MARIANA HAYASHI GARCIA

**EFEITO DOS COMPONENTES SALIVARES DE
Aedes aegypti EM INFECÇÕES POR PARASITOS DO
GÊNERO *Leishmania***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

MARIANA HAYASHI GARCIA

**EFEITO DOS COMPONENTES SALIVARES DE
Aedes aegypti EM INFECÇÕES POR PARASITOS DO
GÊNERO *Leishmania***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador:
Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Co-orientador:
Mauro Javier Cortez Veliz

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Hayashi Garcia, Mariana
Efeito dos componentes salivares de *Aedes aegypti* em infecções por parasitos do gênero *Leishmania* / Mariana Hayashi Garcia; orientador Anderson de Sá Nunes; coorientador Mauro Javier Cortez Veliz. -- São Paulo, 2017.
81 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. 3. Extrato de glândula salivar. 4. Macrófagos. 5. Imunomodulação. I. de Sá Nunes, Anderson, orientador. II. Javier Cortez Veliz, Mauro, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Hayashi Garcia

Titulo da Dissertação/Tese: Efeitos dos componentes salivares de *Aedes aegypti* em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Efeito dos componentes salivares de Aedes aegypti em infecções por parasitos do gênero Leishmania*", registrada sob nº 048, nas fls. 32, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 06 de maio de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da **Lei Federal nº 11.794**, o Dr. (Dra.) Anderson de Sá Nunes (Investigador Principal) e os membros da equipe Mariana Hayashi Garcia, Bruna Bizzarro, Natália Soares Ferreira, Pesquisador colaborador Mauro Javier Cortez Veliz. Esta licença de uso de animais expira em 06 / 05 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP **até o último dia de validade da atual proposta**. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal *Effect of salivary components from Aedes aegypti in infections due to Leishmania genus parasites*, registered as Number 048, in pages 32 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 05/06/2015.

Under this license, Anderson de Sá Nunes (Principal Investigator) and team members Mariana Hayashi Garcia, Bruna Bizzarro, Natália Soares Ferreira, Pesquisador colaborador Mauro Javier Cortez Veliz are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the **Brazilian Federal Law nº 11.794**.

This license expires in 05 / 06 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 06 de maio de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Paulo e Marly, pelo amor e apoio
incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, Prof. Anderson de Sá Nunes, pelo privilégio de poder fazer parte de seu laboratório e por ter dividido comigo seus conhecimentos durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço ao Prof. Mauro Cortez pela co-orientação neste trabalho, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos e também por todos os seus ensinamentos.

À todos os professores dos Departamentos de Parasitologia e de Imunologia do ICB/USP e também da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pelas aulas ministradas durante o meu curso de mestrado, as quais foram essenciais para o meu desenvolvimento intelectual.

À Profa. Beatriz Stolf do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, e aos doutores Luciano Filgueiras e Maria Fernanda Galletti pelas discussões, sugestões e críticas construtivas durante o meu exame de qualificação.

À Profa. Margareth de Lara Capurro do Departamento de Parasitologia do ICB/USP pelos ensinamentos em entomologia, pelas orientações durante o estágio PAE, e por gentilmente nos ceder os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* para que pudéssemos realizar nossos experimentos.

Às técnicas Ediane e Isabel, do laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados, por prepararem semanalmente os mosquitos que usamos em nossos experimentos.

Aos funcionários dos biotérios dos Departamentos de Imunologia e de Parasitologia, cujos trabalhos foram essenciais para a realização deste estudo.

À secretária Silvia do Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, que sempre esteve solícita e disposta a nos ajudar e a resolver questões burocráticas.

À todos os membros do Laboratório de Imunologia Experimental: Bruna, Eliane, Josiane, Leila, Maressa, Michele e Priscila, pela amizade e companhia diária.

À nossa técnica Sandra, por toda a ajuda, seja na preparação de materiais, ou na coleta de glândulas. Sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Imunobiologia de Leishmania: Ismael, Lina e Natália, que sem a ajuda não seria possível a realização deste trabalho.

À FAPESP, e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por último, mas não menos importante, à minha família, por todo amor e apoio.

Obrigada a todos!

*“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que a fez tão importante.”*

