestino médio onde essa interação está ocorrendo.

5.2 - Capítulo 2 – TGF- β

Podemos concluir que o silenciamento de TGF- β em *L. longipalpis* gera uma ativação da resposta imune com aumento da expressão de PAMs e de iNOS, gerando uma redução bastante significativa da infecção por *L. i. chagasi*. Constatamos também que a regulação do gene de TGF- β é feita pela via Toll.

Além disso, determinamos que o bloqueio da molécula de TGF- β proveniente do sangue de mamífero utilizado nas alimentações artificiais gera um efeito oposto, com aumento do número de parasitas 96h após a infecção.

Esses dados nos levam a concluir que TGF- β de mamífero é capaz de interagir com receptores de membrana de *L. longipalpis* e que há uma forte possibilidade que existam vias alternativas de resposta a TGF- β no inseto. Com isso,

a molécula TGF- β pode ter um duplo papel na regulação do sistema imune, tanto ativando quanto inibindo-o.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ageta, H. and K. Tsuchida (2011). "Multifunctional roles of activins in the brain." Vitam Horm **85**: 185-206.
- Aggarwal, K. and N. Silverman (2008). "Positive and negative regulation of the Drosophila immune response." BMB Rep **41**(4): 267-277.
- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votycka, P. Marty, P. Delaunay and D. Sereno (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004349.
- Aleman-Muench, G. R. and G. Soldevila (2012). "When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity." Immunol Cell Biol **90**(2): 137-148.
- Araujo, A. P., E. L. Telleria, M. Dutra Jda, R. M. Julio and Y. M. Traub-Cseko (2012). "Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in Lutzomyia longipalpis females." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(4): 543-545.
- Bates, P. A. (2008). "Leishmania sand fly interaction: progress and challenges." Curr Opin Microbiol **11**(4): 340-344.
- Bello, F. J., A. J. Mejia, P. Corena Mdel, M. Ayala, L. Sarmiento, C. Zuniga and M. T. Palau (2005). "Experimental infection of Leishmania (L.) chagasi in a cell line derived from Lutzomyia longipalpis (Diptera:Psychodidae)." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(6): 519-525.
- Bodmer, J. L., P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Borovsky, D. and Y. Schlein (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**(3): 235-242.
- Boulanger, N., C. Lowenberger, P. Volf, R. Ursic, L. Sigutova, L. Sabatier, M. Svobodova, S. M. Beverley, G. Spath, R. Brun, B. Pesson and P. Bulet (2004). "Characterization of a defensin from the sand fly Phlebotomus duboscqi induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite Leishmania major." Infect Immun **72**(12): 7140-7146.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brummel, T., S. Abdollah, T. E. Haerry, M. J. Shimell, J. Merriam, L. Raftery, J. L. Wrana and M. B. O'Connor (1999). "The Drosophila activin receptor baboon signals through dSmad2 and controls cell proliferation but not patterning during larval development." Genes Dev **13**(1): 98-111.
- Butcher, B. A., S. J. Turco, B. A. Hilty, P. F. Pimenta, M. Panunzio and D. L. Sacks (1996). "Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a Leishmania major lipophosphoglycan mutant adversely influences the Leishmania-sand fly interaction." J Biol Chem **271**(34): 20573-20579.
- Chappuis F, S. 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?" Nature Reviews Microbiology **5**(11): 873 - 882.
- Charlab, R., J. G. Valenzuela, E. D. Rowton and J. M. Ribeiro (1999). "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15155-15160.
- Clark, R. I., K. J. Woodcock, F. Geissmann, C. Trouillet and M. S. Dionne (2011). "Multiple TGF-beta superfamily signals modulate the adult Drosophila immune response." Curr Biol **21**(19): 1672-1677.
- Conti, R. V., V. F. Moura Lane, L. Montebello and V. L. Pinto Junior (2016). "Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil." J Vector Borne Dis **53**(2): 99-104.
- Cortes, L. M., R. M. Silva, B. A. Pereira, C. Guerra, A. C. Zapata, F. J. Bello, L. C. Finkelstein, M. F. Madeira, R. P. Brazil, S. Corte-Real and C. R. Alves (2011). "Lulo cell line derived from Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay Leishmania spp. and vector interaction." Parasit Vectors **4**: 216.

Crampton, A. and S. Luckhart (2001b). "The role of As60A, a TGF-beta homolog, in *Anopheles stephensi* innate immunity and defense against *Plasmodium* infection." *Infect Genet Evol* **1**(2): 131-141.

Crampton, A. L. and S. Luckhart (2001a). "Isolation and characterization of As60A, a transforming growth factor-beta gene, from the malaria vector *Anopheles stephensi*." *Cytokine* **13**(2): 65-74.

Cunha, A. M. and E. Chagas (1937). "Nova espécie de protozoário

do gênero *Leishmania* patogênico para o homem.

Leishmania chagasi n.sp." *Hospital (Rio J)* **11**.

Da Silva, A. L., P. Williams, M. N. Melo and W. Mayrink (1990). "Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **85**(4): 453-458.

Dantas-Torres, F. and S. P. Brandao-Filho (2006). "Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48**(3): 151-156.

Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle and J. Chen (2008). "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2): 317-364, table of contents.

Di-Blasi, T., A. R. Lobo, L. M. Nascimento, J. L. Cordova-Rojas, K. Pestana, M. Marin-Villa, A. J. Tempone, E. L. Telleria, M. Ramalho-Ortigao, D. McMahon-Pratt and Y. M. Traub-Cseko (2015). "The flagellar protein FLAG1/SMP1 is a candidate for *Leishmania*-sand fly interaction." *Vector Borne Zoonotic Dis* **15**(3): 202-209.

Dillon, R. (2008). "Introduction to Sand flies.", 2016, from http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm.

Ellis, J. E., L. Parker, J. Cho and K. Arora (2010). "Activin signaling functions upstream of Gbb to regulate synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction." *Dev Biol* **342**(2): 121-133.

Ellis, J. T. and J. M. Crampton (1991). "Differences between *Leishmania (Leishmania) chagasi*, L. (L.) *infantum* and L. (L.) *donovani* as shown by DNA fingerprinting." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **86**(4): 479-481.

Fampa, P., M. S. Correa-da-Silva, D. C. Lima, S. M. Oliveira, M. C. Motta and E. M. Saraiva (2003). "Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines." *Int J Parasitol* **33**(10): 1019-1026.

Fang, F., R. Goncalves Marangoni, X. Zhou, Y. Yang, B. Ye, A. Shanguang, W. Qin, W. Wang, S. Bhattacharyya, J. Wei, W. G. Tourtellotte and J. Varga (2016). "Toll-like Receptor 9 Signaling Is Augmented in Systemic Sclerosis and Elicits Transforming Growth Factor beta-Dependent Fibroblast Activation." *Arthritis Rheumatol* **68**(8): 1989-2002.

Field, M. C. and M. Carrington (2009). "The trypanosome flagellar pocket." *Nat Rev Microbiol* **7**(11): 775-786.

Georgel, P., S. Naitza, C. Kappler, D. Ferrandon, D. Zachary, C. Swimmer, C. Kopczyński, G. Duyk, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (2001). "*Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis." *Dev Cell* **1**(4): 503-514.

Gontijo, B. and L. de Carvalho Mde (2003). "[American cutaneous leishmaniasis]." *Rev Soc Bras Med Trop* **36**(1): 71-80.

Gontijo, C. M. F. M., M.N. (2004). "Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas." *Rev. Bras. Epidemiol.*

7(3): 12.

Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott and U. Toprak (2009). "New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function." *Annu Rev Entomol* **54**: 285-302.

Henderson, D. P., and S. M. Payne. (1994). "*Vibrio cholerae* iron transport system: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems." *Infect. Immun.* **62**: 5120-5125.

Herpin, A., C. Lelong and P. Favrel (2004). "Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans." *Dev Comp Immunol* **28**(5): 461-485.

Hoch, R. V. and P. Soriano (2003). "Roles of PDGF in animal development." Development **130**(20): 4769-4784.

International Aphid Genomics, C. (2010). "Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*." PLoS Biol **8**(2): e1000313.

Isemann, S., Y. Khew-Goodall, J. Gamble, M. Vadas and B. W. Wattenberg (1998). "A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal." Mol Biol Cell **9**(7): 1649-1660.

Ismach, R., C. M. Cianci, J. P. Caulfield, P. J. Langer, A. Hein and D. McMahon-Pratt (1989). "Flagellar membrane and paraxial rod proteins of *Leishmania*: characterization employing monoclonal antibodies." J Protozool **36**(6): 617-624.

Jiang, D., J. Liang and P. W. Noble (2011). "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases." Physiol Rev **91**(1): 221-264.

Kamhawi, S. (2006). "Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?" Trends Parasitol **22**(9): 439-445.

Kamhawi, S., G. B. Modi, P. F. Pimenta, E. Rowton and D. L. Sacks (2000). "The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment." Parasitology **121** (Pt 1): 25-33.

Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao, V. M. Pham, S. Kumar, P. G. Lawyer, S. J. Turco, C. Barillas-Mury, D. L. Sacks and J. G. Valenzuela (2004). "A role for insect galectins in parasite survival." Cell **119**(3): 329-341.

Karlsson, L., P. Lindahl, J. K. Heath and C. Betsholtz (2000). "Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis." Development **127**(16): 3457-3466.

King, M. W. (2016, August 17, 2016). "Glycosaminoglycans." Retrieved September, 2016, from <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php>.

Kingsley, D. M. (1994). "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." Genes Dev **8**(2): 133-146.

Kruger, T. and M. Engstler (2015). "Flagellar motility in eukaryotic human parasites." Semin Cell Dev Biol **46**: 113-127.

Kuhls, K., M. Z. Alam, E. Cupolillo, G. E. Ferreira, I. L. Mauricio, R. Oddone, M. D. Feliciangeli, T. Wirth, M. A. Miles and G. Schonian (2011). "Comparative microsatellite typing of new world *leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1155.

Kurten, R. C., A. D. Eddington, P. Chowdhury, R. D. Smith, A. D. Davidson and B. B. Shank (2001). "Self-assembly and binding of a sorting nexin to sorting endosomes." J Cell Sci **114**(Pt 9): 1743-1756.

Lainson, R. and E. F. Rangel (2005). "*Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(8): 811-827.

Landfear, S. M. and M. Ignatushchenko (2001). "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **115**(1): 1-17.

Lee, A. H., M. P. Zareei and S. Daefler (2002). "Identification of a NIPSNAP homologue as host cell target for *Salmonella* virulence protein SpiC." Cell Microbiol **4**(11): 739-750.

Lemaitre, B. (2004). "The road to Toll." Nat Rev Immunol **4**(7): 521-527.

Lobo, A. R. (2008). Caracterização das proteínas de superfície Flag e Sup de *Leishmania* potencialmente envolvidas na interação com o vetor. Master, FIOCRUZ.

Lowenberger, C. (2001). "Innate immune response of *Aedes aegypti*." Insect Biochem Mol Biol **31**(3): 219-229.

Luckhart, S., A. L. Crampton, R. Zamora, M. J. Lieber, P. C. Dos Santos, T. M. Peterson, N. Emmith, J. Lim, D. A. Wink and Y. Vodovotz (2003). "Mammalian transforming growth factor beta1 activated after ingestion by *Anopheles stephensi* modulates mosquito immunity." Infect Immun **71**(6): 3000-3009.

Lukes, J., T. Skalicky, J. Tyc, J. Votycka and V. Yurchenko (2014). "Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates." Mol Biochem Parasitol **195**(2): 115-122.

- Lutz, A. N., A. (1912). "Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil." Mem Inst Oswaldo Cruz **4**: 84 - 95.
- Maga, J. A. and J. H. LeBowitz (1999). "Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod." Trends Cell Biol **9**(10): 409-413.
- Mahoney, A. B., D. L. Sacks, E. Saraiva, G. Modi and S. J. Turco (1999). "Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions." Biochemistry **38**(31): 9813-9823.
- Marques, C. (2005). Caracterização de um membro da super família do fator de crescimento e transformação (TGF-B) de *Lutzomyia longipalpis* Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz.
- Marshall, W. F. and J. L. Rosenbaum (2001). "Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control." J Cell Biol **155**(3): 405-414.
- Marzochi, M. C. (2016). "Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to Sao Paulo State, Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **49**(2): 147-149.
- Massague, J. (1990). "The transforming growth factor-beta family." Annu Rev Cell Biol **6**: 597-641.
- Ministério-da-Saúde (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. E. d. M. d. Saúde, Ministério da Saúde: 120.
- Ministério-da-Saúde (2007). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Normas e Manuais Técnicos. E. d. M. d. Saúde, Ministério da Saúde: 182.
- Moskalyk, L. A., M. M. Oo and M. Jacobs-Lorena (1996). "Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*." Insect Mol Biol **5**(4): 261-268.
- Myskova, J., M. Svobodova, S. M. Beverley and P. Volf (2007). "A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies." Microbes Infect **9**(3): 317-324.
- Nautiyal, M., A. J. Sweatt, J. A. MacKenzie, R. Mark Payne, S. Szucs, R. Matalon, R. Wallin and S. M. Hutson (2010). "Neuronal localization of the mitochondrial protein NIPSNAP1 in rat nervous system." Eur J Neurosci **32**(4): 560-569.
- Neves, D. P., A. L. Melo, P. M. Linardi and R. W. A. Vitor (2007). Parasitologia Humana, Biblioteca Biomédica.
- Neves, D. P., A. L. Melo, P. M. Linardi and R. W. A. Vitor (2007). Parasitologia Humana, Biblioteca Biomédica.
- Oliveira, D. M., E. M. Saraiva, E. A. Ishikawa, A. A. Sousa, E. O. Silva and I. M. Silva (2011). "Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(8): 1039-1044.
- Paz, G. (2010). Participação de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) na epidemiologia da leishmaniose visceral canina PhD, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.
- Penna, H. (1934). "Leishmaniose visceral no Brasil." Brasil Médico **18**: 940 - 950.
- Pimenta, P. F., R. P. da Silva, D. L. Sacks and P. P. da Silva (1989). "Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes." Eur J Cell Biol **48**(2): 180-190.
- Pimenta, P. F., G. B. Modi, S. T. Pereira, M. Shahabuddin and D. L. Sacks (1997). "A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut." Parasitology **115 (Pt 4)**: 359-369.
- Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, E. Rowton, G. B. Modi, L. A. Garraway, S. M. Beverley, S. J. Turco and D. L. Sacks (1994). "Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 9155-9159.
- Pimenta, P. F., S. J. Turco, M. J. McConville, P. G. Lawyer, P. V. Perkins and D. L. Sacks (1992). "Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut." Science **256**(5065): 1812-1815.
- Pitaluga, A. N., V. Beteille, A. R. Lobo, J. R. Ortigao-Farias, A. M. Davila, A. A. Souza, J. M. Ramalho-Ortigao and Y. M. Traub-Cseko (2009). "EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas." Mol Genet Genomics **282**(3): 307-317.

Portman, N. and K. Gull (2010). "The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function." Int J Parasitol **40**(2): 135-148.

Price, I., B. Ermentrout, R. Zamora, B. Wang, N. Azhar, Q. Mi, G. Constantine, J. R. Faeder, S. Luckhart and Y. Vodovotz (2013). "In vivo, in vitro, and in silico studies suggest a conserved immune module that regulates malaria parasite transmission from mammals to mosquitoes." J Theor Biol **334**: 173-186.

Qureshi, A. A., A. Asahina, M. Ohnuma, M. Tajima, R. D. Granstein and E. A. Lerner (1996). "Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts." Am J Trop Med Hyg **54**(6): 665-671.

Ramalho-Ortigao, J. M., E. Saraiva and Y. M. Traub-Cseko (2010). "Sand Fly-Leishmania Interactions: Long Relationships are Not Necessarily Easy." The Open Parasitology Journal **4**: 195 - 204.

Ramalho-Ortigao, J. M., P. Temporal, S. M. de Oliveira, A. F. Barbosa, M. L. Vilela, E. F. Rangel, R. P. Brazil and Y. M. Traub-Cseko (2001). "Characterization of constitutive and putative differentially expressed mRNAs by means of expressed sequence tags, differential display reverse transcriptase-PCR and randomly amplified polymorphic DNA-PCR from the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(1): 105-111.

Richman, A. M., G. Dimopoulos, D. Seeley and F. C. Kafatos (1997). "Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes." EMBO J **16**(20): 6114-6119.

Rivier, C., J. Rivier and W. Vale (1986). "Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat." Science **234**(4773): 205-208.

Rogers, P. A. B. a. M. E. (2004). "New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania." Current Molecular Medicine **4**: 601-609.

Rojas, J. L. C. (1997). Biological, biochemical and molecular characterization of FLAG-1, a *Leishmania* membrane-associated flagellar protein. Doutorado, Yale University.

Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Spath, L. Epstein, S. J. Turco and S. M. Beverley (2000). "The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 406-411.

Sacks, D. L., P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider and S. J. Turco (1995). "Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J Exp Med **181**(2): 685-697.

Schlein, Y., R. L. Jacobson and G. Messer (1992). "Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9944-9948.

Schneider-Brachert, W., U. Heigl and M. Ehrenschwender (2013). "Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling." Int J Mol Sci **14**(7): 14475-14503.

Secundino, N., N. Kimblin, N. C. Peters, P. Lawyer, A. A. Capul, S. M. Beverley, S. J. Turco and D. Sacks (2010). "Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies." Cell Microbiol **12**(7): 906-918.

Seroussi, E., H. Q. Pan, D. Kedra, B. A. Roe and J. P. Dumanski (1998). "Characterization of the human NIPSNAP1 gene from 22q12: a member of a novel gene family." Gene **212**(1): 13-20.

Sharma, U. and S. Singh (2008). "Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control." J Vector Borne Dis **45**(4): 255-272.

Silverman, K. A. N. (2008). "Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response." BMB reports: 267-277.

Sinnis, P., A. Coppi, T. Toida, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, J. Xie, M. M. Kemp and R. J. Linhardt (2007). "Mosquito heparan sulfate and its potential role in malaria infection and transmission." J Biol Chem **282**(35): 25376-25384.

SisLeish (2015). Informe Epidemiológico das Américas - Leishmanioses, PAHO/WHO. **3**.

Soares, R. P. and S. J. Turco (2003). "*Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review." An Acad Bras Cienc **75**(3): 301-330.

Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

Souza, N. A., C. A. Andrade-Coelho, V. C. Silva, R. D. Ward and A. A. Peixoto (2009). "Life cycle differences among Brazilian sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* sibling species complex." Med Vet Entomol **23**(3): 287-292.

Surachetpong, W., N. Singh, K. W. Cheung and S. Luckhart (2009). "MAPK ERK signaling regulates the TGF-beta1-dependent mosquito response to *Plasmodium falciparum*." PLoS Pathog **5**(4): e1000366.