Antoine de Saint-Exupéry

**Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2015/12703-1)**

RESUMO

GARCIA, M. H. Efeito dos componentes salivares de *Aedes aegypti* em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são considerados importantes vetores de patógenos causadores de doenças como dengue, febre amarela, febre Chikungunya e Zika, estando amplamente distribuídos em todo território brasileiro. As fêmeas desses insetos necessitam realizar o repasto sanguíneo a fim de adquirirem nutrientes para a maturação de seus ovários e desenvolvimento dos ovos. Neste contexto, a saliva possui papel de fundamental importância, representando o elo entre o artrópode hematófago, seu hospedeiro vertebrado e o potencial patógeno a ser transmitido. Nessa saliva podemos encontrar um coquetel farmacológico com diversas atividades biológicas, com a presença de peptídeos antimicrobianos e uma série de moléculas com funções imunomoduladoras sobre as células do hospedeiro vertebrado, como os linfócitos, mastócitos e macrófagos. Os macrófagos estão entre as células residentes da pele que entram em contato com a saliva durante o repasto sanguíneo. Também estão entre as principais células de mamífero parasitadas por *Leishmania*, estando envolvidos nos mecanismos efetores da resposta contra este protozoário. Com base nessas premissas, nossa hipótese de trabalho é de que os componentes salivares de *A. aegypti* possam ser capazes de alterar a interação *Leishmania*-hospedeiro *in vivo* e/ou *in vitro*. Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar se o extrato de glândula salivar (EGS) de *A. aegypti* possui: 1) atividade direta sobre o parasita; 2) capacidade de afetar o curso da infecção experimental com parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos; 3) papel na interação *Leishmania*/macrófago em modelo murino. Nossos resultados mostram que o EGS de *A. aegypti* não afeta a viabilidade ou o metabolismo dos parasitos, mesmo em altas concentrações. Por outro lado, a presença de EGS de *A. aegypti* no inóculo com *L. (L.) amazonensis* é capaz de induzir uma infecção mais grave *in vivo*, com maior aumento do tamanho da lesão nas primeiras semanas de infecção, quando comparado a animais infectados na ausência do EGS. Também observamos uma modulação dos parâmetros imunológicos envolvidos na proteção contra a doença. Os ensaios *in vitro* mostram que a pré-incubação de macrófagos com EGS é capaz de provocar aumento no número de parasitos por célula após 1 hora de infecção. O fenótipo de maior susceptibilidade à infecção pelo macrófago após incubação com EGS não está diretamente relacionado ao processo de fagocitose dessa célula. Entretanto, observamos que células pré-incubadas com EGS apresentaram um número maior de parasitos aderidos à sua membrana, sugerindo que o EGS de *A. aegypti* pode modular a expressão de algum receptor na superfície do macrófago provocando aumento da adesão parasitária. Em conjunto nossos resultados sugerem fortemente que o EGS de *A. aegypti* é capaz de aumentar a infecção por *Leishmania*, possivelmente por ação em macrófagos. O mecanismo preciso dessa modulação e a(s) molécula(s) salivar(es) potencialmente envolvida(s) nesse fenômeno ainda precisa(m) ser investigada(s).

Palavras chave: *Aedes aegypti*. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. extrato de glândula salivar. macrófagos. imunomodulação.

ABSTRACT

GARCIA, M. H. **Effect of *Aedes aegypti* salivary components in the infection by parasites of *Leishmania* genus.** 2017. 79 f. Master Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Aedes aegypti mosquitoes are considered important vectors of pathogens that cause diseases such as dengue fever, yellow fever, Chikungunya fever and Zika, being widespread to the whole Brazilian territory. Females of this species are required to blood feed in order to acquire the nutrients for ovary maturation and egg development. In this context, their saliva plays an essential role, representing the link between the hematophagous arthropod, its vertebrate host and the potential pathogen transmitted. This saliva represents a pharmacological cocktail with several biological activities, with the presence of antimicrobial peptides and a number of molecules with immunomodulatory properties on host cells, such as lymphocytes, mast cells and macrophages. Macrophages are among the resident skin cells to enter into contact with saliva during the blood meal. They are also the major mammalian cells parasitized by *Leishmania*, and are involved in the effector mechanisms against the protozoa. Based on these premises, our work hypothesis is that the salivary components of *A. aegypti* are capable of altering the *Leishmania*-host interaction *in vivo* and/or *in vitro*. Thus, the aim of the present work was to evaluate whether *A. aegypti* salivary gland extract (SGE) has: 1) direct activity on the parasites; 2) the ability to affect the course of experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasites in mice; 3) a role on the *Leishmania*/macrophage interaction in a murine model. Our results show that the *A. aegypti* SGE does not affect the parasites' viability or metabolism, even at high concentrations. On the other hand, the presence of *A. aegypti* SGE in the *L. (L.) amazonensis* inoculum is able to induce a more severe infection *in vivo*, with increased lesion size in the first weeks of infection, when compared to animals infected in the absence of SGE. We also observed a modulation of the immunological parameters involved in the protection against the disease. The *in vitro* assays show that the pre-incubation of macrophages with SGE is able to increase the number of parasites per cell after 1 hour of infection. The higher susceptibility phenotype to infection after macrophage incubation with SGE is not related to the phagocytosis process by this cell. However, we observed that cells preincubated with SGE had a higher number of parasites bound to the membrane, suggesting that the *A. aegypti* SGE can modulate the expression of some receptor on the surface of the macrophage causing an augment of parasite adhesion. Taken together, these results strongly suggest that the *A. aegypti* SGE is able to increase *Leishmania* infection, possibly by acting on macrophages. The precise mechanism of this modulation and the salivary molecule(s) potentially involved in the phenomenon still need to be investigated.