Svarovska, A., T. H. Ant, V. Seblova, L. Jecna, S. M. Beverley and P. Volf (2010). "Leishmania major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors." PLoS Negl Trop Dis **4**(1): e580.

Svobodova, M., P. Volf and R. Killick-Kendrick (1996). "Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies." Ann Trop Med Parasitol **90**(3): 329-336.

Telleria, E. L., A. P. de Araujo, N. F. Secundino, C. M. d'Avila-Levy and Y. M. Traub-Cseko (2010). "Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*--expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*." PLoS One **5**(5): e10697.

Telleria, E. L., M. R. Sant'Anna, M. O. Alkurbi, A. N. Pitaluga, R. J. Dillon and Y. M. Traub-Cseko (2013). "Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*." Parasit Vectors **6**: 12.

Telleria, E. L., M. R. Sant'Anna, J. R. Ortigao-Farias, A. N. Pitaluga, V. M. Dillon, P. A. Bates, Y. M. Traub-Cseko and R. J. Dillon (2012). "Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*." J Biol Chem **287**(16): 12985-12993.

Tetley, L. and K. Vickerman (1985). "Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat." J Cell Sci **74**: 1-19.

Tinoco-Nunes, B., E. L. Telleria, M. da Silva-Neves, C. Marques, D. A. Azevedo-Brito, A. N. Pitaluga and Y. M. Traub-Cseko (2016). "The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*." Parasit Vectors **9**: 222.

Tull, D., T. Naderer, T. Spurck, H. D. Mertens, J. Heng, G. I. McFadden, P. R. Gooley and M. J. McConville (2010). "Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*." J Cell Sci **123**(Pt 4): 544-554.

Tull, D., J. E. Vince, J. M. Callaghan, T. Naderer, T. Spurck, G. I. McFadden, G. Currie, K. Ferguson, A. Bacic and M. J. McConville (2004). "SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in *Leishmania*." Mol Biol Cell **15**(11): 4775-4786.

Valanne, S., J. H. Wang and M. Ramet (2011). "The *Drosophila* Toll signaling pathway." J Immunol **186**(2): 649-656.

Verhagen, A. M., T. K. Kratina, C. J. Hawkins, J. Silke, P. G. Ekert and D. L. Vaux (2007). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." Cell Death Differ **14**(2): 348-357.

Vodovotz, Y., R. Zamora, M. J. Lieber and S. Luckhart (2004). "Cross-talk between nitric oxide and transforming growth factor-beta1 in malaria." Curr Mol Med **4**(7): 787-797.

Volf, P., S. Skarupova and P. Man (2002). "Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies." Eur J Biochem **269**(24): 6294-6301.

Wang, L. and P. Ligoxygakis (2006). "Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response." Immunobiology **211**(4): 251-261.

Warburg, A., E. Saraiva, G. C. Lanzaro, R. G. Titus and F. Neva (1994). "Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1312): 223-230.

Warburg, A., R. B. Tesh and D. McMahon-Pratt (1989). "Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium." J Protozool **36**(6): 613-617.

Weiss, A. and L. Attisano (2013). "The TGFbeta superfamily signaling pathway." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **2**(1): 47-63.

WHO (2010). Control of the Leishmaniasis. E. C. o. t. C. o. Leishmaniasis: 202.

- WHO (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO: 211.
- Worby, C. A. and J. E. Dixon (2002). "Sorting out the cellular functions of sorting nexins." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 919-931.
- Wu, J., Y. Ding, Y. Bi, Y. Wang, Y. Zhi, J. Wang and F. Wang (2016). "Staphylococcus aureus induces TGF-beta1 and bFGF expression through the activation of AP-1 and NF-kappaB transcription factors in bovine mammary gland fibroblasts." Microb Pathog **95**: 7-14.
- Zaia, J. (2009). "On-line separations combined with MS for analysis of glycosaminoglycans." Mass Spectrom. Rev. **28**: 254-272.
- Zauli, R. C., J. K. Yokoyama-Yasunaka, D. C. Miguel, A. S. Moura, L. Pereira, I. A. da Silva, Jr., L. G. Lemes, M. L. Dorta, M. A. de Oliveira, A. N. Pitaluga, E. A. Ishikawa, J. C. Rodrigues, Y. M. Traub-Cseko, A. T. Bijovsky, F. Ribeiro-Dias and S. R. Uliana (2012). "A dysflagellar mutant of Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from a cutaneous leishmaniasis patient." Parasit Vectors **5**: 11.

VI – ANEXOS:

- **Anexo I:**

O artigo completo publicado durante o doutorado encontra-se ao final da tese: Di-Blasi, T. *et al*, 2015.

- **Anexo II – parte 1:**

Fasta headers	Peptides - total:	PEP	Intensity
>PPATMP000153-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold101:116112-122407:-1 gene:PPATMP000153	4	2,77E-80	9633000
>PPATMP000214-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold103:244832-245672:-1 gene:PPATMP000214	4	1,09E-20	5302200
>PPATMP000215-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold103:251457-261265:-1 gene:PPATMP000215	18	1,85E-61	33156000
>PPATMP000248-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1049:36499-37105:1 gene:PPATMP000248	1	1,99E-25	342030
>PPATMP008472-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold49899:1758-3140:1 gene:PPATMP008472	6	4,3E-116	8205000
>PPATMP000499-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1112:4335-5927:-1 gene:PPATMP000499	6	3,06E-86	5552200
>PPATMP000805-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold12:1151649-1160054:-1 gene:PPATMP000805	1	0,003587	108820
>PPATMP001235-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1322:10748-21929:-1 gene:PPATMP001235	4	5,37E-30	9899700
>PPATMP001236-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1322:25068-29387:-1 gene:PPATMP001236	11	4,11E-32	20731000
>PPATMP001425-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold14:782305-782955:1 gene:PPATMP001425	2	0,012929	448620
>PPATMP010746-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold87:342687-342998:1 gene:PPATMP010746	2	0,010591	1323700
>PPATMP001831-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1559:24165-36280:1 gene:PPATMP001831	5	1,52E-21	3974800
>PPATMP002432-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold181:27315-33160:1 gene:PPATMP002432	2	5,17E-06	785520
>PPATMP002517-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold1850:1392-2779:1 gene:PPATMP002517	3	4,4E-07	1125500
>PPATMP002538-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold186:138387-145381:-1 gene:PPATMP002538	2	1,49E-05	184610
>PPATMP002744-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold194:100934-118892:-1 gene:PPATMP002744	18	1,1E-151	61665000
>PPATMP002872-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2:941566-942493:1 gene:PPATMP002872	2	0,000516	1129600
>PPATMP002907-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold200:62509-73421:1 gene:PPATMP002907	6	5,24E-14	4763500
>PPATMP003106-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold21:406165-407740:1 gene:PPATMP003106	4	4,04E-13	9587600

Fasta headers	Peptides - total:	PEP	Intensity
>PPATMP003116-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold21:649958-655229:1 gene:PPATMP003116	1	1,47E-10	346290
>PPATMP003431-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold227:77462-91070:-1 gene:PPATMP003431	3	0,000269	2281000
>PPATMP003432-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold227:91462-101341:1 gene:PPATMP003432	2	0,000798	712500
>PPATMP003520-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2310:1851-3095:-1 gene:PPATMP003520	1	0,00336	687940
>PPATMP003590-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2349:8437-9332:1 gene:PPATMP003590	4	8,8E-115	9250200
>PPATMP003591-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2349:9816-19556:1 gene:PPATMP003591	4	1,17E-90	7660600
>PPATMP003831-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2410:9199-17897:1 gene:PPATMP003831	1	3,08E-15	911140
>PPATMP003857-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2428:227-2161:-1 gene:PPATMP003857	1	0,003747	114900
>PPATMP004223-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold26:720198-721531:-1 gene:PPATMP004223	1	0,001824	414350
>PPATMP004610-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold2823:6256-6787:1 gene:PPATMP004610	3	4,38E-22	6361100
>PPATMP004961-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold30:63573-64410:1 gene:PPATMP004961	1	6,74E-06	219070
>PPATMP005699-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold354:81991-83606:1 gene:PPATMP005699	2	0,010629	958880
>PPATMP005721-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold3555:11416-12843:-1 gene:PPATMP005721	4	1,59E-33	5490300
>PPATMP005830-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold3646:321-5321:-1 gene:PPATMP005830	2	2,58E-09	582750
>PPATMP010959-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold920:15813-23916:1 gene:PPATMP010959	1	0,007823	246660
>PPATMP010960-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold920:25512-28836:-1 gene:PPATMP010960	2	1,01E-32	561950
>PPATMP009073-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold543:58824-70067:-1 gene:PPATMP009073	1	0,00052	645240
>PPATMP009190-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold55742:2000-2927:-1 gene:PPATMP009190	1	0,011106	742390
>PPATMP009479-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold59:236145-237143:-1 gene:PPATMP009479	3	2,75E-07	3654700
>PPATMP009750-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold632:41668-48844:-1 gene:PPATMP009750	3	0,003374	1570300
>PPATMP009771-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold64:67076-71066:1 gene:PPATMP009771	1	0,00016	1143000
>PPATMP009830-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold652:28805-33015:1 gene:PPATMP009830	1	0,004672	126600
>PPATMP009938-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold67:138420-144566:-1 gene:PPATMP009938	2	8,58E-19	3319900
>PPATMP010023-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold69:177305-181331:-1 gene:PPATMP010023	1	0,003145	0
>PPATMP010187-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold720:32521-40296:1 gene:PPATMP010187	1	2,56E-07	3618000
>PPATMP010238-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold733:14388-18234:1 gene:PPATMP010238	1	1,74E-07	535020