Keywords: *Aedes aegypti*. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. salivary gland extract. macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estratégia de análise utilizada para células de linfonodo poplíteo e de material derivado da lesão, dos ensaios de infecção <i>in vivo</i>	38
Figura 2	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na viabilidade de <i>L. (L.) amazonensis</i> : incorporação de iodeto propídeo (IP).....	42
Figura 3	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na viabilidade de <i>L. (L.) amazonensis</i> : avaliação do metabolismo.....	43
Figura 4	Infecção <i>in vivo</i> : efeito do EGS de <i>Aedes aegypti</i> na infecção de <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos C57BL/6.....	46
Figura 5	Análise de parâmetros imunoparasitológicos da lesão na terceira semana da infecção de camundongos com <i>L. (L.) amazonensis</i>	47
Figura 6	Citometria de fluxo das células da lesão da pata de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ...	48
Figura 7	Citometria de fluxo das células do linfonodo poplíteo de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
Figura 8	Linfoproliferação e produção de citocinas pelas células do linfonodo poplíteo de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	50
Figura 9	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na infectividade de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos derivados de medula óssea: cinética concentração-resposta.....	52
Figura 10	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na infectividade de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos derivados de medula óssea: cinética tempo-resposta.....	53

Figura 11	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na infecção de macrófagos de medula óssea por de <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 12	Porcentagem de parasitos internalizados em macrófagos derivados de medula óssea previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose.....	57
Figura 13	Efeito do EGS de <i>A. aegypti</i> na adesão de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos: ELISA de ligação.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CCR	Receptor das quimiocinas
CD	“Cluster of Differentiation”
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
Con A	Concanavalina A
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CR3, CR1	Receptor do complemento 3, 1
D.O.	Densidade ótica
EGS	Extrato da glândula salivar
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IP	Iodeto de propídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Salina tamponada com tris
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Aedes aegypti</i> e sua saliva	18
1.2 Leishmaniose	21
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais.....	29
3.2 Preparo do Extrato de Glândula Salivar (EGS)	29
3.3 Macrófagos	29
3.4 Preparo de <i>L. (L.) amazonensis</i> e de seus antígenos totais	30
3.5 Infecção <i>in vivo</i> e quantificação dos parasitas	30
3.6 Preparação dos linfonodos poplíteos e linfoproliferação	31
3.7 Ensaios de fagocitose.....	32
3.8 Ensaio de ELISA de ligação	33
3.9 Efeito direto do EGS na viabilidade de <i>Leishmania</i>	34
3.9.1 Cinética de incorporação de iodeto de propídeo	34
3.9.2 Avaliação do metabolismo do parasito: ensaio com resazurina.....	34
3.10 Quantificação de citocinas em amostras biológicas	35
3.11 Produção de Óxido Nítrico	36
3.12 Citometria de fluxo	36
3.13 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Efeito direto do EGS na viabilidade de <i>L. (L.) amazonensis</i>	40
4.2 Infecção <i>in vivo</i>	43
4.3 Efeito do EGS na infecção de macrófagos por <i>Leishmania</i>	50

4.4 Ensaio de ELISA de ligação	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti* e sua saliva

Artrópodes hematófagos são potencialmente vetores biológicos de diversos patógenos para os seres humanos e outros animais (SCHOELER; WIKEL, 2001). Neste contexto, encontramos na família Culicidae as mais importantes espécies hematófagas dentre todos os Arthropoda, com cerca de 3552 espécies de culicídeos descritas no mundo todo até o momento (HARBACH, 2016). Apesar dos mosquitos pertencentes a essa família serem considerados cosmopolitas, são poucas as espécies responsáveis pela transmissão de patógenos aos seres humanos (REITER, 2001). Assim, podemos destacar três gêneros dessa família que possuem maior relevância epidemiológica, uma vez que ocorrem com maior frequência em ambientes antrópicos: *Anopheles*, responsável pela transmissão de protozoários causadores da malária; *Culex*, responsável pela transmissão de filarídeos causadores da filariose bancroftiana e de vírus causadores de encefalites, e por último o gênero *Aedes*, responsável pela transmissão dos arbovírus causadores da dengue, febre amarela, febre Chikungunya e Zika (CAMPOS et al., 2015; GUEDES, 2012). Dentro do gênero *Aedes*, a espécie *Aedes aegypti* é apontada como um dos principais vetores de doenças, as quais estão relacionadas a altas taxas de morbidade da população humana e a um número significativo de mortes, representando assim um grave problema saúde pública no país (BLACK et al., 2002; BRAGA; VALLE, 2007). De acordo com o Ministério da Saúde, somente no primeiro semestre de 2016 foram registrados mais de um milhão de prováveis casos de dengue, mais de 122 mil casos da febre Chikungunya e mais de 161 mil casos de Zika em todo território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b). Além disso, somente no ano de 2015 foram registrados quase 3 mil casos de microcefalia relacionados ao vírus da Zika (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