Fasta headers	Peptides - total:	PEP	Intensity
>PPATMP005922-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold3733:11629-12243:1 gene:PPATMP005922	2	1,51E-50	14255000
>PPATMP005951-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold3758:1190-2940:1 gene:PPATMP005951	1	0,010706	768920
>PPATMP006011-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold381:55561-74156:1 gene:PPATMP006011	2	6,28E-42	1673700
>PPATMP006498-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold42:423069-452342:1 gene:PPATMP006498	2	0,000764	297400
>PPATMP006816-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43046:2588-3357:-1 gene:PPATMP006816	1	0,002337	654310
>PPATMP006842-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43106:9652-9951:-1 gene:PPATMP006842	1	0,009547	315790
>PPATMP006859-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43155:7060-7477:-1 gene:PPATMP006859	1	0,002118	580730
>PPATMP006895-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43239:8923-23098:1 gene:PPATMP006895	10	6,17E-38	2999400
>PPATMP007083-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43748:8132-8889:-1 gene:PPATMP007083	1	4,91E-05	208450
>PPATMP007088-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43762:4331-5701:1 gene:PPATMP007088	4	8,33E-16	2354300
>PPATMP007168-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold43984:1478-2509:-1 gene:PPATMP007168	2	7,74E-08	1268100
>PPATMP008096-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold47492:4689-5222:1 gene:PPATMP008096	1	4,03E-11	3392400
>PPATMP008228-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold4831:5297-5953:1 gene:PPATMP008228	3	1,51E-24	1684700
>PPATMP008254-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold4852:3394-8692:1 gene:PPATMP008254	8	1,81E-36	8631300
>PPATMP008427-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold4968:1-790:1 gene:PPATMP008427	7	8,22E-15	54685000
>PPATMP008563-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold5004:7599-8323:-1 gene:PPATMP008563	1	0,009907	626310
>PPATMP008758-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold5166:1650-7216:1 gene:PPATMP008758	1	0,000231	129060
>PPATMP008820-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold522:32000-35420:-1 gene:PPATMP008820	39	0	7,47E+08
>PPATMP009062-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold5414:4369-5592:-1 gene:PPATMP009062	1	0,000211	684010
>PPATMP010403-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold770:42879-48820:1 gene:PPATMP010403	1	0,001018	1045500
>PPATMP010744-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold87:299285-319454:1 gene:PPATMP010744	5	8,01E-12	4069400
>PPATMP010775-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold88:8339-30311:1 gene:PPATMP010775	1	0,002385	106630
>PPATMP010935-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold912:46538-53305:-1 gene:PPATMP010935	4	7,54E-40	3919900
>PPATMP010943-PA hypothetical protein protein_coding Scaffold915:29224-35133:-1 gene:PPATMP010943	4	5E-115	28011000

- **Anexo II – parte 2:**

IDs das proteínas:	Possíveis funções associadas a sequências homólogas:
>PPATMP000153-PA	Chaperonin (ref XP_001662847.1)
>PPATMP000214-PA	ATP-citrate synthase [<i>Culex quinquefasciatus</i>] (ref XP_001842482.1)
>PPATMP000215-PA	ATP-citrate synthase [<i>Anopheles darlingi</i>] (gb ETN57927.1)
>PPATMP000499-PA	ATP-binding cassette sub-family E member 1 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]
>PPATMP001235-PA	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP001236-PA	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [<i>Anopheles darlingi</i>]
>PPATMP001831-PA	vesicle associated protein, putative [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP002432-PA	HRP65 [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP002517-PA	NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 1 (ndufv1) [<i>Anopheles darlingi</i>]
>PPATMP002538-PA	PREDICTED: tubulin-specific chaperone D-like [<i>Musca domestica</i>]
>PPATMP002744-PA	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R-like isoform X11 [<i>Ceratitis capitata</i>]
>PPATMP002907-PA	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1 [<i>Culex quinquefasciatus</i>] (ref XP_001843333.1)
>PPATMP003116-PA	fas-associated protein [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP003432-PA	isoleucyl tRNA synthetase [<i>Culex quinquefasciatus</i>]
>PPATMP003590-PA	vacuolar H[+]-ATPase 55kD B subunit, isoform B [<i>Drosophila melanogaster</i>]
>PPATMP004610-PA	NIPSNAP protein [<i>Drosophila melanogaster</i>]
>PPATMP005721-PA	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial-like [<i>Musca domestica</i>]
>PPATMP005830-PA	Lamin-C [<i>Camponotus floridanus</i>]
>PPATMP006895-PA	myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP007088-PA	ribophorin [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP008820-PA	tubulin beta chain [<i>Aedes aegypti</i>]
>PPATMP009479-PA	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Lutzomyia longipalpis</i>]
>PPATMP010744-PA	PDGF- and VEGF-receptor related, isoform M [<i>Drosophila melanogaster</i>]
>PPATMP010935-PA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Anopheles darlingi</i>]
>PPATMP010943-PA	PREDICTED: GTP-binding nuclear protein Ran-like [<i>Ceratitis capitata</i>]

- Anexo III:

Protein ID for Mascot (Drosophila database):	Homolog in insect vectors:	Possible functions:
gi 38048359	EX474836.1	ribosomal protein
gi 195376393	PPAI006007-RA	cell traffic
gi 195395258	PPAI010244-RA	unknown
gi 125981807	JP540706.1	SAICAR synthetase
gi 195432456	PPAI010143-RA	unknown
gi 924561776	AAEL005839-RA (aedes)	uridin phosphorilase
gi 195582176	PPAI008773-RA	receptor (DUF)
gi 194874632	PPAI010848-RA	kinase
gi 25012624	JP552608.1	unknown
gi 195487038	PPAI002404-RA	Olfactory receptor (pheromone/odorant binding ptn)
gi 195579946	PPAI008315-RA / AAEL004090-RA	Type I periplasmic ligand-binding domain of uncharacterized ABC (Atpase Binding Cassette)
gi 195145990	PPAI011058-RA	unknown
gi 195472705	PPAI008100-RA	unknown
gi 194877486	-	unknown
gi 195331734	AAEL005404-RA	unknown
gi 281364863	AAEL007397-RB (aedes)	unknown
gi 344217779	PPAI002741-RA	unknown (possible receptor)
gi 25013155	PPAI006007-RA	membrane protein traffic
gi 16648078	PPAI007824-RA	unkown
gi 195489621	AAEL003441-RA / PPAI008810-RA	possible membrane protein (promonin domain)
gi 194898618	PPAI001983-RA	DUF1448 (relacionado a membrana e vesicula)-gram protein domain
gi 195589503	DV307992.1	unknown
gi 194882383	PPAI010183-RA	zinc finger
gi 195133550	-	unknown
gi 195394656	JP549707.1	hydrolase family
gi 924560116	-	DUF1091 (lipid binding)
gi 900901251	DV380598.1 (aedes)	hydrolase family
gi 194753168	JP553571.1	FAD binding domain/flavoprotein subunit
gi 195573747	JP544099.1 / LLOJ001505-PA / AAEL008073-RA	hyaluronan-binding proteins
gi 194763997	JP540706.1	ribonucleotide sintase
gi 195445604	DV400062.1 (aedes)	Ras-induced vulval development antagonist
gi 195326756	PPAI005384-RA	unknown
gi 194896778	-	unknown

The Flagellar Protein FLAG1/SMP1 is a Candidate for *Leishmania*–Sand Fly Interaction

Tatiana Di-Blasi,¹ Amanda R. Lobo,¹ Luanda M. Nascimento,¹ Jose L. Córdova-Rojas,² Karen Pestana,² Marcel Marín-Villa,¹ Antonio J. Tempone,¹ Erich L. Telleria,¹ Marcelo Ramalho-Ortigão,³ Diane McMahon-Pratt,² and Yara M. Traub-Csekö¹

Abstract

Leishmaniasis is a serious problem that affects mostly poor countries. Various species of *Leishmania* are the agents of the disease, which take different clinical manifestations. The parasite is transmitted by sandflies, predominantly from the *Phlebotomus* genus in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. During development in the gut, *Leishmania* must survive various challenges, which include avoiding being expelled with blood remnants after digestion. It is believed that attachment to the gut epithelium is a necessary step for vector infection, and molecules from parasites and sand flies have been implicated in this attachment. In previous work, monoclonal antibodies were produced against *Leishmania*. Among these an antibody was obtained against *Leishmania braziliensis* flagella, which blocked the attachment of *Leishmania panamensis* flagella to *Phlebotomus papatasi* guts. The protein recognized by this antibody was identified and named FLAG1, and the complete FLAG1 gene sequence was obtained. This protein was later independently identified as a small, myristoylated protein and called SMP1, so from now on it will be denominated FLAG1/SMP1. The *FLAG1/SMP1* gene is expressed in all developmental stages of the parasite, but has higher expression in promastigotes. The anti-FLAG1/SMP1 antibody recognized the flagellum of all *Leishmania* species tested and generated the expected band by western blots. This antibody was used in attachment and infection blocking experiments. Using the New World vector *Lutzomyia longipalpis* and *Leishmania infantum chagasi*, no inhibition of attachment *ex vivo* or infection *in vivo* was seen. On the other hand, when the Old World vectors *P. papatasi* and *Leishmania major* were used, a significant decrease of both attachment and infection were seen in the presence of the antibody. We propose that FLAG1/SMP1 is involved in the attachment/infection of *Leishmania* in the strict vector *P. papatasi* and not the permissive vector *L. longipalpis*.