A. aegypti é uma espécie de mosquito originária do Egito, e que foi introduzida no Brasil a partir da África por meio da colonização e dos navios negreiros, mantendo seu ciclo por meio de criadouros formados por acúmulos de água nessas embarcações (GUBLER, 1997). Para que possam manter o seu ciclo, as fêmeas desses insetos necessitam realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado a fim de adquirirem nutrientes para a maturação de seus ovários (REITER, 2001). E para a realização efetiva de sua alimentação, estas fêmeas precisam ser capazes de romper a barreira física da pele, e posteriormente lidar com a hemostasia e com o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Sendo assim, a saliva de *A. aegypti* apresenta-se como elemento fundamental de interação entre o mosquito, seu hospedeiro vertebrado e os potenciais patógenos a serem transmitidos

(FRANCISCHETTI et al., 2009; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). Uma série de componentes com atividades anti-hemostáticas foi descrita até o momento na saliva de *A. aegypti*, sendo classificadas em três grandes categorias: anti-agregante de plaquetas, anticoagulante e vasodilatadora. Por exemplo, a família de proteínas D7 é a mais abundantemente secretada pelas glândulas salivares dos mosquitos e atua como um fator anti-hemostático, antagonizando a vasoconstrição e a agregação de plaquetas; em *A. aegypti*, membros dessa família de proteínas foram identificados como tendo alta afinidade de ligação para serotonina (CALVO et al, 2006). Da mesma forma, a apyrase descrita na saliva de *A. aegypti* também é capaz de levar a inibição da agregação plaquetária, mas por meio da hidrólise de ATP e ADP (RIBEIRO et al., 1984). Um membro da família de inibidores de serino proteases (serpinas) encontrado no extrato de glândula salivar (EGS) de *A. aegypti* é capaz de atuar no fator Xa, promovendo atividade anticoagulante (STARK; JAMES, 1995). Já a aegyptina, considerada um alérgeno de 30 kDa, é capaz de interagir com o colágeno e inibir a agregação plaquetária (CALVO et al., 2007). Essa proteína é capaz de reconhecer sítios específicos e interferir na ligação do colágeno com os seus três principais ligantes, a glicoproteína VI, a integrina $\alpha 1\beta 2$ e o fator de von Willebrand, e dessa forma, mediar a hemostasia primária (CALVO et al, 2007). Todas estas proteínas neutralizam os efeitos da hemostasia do hospedeiro vertebrado, sendo capazes de auxiliar o inseto em seu repasto sanguíneo, bem como facilitar a transmissão de um possível patógeno (MELO et al., 2015).

A capacidade da saliva desses insetos de modular a resposta imunológica de seu hospedeiro vertebrado também vem sendo demonstrada, podendo atuar direta ou indiretamente nos elementos do sistema imune. Um crescente número de trabalhos tem evidenciado as propriedades imunomoduladoras da saliva de *A. aegypti* em células do sistema imunológico; entretanto, poucas moléculas responsáveis por essas atividades foram identificadas até o momento (SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). Em monoculturas de mastócitos provenientes de ratos, estudo de Bissonnette e colaboradores (1993) demonstraram que o EGS de *A. aegypti* foi capaz de inibir a liberação de TNF- α , mas sem afetar a desgranulação dessas células. Além disso, o EGS desse inseto também possui efeito na proliferação *in vitro* de linfócitos de camundongos (BIZZARRO et al., 2013; CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). Neste contexto, um estudo realizado por nosso grupo demonstrou que o EGS de *A. aegypti* induz apoptose de linfócitos *naïve* por mecanismos que envolvem a clivagem de pró-caspase-3 e de pró-caspase-8, enquanto que células de memória são resistentes a essa

atividade citotóxica (BIZZARRO et al., 2013). Já para macrófagos e células dendríticas, ainda são escassos os estudos sobre suas interações com os componentes salivares de *A. aegypti*. No caso das células dendríticas, um estudo de nosso grupo mostrou que o EGS do mosquito não afetou sua diferenciação, maturação ou função *in vitro*, em modelo murino (BIZZARRO et al., 2013). Por outro lado, em macrófagos peritoneais residentes de camundongos C3H/HeJ, o EGS de *A. aegypti* foi capaz de diminuir de maneira significativa a expressão de IFN- β e óxido nítrico (NO), ao mesmo tempo em que aumentou a expressão de IL-10 (SCHNEIDER et al., 2010). Além disso, o estudo realizado por Wasserman (2005) mostrou redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, IL-12 e TNF- α) em uma linhagem de macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com LPS, comprovando-se assim que a saliva possui efeito modulador nessas células.