Key Words: *Leishmania*—*Lutzomyia longipalpis*—*Phlebotomus papatasi*—Flagellum—FLAG1/SMP1—Leishmaniasis—Sand fly—Vector–parasite interaction.

Introduction

PHLEBOTOMINE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) SAND FLIES are the main vectors of leishmaniasis, a disease ranging from self-healing skin lesions to fatal, if left untreated, visceral disease. Different *Leishmania* species are associated with distinct disease outcome, and from the hundreds of sand flies identified to date only a limited number have been proven to be *bona fide* vectors of *Leishmania* (Killick-Kendrick 1990). Some sand fly species are considered permissive (*e.g.*, *Lutzomyia longipalpis*) because they can be infected by several

Leishmania, whereas other vectors can be infected only with the *Leishmania* species they carry in nature and are thus considered restrictive (*e.g.*, *Phlebotomus papatasi*) (Sacks and Kamhawi 2001, Volf and Myskova 2007). Several parasite and vector molecules allow the parasite's infection, survival, and multiplication within the midgut of the sand fly and eventual transmission to a vertebrate host during a blood meal. *Leishmania* can manipulate the sand fly potentially threatening digestive proteases activity (Borovsky and Schlein 1983, Schlein et al. 1983, Dillon and Lane 1993, Schlein and Jacobson 1998, Telleria et al. 2010) and also can cause damage

¹Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Yale University School of Public Health, New Haven, Connecticut.

³Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, Kansas.

to the stomodeal valve of the fly (Schlein et al. 1992, Rogers et al. 2008), potentiating transmission. On the other hand, sand flies can mount an immune response to *Leishmania* infection (Boulanger et al. 2004, Ramalho-Ortigão et al. 2007, 2010, Jochim et al. 2008, Pitaluga et al. 2009, Diaz-Albiter et al. 2012, Telleria et al. 2012).

Although *Leishmania* do not invade the midgut cells, adhesion to epithelial cells is well documented (Killick-Kendrick and Rioux, 1991). In the case of the *P. papatasi* attachment of *Leishmania major* can be promoted by the lipophosphoglycan (LPG) that covers the parasite (Sacks and Kamhawi 2001), for which the midgut galactose-binding protein PpGalec was shown to be a receptor (Kamhawi et al. 2004). The function of LPG in attachment was confirmed in strict vector–parasite pairs by the use of LPG-deficient *Leishmania* that failed to adhere to midguts *ex vivo* and *in vivo* after blood digestion (Sacks et al. 1995, Sacks et al. 2000). However, in permissive vectors, LPG-deficient *Leishmania* infected the insects normally, indicating an alternative attachment mechanism (Svárovská et al. 2010, Jecna et al. 2013). LPG-independent midgut binding has been suggested in association with the degree of glycosylation of proteins expressed by midgut epithelial cells (Myskova et al. 2007).

It is possible that other unknown molecules also have a role in midgut attachment. We have previously shown that a monoclonal antibody developed against *Leishmania braziliensis* flagella (Ismach et al. 1989) was capable of inhibiting attachment of *Leishmania panamensis* or *L. major* to dissected guts of *P. papatasi* (Warburg et al. 1989). We identified the 15-kD flagellar protein FLAG1/SMP1 recognized by this antibody (Córdova-Rojas 1998). Later, this protein was identified as a small myristoylated protein (SMP1) by another group (Tull et al. 2004). Here we show that the *Leishmania* flagellar protein FLAG1/SMP1 has a role in parasite interaction with the vector, in the case of the strict vector *P. papatasi*.

Materials and Methods

Leishmania

Leishmania infantum chagasi (MHOM/BR/1974/PP75), *L. infantum* (MHOM/ES/00/UCM-1), *L. pifanoi* (MHOM/VE/1975/LL1), *L. amazonensis* (MHOM/BR/1967/PH8), *L. major* (MHOM/SU/1973-ASKH), *L. donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), and *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21) were obtained from the Instituto Oswaldo Cruz *Leishmania* Culture Collection. Promastigote-stage parasites were maintained by weekly transfers using M199 medium (pH 7.0) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). *L. pifanoi* amastigotes were maintained at 30°C in F29 medium supplemented with FBS (Pan 1984). To obtain a metacyclic enriched population of parasites, a Ficoll (PM400, Sigma) gradient was used as described (Späth and Beverley 2001, Yao et al. 2008).

Sand flies and infection with Leishmania

L. longipalpis originating from Lapinha Cave, Minas Gerais, Brazil, F₁ adults or insects from a laboratory colony maintained at the Department of Entomology, Kansas State University for several years (LLL strain), were used in the experiments. Insects were sugar fed on 30% sucrose solution *ad libitum* and blood fed directly on an anesthetized male

hamster when needed. *P. papatasi* from colonies originating from Israel were maintained in a similar way. Three- to five-day-old sand flies were fed on mouse blood alone or of blood containing 5×10^6 *L. major* promastigotes/mL or 1×10^7 *L. i. chagasi* promastigotes/mL using a feeding apparatus. All procedures involving live animals were approved by the FIOCRUZ bioethics committee (CEUA, protocol number P0-116-02) and by the Committee on Institutional Animal Care and Use of the Kansas State University (KSU-IACUC) (protocol numbers 3080 and 3081). All sand fly feedings on animals and all bleeds were performed on animals under anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Isolation and characterization of FLAG1

The FLAG1 protein was purified from *Leishmania* flagella preparations using previously described methods (Pereira et al. 1977, Ismach et al. 1989). The flagellar-enriched fraction was extracted using Brij-97, and nonsoluble material was eliminated by centrifugation at $39,000 \times g$ for 1 h at 4°C. The supernatant was then diluted in cold 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing protease inhibitors (1 mM of iodoacetamide, 1 µg/mL of 1,10-phenanthroline, and 5 µg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride) purified on a F-2 monoclonal antibody immunoaffinity column. The FLAG-1 protein was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7), which was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 7.2). Purity was assessed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The sample was subjected to isoelectric focusing (first dimension) followed by SDS-PAGE, as described by O'Farrell (1975).

The two-dimensional SDS-PAGE fractionated protein was electrotransferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA) as described (Towbin et al. 1979) and sent for amino acid composition and peptide sequencing at the Yale University School of Medicine Protein and Nucleic Acid Chemistry Facility. Peptides were generated by chemical cleavage with cyanogen bromide (CNBr) (Jirikowski, 1985) or digested enzymatically with trypsin (Lee and Forstner 1985), and isolated by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a reverse-phase Vydac column C18 (Nest Group Inc., Southborough, MA). Selected isolated peptide peaks were sequenced using gas-phase Applied Biosystems models 470 and 477, as described (Matsudaira 1987).

FLAG1/SMP1 sequencing

L. i. chagasi FLAG1/SMP1 was amplified from parasites DNA using primers Flag F (5'-GGA TCC GGC TGC GGT GCT TCT TCT-3') and Flag R (5'-AAG CTT CTT TTC CTT CTC CGC CTG-3') and sequenced in the Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) PDTIS Facility.

Bioinformatics analyses

The FLAG1/SMP1 sequences aligned were collected at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genes database with the exception of *L. i. chagasi*, which was obtained from Sanger sequencing in our laboratory. The protein sequences were predicted with the ExPASy translation tool. For the alignments, we used the program Muscle WS with the score matrix Blossum62 through the platform Jalview. Phylogenetic analysis was performed using the

neighbor-joining method, with a bootstrap of 1000 and the model p-distance, and using the MEGA 5.1 program.

Real-time PCR

Total RNA from *L. i. chagasi* and *L. major* (promastigotes) and *L. pifanoi* (amastigotes and promastigotes) was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's instructions, followed by DNase I (Promega) treatment.

First-strand cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen). Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following primers FLAG_Rtime_Fwd (5'-AGT GGG TAG CCT CCG TGG TGG TGT A-3'), FLAG_Rtime_Rev (5'-CTC CGA CAG CGG CAA GGC GTC CAT C-3'), LeishActin_Fwd (5'-GTG GTC GAT AAA GCC GAA GGT GGT T-3'), LeishActin_Rev (5'-TTG GGC CAG ACT CGT CGT ACT CGC T-3'). Expression levels of FLAG1/SMP1 were determined through $\Delta\Delta C_t$, normalized using actin gene expression, yielding the relative expression value (Pfaffl 2001).

Immunofluorescence

Leishmania were concentrated to 10^8 parasites in 20 µL of phosphate-buffered saline (PBS), applied to poly-L-lysine Poly-Prep™ slides from Sigma Diagnostics, fixed in methanol at -20°C, and blocked in PBS+3% bovine serum albumin (BSA) for 45–60 min. The slides were incubated with the anti-FLAG1/SMP1 antibody (Ismach et al. 1989) in a 1:100 dilution and then with a 1:1000 dilution of an anti-mouse rhodamine-coupled antibody (Jackson ImmunoResearch) in blocking solution for 45–60 min. Images were obtained in the confocal microscope LSM 510 META from the FIOCRUZ, PDTIS Facility.

Western blot

Samples corresponding to 25 µg of *Leishmania* extracts were separated on 15% SDS-PAGE gels at 120V for 2 h. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) at 100V for 1.5 h at 4°C. The membranes were blocked with 5% nonfat milk Tris-buffered saline (TBS)+0.1% Tween 20 (TBST) for at least 1 h. The membranes were then incubated with anti-FLAG1/SMP1 monoclonal antibody (Ismach et al. 1989) (1:3000) for 2 h in the same solution. After three washes of 10 min in TBST, the membranes were incubated with anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) at a 1:10,000 dilution for 1 h. Three more washes were performed before the incubation of the membrane with the detection system Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific).