Além do papel imunomodulador descrito acima, alguns componentes da saliva de artrópodes vetores também apresentam atividades antimicrobianas (DA YU et al., 2006; GODREUIL et al., 2014; KOTSYFAKIS et al., 2006; LUPLERTLOP et al., 2011; PICHU et al., 2009; ROSSIGNOL; LUEDERS, 1986; WU et al., 2015). Estudos realizados em carrapatos demonstraram que peptídeos antimicrobianos provenientes de glândulas salivares possuem atividade antibacteriana e antifúngica (DA YU et al., 2006; LIU et al., 2008; LU et al., 2009; PICHU et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Em dípteros, Wu e colaboradores (2015) descreveram um peptídeo semelhante à cecropina, isolado de glândulas salivares de *Simulium bannaense*, com potente atividade microbicida em bactérias gram-negativas. Já o estudo realizado com o peptídeo antimicrobiano cecropina A de *Drosophila*, demonstrou que este possui não somente atividade antibacteriana, mas também antiparasitária sobre o protozoário flagelado *Leishmania (Leishmania) aethiopica* (AKUFFO et al., 1998). Para a espécie *A. aegypti*, há estudos comprovando o potencial antibacteriano e antiparasitário de peptídeos isolados de suas glândulas salivares (GODREUIL et al., 2014; LUPLERTLOP et al., 2011; ROSSIGNOL; LUEDERS, 1986). Dentre estes, destaca-se o peptídeo aedesina, isolado de glândula salivar de mosquitos infectados com o vírus causador da dengue, capaz de matar bactérias gram-negativas (GODREUIL et al., 2014). O estudo realizado por Luplertlop e colaboradores (2011) também demonstrou que um peptídeo salivar de *A. aegypti*, homólogo à cecropina (*cecropin-like*) também possui atividade antiparasitária em parasitos do gênero *Leishmania*. Desse modo, estes peptídeos podem ser considerados candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos e podem também ser utilizados como alternativa no tratamento de infecções causadas por diversos tipos de patógenos, inclusive para *Leishmania*

spp., uma vez que possuem amplo espectro de atividade, são inativos contra células de vertebrados, e possuem um modo de ação que deve restringir a seleção de cepas resistentes (BULET et al., 1999; GODREUIL et al., 2014; LACERDA et al., 2016).

1.2 Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que representa um relevante problema de saúde pública em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Atualmente é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas, responsável por cerca de 20 mil mortes ao ano em todo o mundo e 310 milhões de pessoas vivendo em situação de risco de contrair uma das variadas formas da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Além disso, de acordo com o Ministério da Saúde, somente no ano de 2014 foram registrados mais de 23 mil novos casos de leishmaniose no país, evidenciando-se assim a importância epidemiológica da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016c,d). Seu agente etiológico, considerado patogênico ao ser humano, é representado por pelo menos 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (BAÑULS et al., 2007; SIMPSON, 1987). *Leishmania* apresenta dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados ocorre por meio do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Somente 70 das 1000 espécies conhecidas de flebotomíneos foram identificadas como vetores da doença, com dois gêneros importantes: *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (KISHORE et al., 2006; MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose pode apresentar diversas formas clínicas a depender da espécie responsável pelo início da infecção e da relação parasito-hospedeiro (ALEXANDER; BRYSON, 2005). As principais formas clínicas, de acordo com a classificação de Murray et al. (2005), são:

- a) Leishmaniose cutânea (LC): caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas (geralmente) ou múltiplas;
- b) Leishmaniose mucocutânea (LMC): caracterizada por lesões ulcerosas nas mucosas que afetam as regiões naso-faríngeas;

- c) Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD): caracterizada por lesões nodulares não-ulcerosas;
- d) Leishmaniose visceral (LV): caracterizada pelas formas viscerais, onde os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides.

As formas cutâneas podem ser causadas pelas espécies de parasitos: *Leishmania* (*Leishmania*) *major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis* (ASHFORD, 2000). No Brasil, as espécies mais relevantes de *Leishmania* responsáveis pelas formas cutâneas são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (VALE; FURTADO, 2005), as espécies responsáveis pela leishmaniose visceral, também conhecida por Calazar são *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum chagasi* (CHAPPUIS et al., 2007; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Esses parasitos possuem um ciclo de vida digenético, com alternância de dois estágios distintos do parasito (HANDMAN; BULLEN, 2002; KAVOOSIET et al., 2006). Após a realização do repasto sanguíneo, as formas amastigotas ingeridas transformam-se em promastigotas procíclicas dentro do sistema digestório do inseto vetor, podendo ligar-se através do flagelo à parede do intestino, garantindo a sua permanência e desenvolvimento. Aproximadamente 48 a 72 horas depois do repasto sanguíneo, estas se diferenciam nas formas promastigotas nectomonas, formas móveis flageladas capazes de romper a matriz peritrófica e alojarem-se no intestino anterior (BATES, 2007). Uma vez que tenham alcançado a válvula estomodeal, as formas promastigotas nectomonas sofrerão outro processo de diferenciação e se desenvolverão em promastigotas leptomonas, formas mais curtas do parasito responsáveis pela secreção do PSG (*promastigote secretory gel*), o qual possui um papel de fundamental importância na transmissão do patógeno (BATES, 2007). Neste mesmo local, ocorre então a diferenciação dos promastigotas procíclicos em promastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes. Quando cessa o processo de divisão celular, os promastigotas metacíclicos que se encontram na válvula estomodeal do inseto, são regurgitados e inoculados no hospedeiro mamífero pelas fêmeas dos vetores durante um novo repasto sanguíneo (BATES, 2007; TEIXEIRA et al., 2013). Após a infecção do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas vão interagir com as células residentes da pele e logo serão fagocitadas pelos macrófagos, por mecanismos dependentes de ligantes ou receptores presentes na membrana