Ex vivo inhibition of parasite binding by anti-FLAG1/SMP1 antibody

Leishmania culture promastigotes (5×10^6) were incubated at room temperature for 1 h with anti-FLAG1/SMP1 antibody (1:500) or PBS. Midguts from 3- to 5-day-old non-blood-fed sand flies were dissected and washed in ice-cold PBS. Each midgut was opened longitudinally to expose the midgut epithelium and then incubated for 1 h at room temperature with the FLAG1/SMP1-treated parasites. Individual midguts were

then washed three times with cold PBS, and homogenized in 30 µL of PBS followed by parasite counting using a hemocytometer.

Inhibition of infection by anti-FLAG1/SMP1 antibody

L. longipalpis and *P. papatasi* females were artificially fed with blood containing 10^7 *L. i. chagasi* or 5×10^6 *L. major*. The same volumes of anti-FLAG1/SMP1 antibody or PBS were added to the blood-containing parasites. After 72 h, groups of approximately seven females were examined and dissected in cold PBS. Individual midguts were homogenized in 30 µL of cold PBS, and parasites were counted using a hemocytometer. Total number of insects used in each experiment is shown in the figures (see below), where each dot represents one insect.

Statistical analysis

The Wilcoxon signed-rank test was used to analyze *in vitro* binding and *in vivo* infection. Values were considered significant at the 95% confidence interval.

Results

Sequencing of FLAG1/SMP1

FLAG1/SMP1 protein was isolated and sequence determined (Córdova-Rojas 1998). Briefly, the FLAG1/SMP1 protein was isolated from detergent-solubilized flagellar preparations from *L. amazonensis* promastigotes using immunoaffinity chromatography and the F-2 monoclonal antibody (Ismach et al. 1989). Peptides from CNBr-trypsin-digested FLAG1/SMP1 protein were isolated by HPLC and sequenced. Peptide sequences are shown in Table 1, and their location on the FLAG1/SMP1 complete sequence is shown in Figure 1.

Sequencing of the *L. i. chagasi* FLAG1/SMP1 gene

Degenerate PCR primers were designed and synthesized based on these internal peptide sequences (Table 1), and partial nucleotide sequences were obtained (Córdoba-Rojas 1998). A complete sequence was obtained as described above and this was aligned with other *Leishmania* and one *Trypanosoma cruzi* sequence (Fig. 1). *FLAG1/SMP1* is highly conserved among all investigated trypanosomatids, with a higher degree of conservation among the *Leishmania*, as expected.

Expression of FLAG1/SMP1

Expression of the *FLAG1/SMP1* gene was assessed by qPCR in different developmental stages of *L. major*, *L. i. chagasi*, and *L. pifanoi*, the only *Leishmania* species for which axenic amastigotes were available. The axenic amastigote forms of

TABLE 1. PEPTIDE SEQUENCE DATA FROM CYANOGEN BROMIDE-TRYPSIN-DIGESTED FLAG1/SMP1

Elution peak number	Peptide sequence
33	FIEGR
52	a/s/gGxMDALPLSEEYxQ
55	(d)KMDALPLSEEYR
57	DALPLSEEY
70	xFEKDNGLLF
71	GFEKD

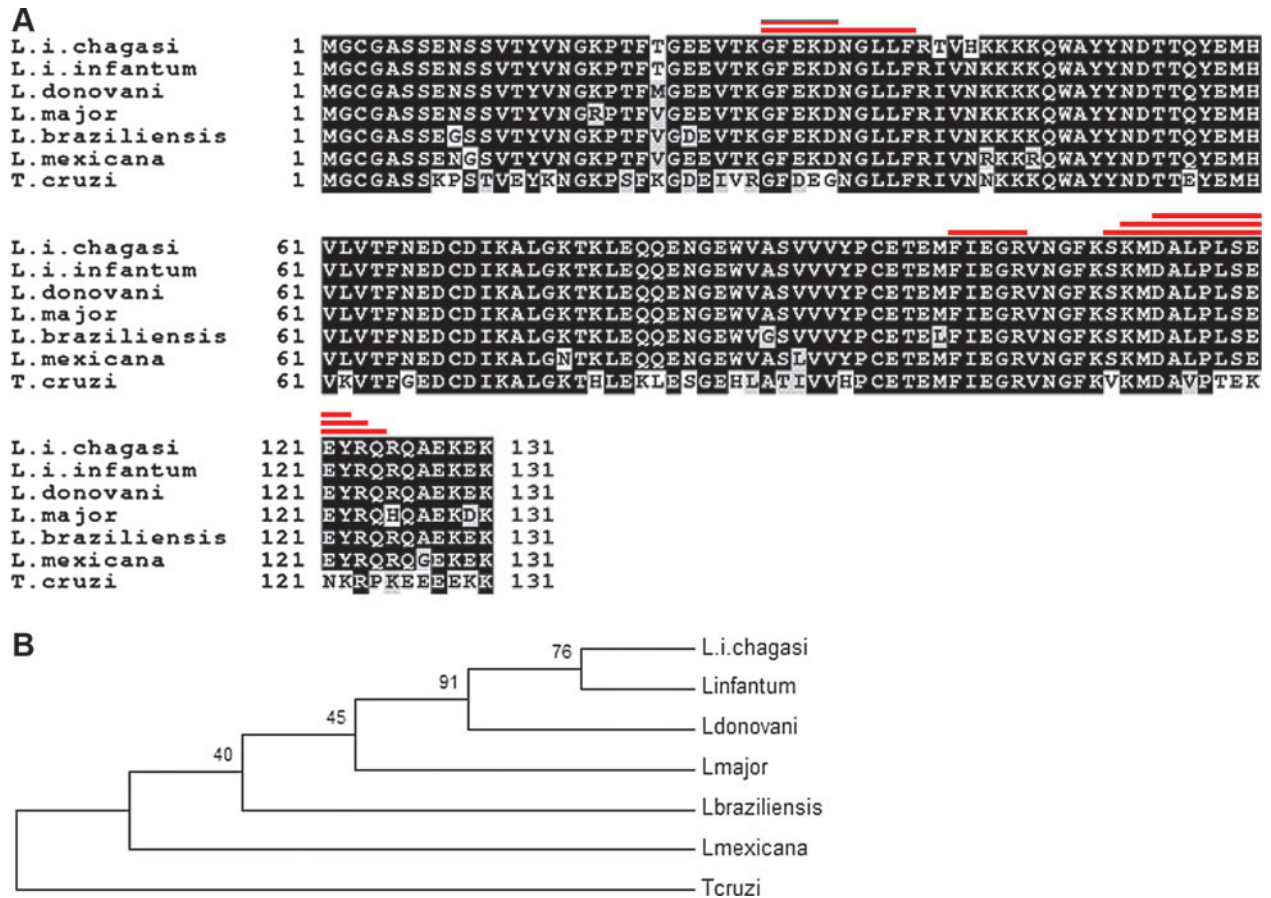


FIG. 1. Alignment of various *Leishmania* species and *T. cruzi* FLAG1/SMP1 sequences. (A) Alignment of *L. i. chagasi*, *L. infantum* (XP_001465265.1), *L. donovani* (XP_003860476.1), *L. major* (AAV59017.1), *L. braziliensis* (XP_003723102.1), *L. mexicana* (CBZ26701.1), and *T. cruzi* (XP_806365.1) FLAG1/SMP1-deduced protein sequences. The red lines above the aligned sequences show the position of peptides from Table 1. (B) Phylogenetic tree of the different trypanosomatid FLAG1/SMP1 proteins.

L. pifanoi presented a significantly lower expression when compared to promastigote forms (Fig. 2A).

There was no significant difference in *FLAG1/SMP1* mRNA expression between promastigote and metacyclic forms of the parasites, although *L. i. chagasi* and *L. major* metacyclics presented a tendency toward lower expression (Fig. 2B, C).

Detection of FLAG1/SMP1 in different Leishmania species by western blot and immunofluorescence

The presence and localization of FLAG1/SMP1 was investigated by western blot and indirect immunofluorescence assays, using the anti-FLAG1/SMP1 monoclonal antibody. FLAG1/SMP1 is expressed in *L. i. chagasi*, *L. pifanoi*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. mexicana*, and *L. donovani* (Fig. 3A) and is localized along the entire length of the flagellum in all species investigated, namely *L. amazonensis*, *L. i. chagasi*, and *L. pifanoi* (Fig. 3B).

Attachment/infection inhibition experiments

In both *ex vivo* and *in vivo* attachment/infection inhibition assays using the pair *L. longipalpis* and *L. i. chagasi*, no effect of the antibody was seen on the adhesion/infection process (Fig. 4C, D). Similar results were obtained using *F*₁

L. longipalpis (from the Lapinha Cave) as well as its counterpart maintained in laboratory colonies for many generations (LLLP).

However, *ex vivo* and *in vivo* attachment/infection inhibition experiments performed with *P. papatasi* and *L. major* showed a different outline. There was a significant decrease in the number of parasites attached or infected insects when they were pretreated with anti-FLAG1/SMP1 monoclonal antibody (Fig. 4A, B).

Discussion

It is widely accepted that a close interaction of the parasite *Leishmania* to the gut of the sand fly vector, as first seen by Killick-Kendrick et al. (1974a, b), is fundamental for a successful infection. It is also believed that the flagellum is involved in such interactions with a role in the adhesion, both through hemidesmosomes formation with the ectodermic cuticle of the gut (Walters et al. 1989) and through the flagellum insertion between microvilli of the midgut (Molyneux 1977, Walters et al. 1989). Interestingly, promastigotes move anteriorly using the flagellum; thus, as parasites migrate from the midgut toward the anterior gut parts of the sand fly during metacyclogenesis, the salient hypothesis that the

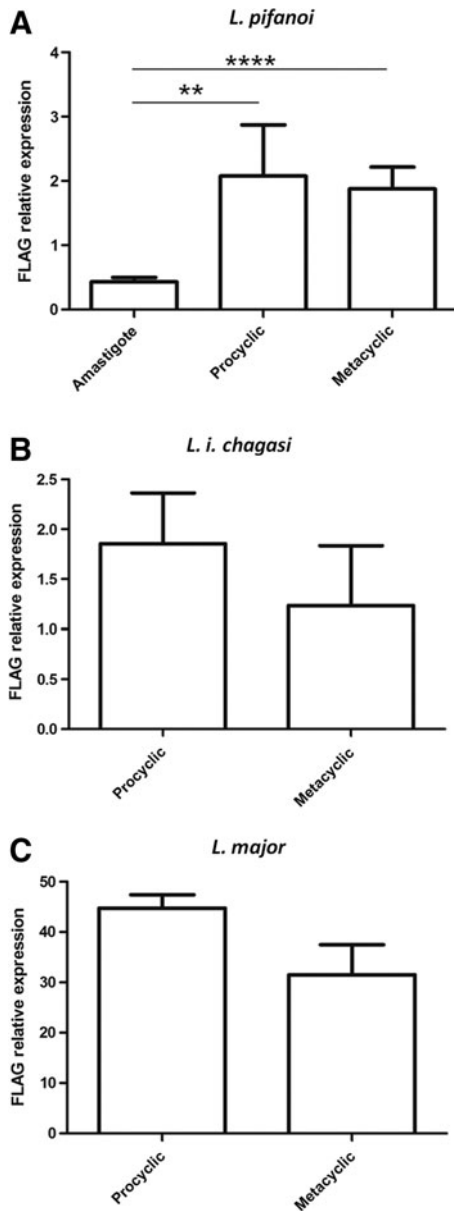


FIG. 2. FLAG1/SMP1 relative expression in developmental forms of *Leishmania*. The expression of FLAG1/SMP1 in procyclic, metacyclic and amastigotes forms of *L. pifanoi* (A), *L. i. chagasi* (B), and *L. major* (C) was determined by qPCR. (***) p less than sign 0.0001; (*) $p < 0.001$.

flagellum touches, senses, and transduces signals is very appealing. These assumptions were reinforced when Cu villier et al. (2003) demonstrated that *L. amazonensis* overexpressing the ADP-ribosylation factor-like protein 3A (LdARL-3A) lacked a flagellum and was incapable of developing in *L. longipalpis*. In contrast, more recent work indicated that a flagellum-less *L. braziliensis* isolated from a patient was capable of infecting this same vector (Zauli et al. 2012). These apparently contradicting results suggest a possibly complex interplay of different components during the *Leishmania*-sand fly interaction and need to be investigated further.

A potential alternative candidate for such interaction was identified several years ago by some of us following the de-

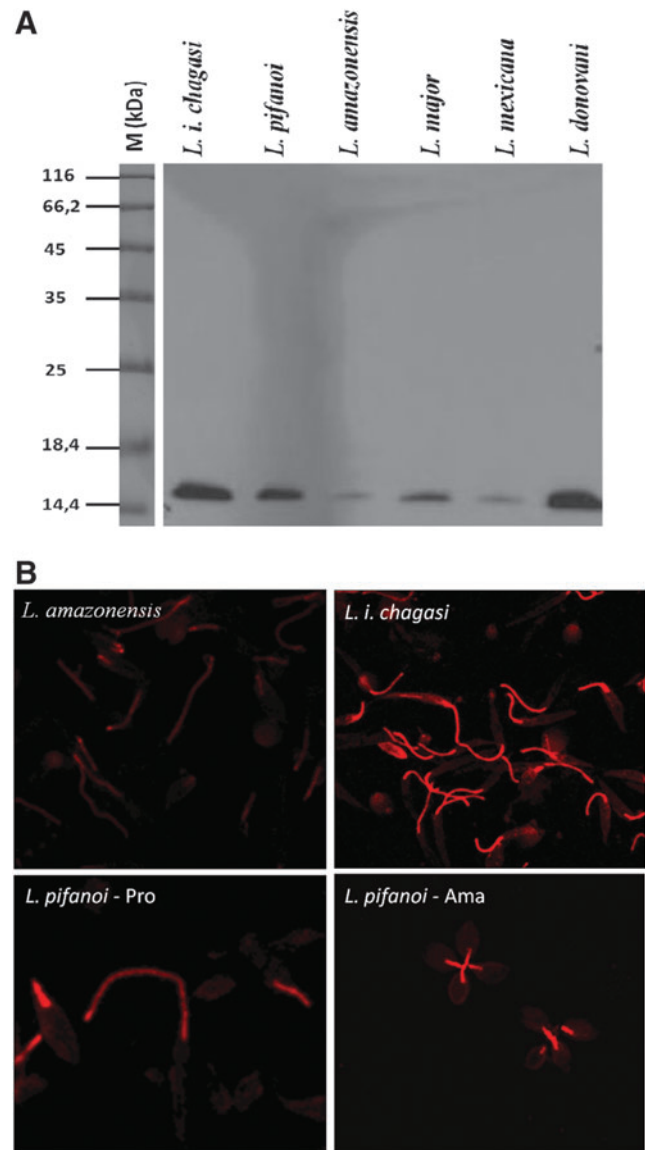


FIG. 3. Presence of FLAG1/SMP1 in different *Leishmania* species. (A) Western blot of parasite total protein extracts. (B) Indirect immunofluorescence using anti-FLAG1/SMP1 antibody.

velopment of an anti-flagellum monoclonal antibody (Ismach et al 1989) shown to block adhesion of *L. panamensis* flagella to *P. papatasi* midguts (Warburg et al. 1989). This antibody recognizes a protein called FLAG1 (Rojas 1997) which was independently characterized by another group and named SMP-1. Tull et al. (2004) demonstrated that SMP-1 is myristoylated and palmitoylated, and that these fatty acids are responsible for the flagellar location of the protein. SMP-1 was also shown to stabilize the flagellar membrane, and it is required for flagellar elongation and function. Deletion of the genes encoding SMP-1 led to the production of short flagella and defects in motility (Tull et al. 2009).

We were especially interested in the preliminary results indicating a function of this protein in attachment of parasites to the sand fly gut (Warburg et al. 1989). LPG has been clearly demonstrated to be critical in *Leishmania* binding to the so-