da célula, como por exemplo, o receptor do complemento CR3 (MOSSER; EDELSON, 1985; LOCKSLEY et al., 1988). Nos macrófagos infectados, os promastigotas metacíclicos transformam-se rapidamente em formas amastigotas, que possuem formato esférico e flagelo curto e invaginado, sendo capazes de multiplicar-se por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. *Leishmania* spp., assim como outros parasitos, desenvolveu mecanismos de escape para sobrevivência dentro do macrófago e dessa forma é capaz de liberar suas formas amastigotas que poderão infectar outras células ou serem ingeridas por fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (DUCLOS; DESJARDINS, 2000).

Uma vez que possuem peças bucais relativamente curtas, as fêmeas dos flebotomíneos laceram a pele e os capilares do hospedeiro vertebrado formando um coágulo subcutâneo para que, dessa forma, sejam capazes de realizarem seu repasto sanguíneo. Nesse contexto, a saliva do inseto vetor, que é inoculada no sítio da picada, possui um papel fundamental na transmissão e estabelecimento do patógeno, evitando a atuação dos elementos responsáveis pela hemostasia e reduzindo a inflamação do hospedeiro vertebrado (GOMES; OLIVEIRA, 2012; KAMHAWI, 2000). Sabe-se que a saliva do vetor contém um arsenal molecular capaz de facilitar o estabelecimento da infecção, sendo assim, muitos estudos demonstram que a infecção de *Leishmania* spp. na presença de componentes salivares de flebotomíneos em camundongos promove um desenvolvimento maior e mais exacerbado da lesão quando comparado a animais inoculados somente com o parasito (BELKAID et al., 1998; BEZERRA; TEIXEIRA, 2001; LIMA; TITUS, 1996; MBOW et al., 1998; TITUS; RIBEIRO, 1988). Os neutrófilos possuem a habilidade de responder e de fagocitar eficientemente uma vasta variedade de patógenos, sendo que na imunopatogênese de *Leishmania*, essas células são as primeiras células de defesa a migrarem para o sítio de infecção, com rápida infiltração ao redor do local da picada do flebotomíneo (PETERS et al., 2008; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Nesse sentido, Peters e colaboradores (2008) demonstraram a importância dos neutrófilos no estabelecimento e progressão da leishmaniose, tornando a infecção mais branda por meio da depleção destas células. Neste mesmo sentido, estudo realizado por Prates e colaboradores (2011) demonstrou o papel da saliva de *Lutzomyia longipalpis* nos neutrófilos, que foi capaz de aumentar a carga parasitária e de induzir apoptose nessas células. Além disso, a saliva de *L. longipalpis* também inibe a expressão de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas humanas, e afeta a capacidade de macrófagos ativados de apresentar antígenos para linfócitos T (COSTA et al., 2004; THEODOS; TITUS, 1993). Já um estudo realizado com o lisado de glândulas salivares de *Phlebotomus papatasi* em camundongos

infectados com *L. (L.) major* mostrou aumento na produção da citocina IL-4 (associado com o padrão Th2 de resposta), ao mesmo tempo em que diminuiu a produção de IFN- γ e IL-12 (associadas com o padrão Th1 de resposta). Esses dados mostram que a saliva deste vetor é capaz de interferir no desenvolvimento de uma resposta Th1, a qual está associada a resistência à leishmaniose (MBOW et al., 1998). Uma importante molécula presente na saliva de flebotomíneos é o maxadilán, que foi isolado originalmente por Lerner e colaboradores (1991) e é considerado um potente vasodilatador. Além de auxiliar no repasto sanguíneo do inseto vetor, o maxadilán também é um importante imunomodulador, sendo capaz de aumentar a produção de IL-6, IL-10 e TGF- β e de diminuir a produção de IL-12p70, TNF- α e NO em macrófagos murinos estimulados com LPS (BRODIE et al., 2007; SOARES et al., 1998). Em células dendríticas de camundongos BALB/c e C3H/HeN estimuladas com LPS, o maxadilán diminuiu a expressão de CD80 e de CCR7 e também a secreção de citocinas do tipo I (IL-12-p40, TNF- α , IFN- γ) enquanto promoveu a secreção de citocinas do tipo II (IL-6 e IL-10). Já a proliferação de linfócitos murinos foi inibida na presença de maxadilán (QURESHI et al., 1996; WHEAT et al., 2008). Assim sendo, esses estudos demonstram a importância da saliva dos flebotomíneos na imunopatogênese da leishmaniose, seja no estabelecimento, na severidade, ou na susceptibilidade da doença.