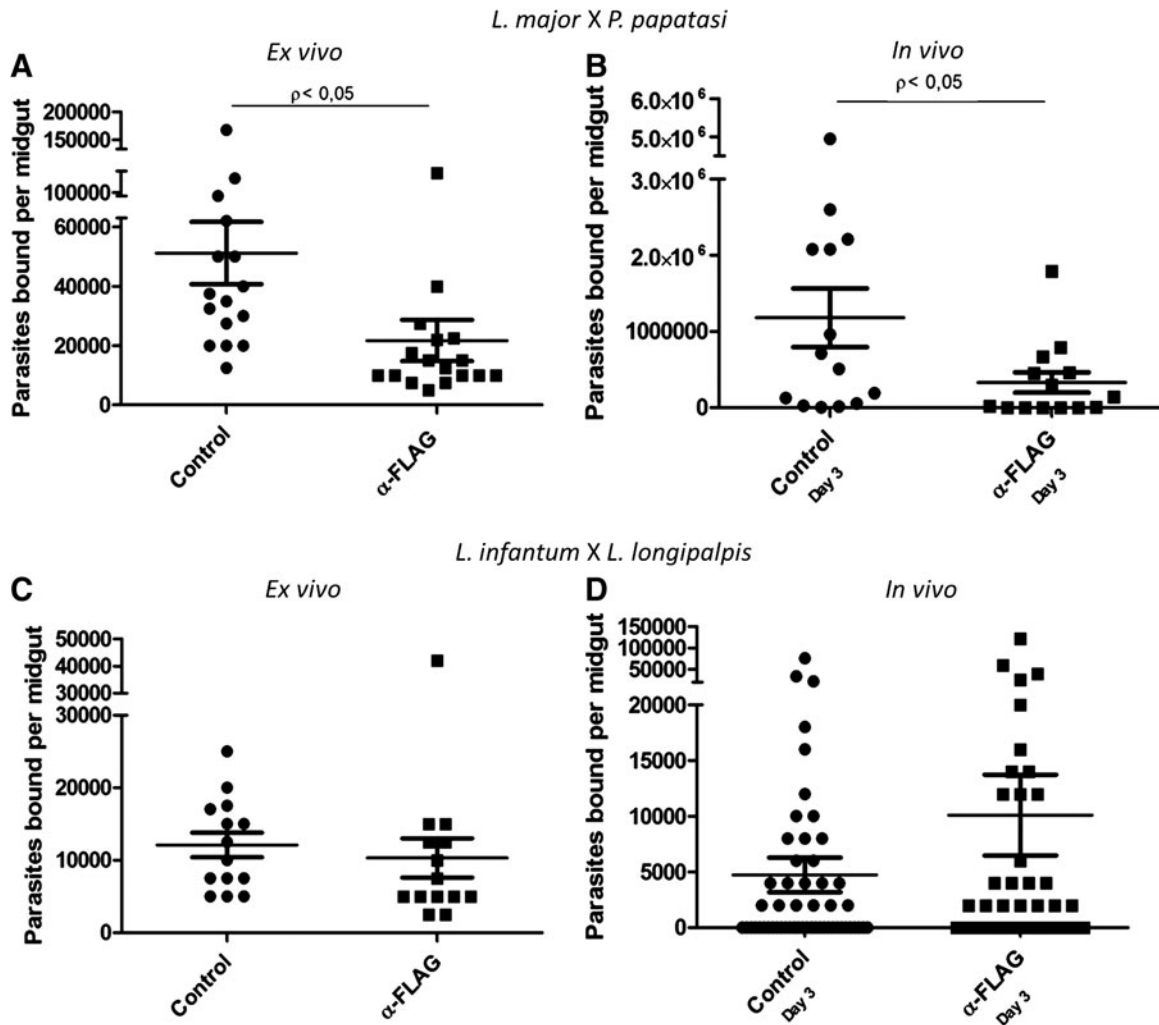


FIG. 4. Effect of anti-FLAG1/SMP1 antibody on parasite binding to the midgut and sand fly infection. Attachment of *L. major* to *P. papatasi* midgut epithelia *ex vivo* (A) and infection *in vivo* (B) in the presence or absence of anti-FLAG1/SMP1 antibody were investigated. Attachment of *L. infantum* to *L. longipalpis* midgut epithelia *ex vivo* (C) and sand fly *Leishmania* infection *in vivo* (D) in the presence or absence of anti-FLAG1/SMP1 antibody were investigated in the presence or absence of anti-FLAG1/SMP1 antibody. Each dot in the graphs represents one insect; the horizontal line indicates the mean, and the whisker plots represent the standard deviation.

called restrictive vectors (Sacks and Kamhawi 2001). However, in permissive vectors, molecules responsible for such binding remain elusive, in spite of the indication that the level of glycosylation of midgut molecules potentially is related to this binding (Myskova et al. 2007). Hence, we initially investigated the role of FLAG1/SMP1 in the attachment of *Leishmania* to *L. longipalpis*. Our results, however, did not support a role for this flagellar protein in attachment in this *Leishmania*–sand fly pair. On the other hand, our results suggest that FLAG1/SMP1 is involved in the binding of *L. major* to the restrictive vector *P. papatasi*. The fact that *L. major* LPG mutants failed to infect *P. papatasi* indicates that FLAG1/SMP1 *per se* is not sufficient to allow survival of the parasite in this vector. LPG covers the entire surface of the parasite whereas FLAG1/SMP1 is localized to the flagellum. The initial interaction of the parasite with the gut occurs by the flagellum, and classical depictions of this interaction show this organelle is deeply embedded into the gut microvilli (Killick-Kendrick et al. 1974a, b). We hypothesize that this initial interaction through the flagellum, via FLAG1/

SMP1, may be essential for further and possibly stronger interaction through the LPG molecules.

FLAG1/SMP1 was found to be a well-conserved protein present in all *Leishmania* investigated so far. By immunofluorescence, the anti-FLAG1/SMP1 monoclonal antibody reacted with the flagellum of *L. braziliensis*, *L. i. chagasi*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, and *L. pifanoi* (Córdova-Rojas 1998, Tull et al. 2010; our results). Western blots of *L. amazonensis*, *L. i. chagasi*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, and *L. pifanoi* using the anti-FLAG1/SMP1 antibody produced the expected band of approximately 15 kD. Differences in intensity observed both in the immunofluorescence and western blots may be reflective of the abundance of protein present in different parasites or due to differences in epitope recognition of the different FLAG1/SMP1 proteins by the antibody. Expression of the FLAG1/SMP1 gene was compared among different developmental forms of some parasite species. As expected, there was lower mRNA expression in axenic amastigotes of

L. pifanoi and a slight but nonsignificant decreased expression in metacyclic versus procyclic forms of *L. pifanoi*, *L. i. chagasi*, and *L. major*. When the FLAG1/SMP1 sequences available in the database were compared, a high degree of homology between the various sequences was evident, suggesting a strong functional conservation. It is interesting to speculate how such a conserved protein might have a strikingly different function in vector–parasite interactions. This might be due to the small sequence differences observed among *Leishmania* species, although these do not seem to cause big structural changes in the molecule, as can be seen in Figure 1.

Conclusions

We have shown that FLAG1/SMP1 is involved in the attachment of *Leishmania* to the strict vector *P. papatasi* and not to the permissive vector *L. longipalpis*. We are currently attempting to identify molecule(s) in the restrictive *P. papatasi* sand fly that are able to interact with FLAG1/SMP1. We predict that such a molecule will be present in significantly greater concentrations in this fly in comparison to *L. longipalpis*, or altogether absent in the latter.

Acknowledgment

We are grateful to Drs. Gregg N. Milligan and Peter W. Mason from the University of Texas Medical Branch for the production of Anti-FLAG1 monoclonal antibody. This work was supported by the National Council for Research (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), PAPES-Fiocruz.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Borovsky DP, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1987; 1:235–242.
- Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, et al. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004; 72:7140–7146.
- Córdova-Rojas, JL. Biological, biochemical and molecular characterization of Flag-1, a *Leishmania* membrane-associated flagellar protein. PhD Thesis, Yale University, 1998.
- Cuvillier A, Miranda JC, Ambit A, Barral A, et al. Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol* 2003; 5:717–728.
- Diaz-Albiter H, Sant’Anna MR, Genta FA, Dillon RJ. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 2012; 287:23995–24003.
- Dillon RJ, Lane RP. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol Res* 1993; 79:492–496.
- Ismach R, Cianci CML, Caulfield JP, Lange PJ, et al. Flagellar membrane and paraxial rod proteins of *Leishmania*: Characterization employing monoclonal antibodies. *J Protozool* 1989; 36:617–624.
- Jecna L, Dostalova A, Wilson R, Seblova V. The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology* 2013; 140:1026–1032.
- Jirikowski G. Cyanogen bromide cleavage of methionine residues as a control method for enkephalin immunocytochemistry. *Histochemistry* 1985; 83:93–95.
- Jochim RC, Teixeira CR, Laughinghouse A, Mu J, et al. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: Comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *L. i. chagasi*-infected sand flies. *BMC Genomics* 2008; 9:15.
- Kamahawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, et al. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 2004;119: 329–341.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Entomol* 1990; 4:1–24.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp* 1991; 66:71–74.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford, RW. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974a; 68:269.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1974b; 187:409–419.
- Lee L, Forstner G. Mapping of proteolytic and cyanogen bromide peptides from subunits of intestinal maltase-glucoamylase: Evidence for significant homology. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63:257–262.
- Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262:10035–10038.
- Molyneux DH. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 1977; 15:1–82.
- Myskova J, Svobodova M, Beverley S, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* 2007; 9:317–324.
- O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250:4007–4021.
- Pan AA. *Leishmania mexicana*: Serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp Parasitol* 1984; 58: 72–80.
- Pereira NM, de Souza W, Machado RD, de Castro FT. Isolation and properties of flagella of trypanosomatids. *J Protozool* 1977; 24:511–514.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time qPCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
- Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigao-Farias JR, et al. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics* 2009; 282:307–317.
- Ramalho-Ortigao M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: Comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC Genomics* 2007; 8:300.
- Ramalho-Ortigao M, Saraiva EM, Traub-Csekö YM. Sand fly-*Leishmania* interactions: Long relationships are not necessarily easy. *Open Parasitol J* 2010; 4:195–204.

- Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, et al. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol* 2008; 10:1363–1372.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55:453–483.
- Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1995; 181:685–697.
- Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:406–411.
- Schlein Y, Jacobson RL. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology* 1998; 117:467–473.
- Schlein Y, Warburg A, Schnur LF, Shlomai J. Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* dependent on differentially induced digestion. *Acta Trop* 1983; 40:65–70.
- Schlein Y, Jacobson R, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:9944–9948.
- Späth GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol* 2001; 99:97–103.
- Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, et al. *Leishmania major* Svárovská: A Glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e580.
- Telleria EL, de Araújo AP, Secundino, NF, d'Avila-Levy CM, et al. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*—expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS One* 2010; 5:e10697.
- Telleria EL, Sant'Anna MR, Ortigão-Farias JR, Pitaluga AN, et al. Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 2012; 287:12985–12993.
- Towbin H, Staehelin T, Gordo J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350–4354.
- Tull D, Vince JE, Callaghan JM, Naderer T, et al. SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in *Leishmania*. *Mol Biol Cell* 2004; 11:4775–4786.
- Tull D, Naderer T, Spurck T, Mertens HD, et al. Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *J Cell Sci* 2010; 123:544–554.
- Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: Specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol* 2007; 23:91–92.
- Walters LL, Modi GH, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41:295–317.
- Warburg A, Tesh RB, McMahon-Pratt D. Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sandfly midgut epithelium. *J Protozool* 1989; 36:613–617.
- Yao C, Chen Y, Sudan B, Donelson JE, et al. *Leishmania chagasi*: Homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model. *Exp Parasitol* 2008; 118:129–133.
- Zauli RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Moura AS, et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. *Parasit Vectors* 2012; 5:11.

Address correspondence to:
Yara Maria Traub-Csekö
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
Av. Brasil 4365
21040-900, Rio de Janeiro
Brazil

E-mail: ytraub@ioc.fiocruz.br