Com relação ao tratamento da leishmaniose, é preconizado no Brasil o uso de antimoniais pentavalentes (primeira linha) e de anfotericina B (segunda linha), tanto para a leishmaniose tegumentar como para a leishmaniose visceral, devendo-se levar em consideração a faixa etária, a presença de gravidez e comorbidades referentes a cada paciente (PELLISSARI et al., 2011). A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente de uso parenteral que apesar de ser o mais indicado, com taxas de cura variando em torno de 60 a 100%, apresenta inúmeros efeitos adversos como: a) elevada toxicidade podendo além de destruir o parasito, levar o paciente a óbito (MARSDEN, 1985); b) administração unicamente parenteral; c) efeitos colaterais (mialgias, artralgias, cefaléias, distúrbios gastrointestinais, alterações renais, hepáticas, pancreáticas, erupções cutâneas, dentre outras) (TIUMAN et al., 2011); d) risco de vir a acumular-se em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado (FELICETTI et al., 1974). Além disso, o mecanismo de ação dos antimoniais permanece sem sua completa elucidação, sendo que o antimônio aparentemente tem atuação na oxidação dos ácidos graxos e também na glicólise do parasito, diminuindo os níveis de adenosina trifosfato intracelular (CROFT; CROOMBS, 2003; RATH et al., 2003). Já nos casos não responsivos aos antimoniais, a droga de segunda escolha é a anfotericina B, que é

um antifúngico considerado ativo e eficaz no tratamento das leishmanioses. Entretanto, também apresenta elevada toxicidade e efeitos colaterais como tremor, febre, náuseas, vômitos, anorexia, dor de cabeça, mialgia e artralgia (BERMAN, 1988; GALIIS et al., 1990; MADDUX; BARRIERE, 1980; MOREAU et al., 1992; TIUMAN et al., 2011). É administrado por via endovenosa e uma de suas reações adversas mais significativas é a nefrotoxicidade, podendo levar à diminuição dos níveis de potássio e magnésio no organismo (RATH et al., 2003). Este medicamento atua na membrana plasmática celular, especialmente naquelas com alto conteúdo de ergosterol (BAGINSKI et al., 2005). Já a anfotericina B lipossomal apresenta baixa toxicidade, uma vez que é pouco absorvida pelos rins, sendo o tratamento realizado em menor período de tempo (MUSA et al., 2005; SOLOMON et al., 2007). Porém, seu custo bastante elevado restringe a utilização em larga escala.

Atualmente, medicamentos como o miltefosine, que é um medicamento de administração por via oral, e a paromomicina, de administração por via intramuscular, já estão em uso para o tratamento da Leishmaniose visceral na Índia, em Bangladesh e na África Oriental (JAH et al., 1999; KIMUTAI et al., 2017; MONDAL et al., 2016; RAHMAN et al., 2017; SUNDAR et al., 2007). Enquanto que outros ainda permanecem em fase de testes clínicos. Vale ressaltar que o tratamento utilizando as drogas atualmente disponíveis apresenta dificuldades como: a administração do medicamento, efeitos adversos bastante severos, longo tempo de tratamento que muitas vezes leva o paciente a abandoná-lo, e somando-se a isso, observa-se um aumento contínuo de cepas resistentes aos antimoniais e também a outros medicamentos (OUELLETTE et al., 2004; RATH et al., 2003).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conforme descrito anteriormente, a leishmaniose representa um grave problema de saúde pública, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a segunda infecção mais importante causada por protozoários, superada apenas pela malária. Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado as propriedades imunofarmacológicas do EGS de *A. aegypti* em uma plataforma de ensaios desenvolvidos em nosso laboratório e de nossos colaboradores. Em conjunto com os dados já disponíveis na literatura, sabemos que a saliva de *A. aegypti* é capaz de modular células do sistema imunológico como linfócitos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos (BISSONETTE et al., 1993; BIZZARRO et al., 2013; CROSS et al., 1994; SCHNEIDER et al., 2010; WASSERMAN et al., 2004). Além do seu efeito direto já descrito nos macrófagos (SCHNEIDER et al., 2010; WASSERMAN, 2005), destacam-se também outras atividades biológicas que incluem àquelas derivadas de seus peptídeos antimicrobianos. Assim, a nossa hipótese de trabalho é de que **os componentes salivares de *A. aegypti* poderiam afetar diretamente a interação de parasitos do gênero *Leishmania* com o hospedeiro vertebrado, mudando assim progressão da doença *in vivo* e parâmetros da infecção *in vitro***. Dessa forma, propomos como objetivo do trabalho explorar os efeitos do EGS de *A. aegypti* na viabilidade de parasitos do gênero *Leishmania*, bem como na interação parasito/macrófago *in vitro* e também seu papel na infecção em modelo experimental murino. Para isso, nossos objetivos específicos foram:

- 1) Comparar o desenvolvimento da infecção em camundongos C57BL/6 inoculados com *L. (L.) amazonensis* na presença ou ausência de EGS de *A. aegypti in vivo*;
- 2) Avaliar a atividade do EGS de *A. aegypti* na fagocitose de *L. (L.) amazonensis* por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6;
- 3) Avaliar a potencial atividade antiparasitária direta do EGS sobre *L. (L.) amazonensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou na Lei Federal no. 11.794 (Lei Arouca), no Decreto 6899 e nas Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos propostos foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/USP) e aprovados sob o no. 048, folha 32, livro 03.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com idade entre 6 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP, Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia do ICB/USP e pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Antes e após a manipulação, os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e luminosidade no Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia, sendo alimentação e água fornecidas *ad libitum*.

3.2 Preparo do extrato da glândula salivar (EGS)

Machos e fêmeas de *A. aegypti* foram mantidos no insetário do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro, onde foram alimentados e acasalados. Glândulas salivares de fêmeas de *A. aegypti* com 5-7 dias após emergência foram dissecadas em salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e transferidas para um pequeno tubo contendo 100 µL de PBS gelado estéril. Os tubos foram sonicados para liberação do material solúvel das glândulas e em seguida foram centrifugados a 14.000 *g* por 10 min a 4 °C para remoção do material particulado. O sobrenadante resultante de cada tubo, chamado extrato de glândula salivar (EGS) foi reunido e esterilizado por passagem em filtro com membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm (Millex Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda). A concentração proteica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e o material foi aliqotado e armazenado a -80 °C até o momento de uso.

3.3 Macrófagos

Macrófagos foram diferenciados a partir de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 fêmeas. Fêmures e tíbias dos camundongos foram removidos e isolados do músculo adjacente, imersos em álcool 70% por 2 minutos e mantidos em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen). As duas epífises foram cortadas e 5 mL de RPMI 1640 foram injetados no canal medular de cada osso. A suspensão de células foi centrifugada (300 g, 10 min, 4 °C) e ressuspensa (4 × 10⁶ células em um volume de 10 mL) em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Invitrogen) e 20% de sobrenadante de células L929 (meio R20). As células foram semeadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C por 4 dias na presença de 5% CO₂. No quarto dia, foi adicionado mais 10 mL de meio R20 por placa. Os macrófagos foram utilizados para ensaios de infecção após 7 dias de cultura.

3.4 Preparo de *L. (L.) amazonensis* e de seus antígenos totais

Foram utilizados parasitos da espécie *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) mantidos no laboratório do Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz, do Departamento de Parasitologia do ICB/USP e co-orientador desse projeto, por meio de repiques semanais em meio de cultura, respeitando-se o máximo de 8 passagens. As culturas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas como promastigotas a 25 °C em meio Grace (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB. As formas promastigotas totais, para inóculo, foram obtidas a partir de cultura de fase estacionária, lavadas em PBS e centrifugadas a 300 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensa em 5 mL de RPMI 1640, sendo retirada uma alíquota dos parasitos que foi diluída 20 × em tampão PBS com 10% de azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) para a contagem em câmara de Neubauer.

Para o preparo de antígenos totais, formas promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* em meio Grace foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e lavadas em PBS estéril por meio de centrifugação por 10 minutos a 300 g. O número de parasitos foi quantificado em câmara de Neubauer após diluição em paraformaldeído e a suspensão de parasitas foi então autoclavada e congelada em freezer -80 °C, para posterior uso.

3.5 Infecção *in vivo* e quantificação dos parasitas

Para a realização da infecção *in vivo*, camundongos C57BL/6 fêmeas foram divididos em grupos de 5 animais e infectados via subcutânea na pata posterior esquerda com 2×10^6 promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* em 10 μ L de PBS. Os parasitos foram diluídos da seguinte maneira: I) PBS (grupo “PBS”); II) EGS equivalente a 1 par de glândulas salivares (grupo “EGS 1”); III) EGS equivalente a 5 pares de glândulas salivares (grupo “EGS 5”); IV) EGS equivalente a 25 pares de glândulas salivares (grupo “EGS 25”). A espessura das patas foram medidas semanalmente até a 6ª semana de infecção e os valores expressos como a diferença na espessura da pata infectada (esquerda) pela pata não-infectada (direita).

Em um outro grupo de experimentos, os animais foram infectados como descrito acima e eutanasiados após 3 semanas. Os tecidos das lesões foram removidos, pesados, lavados 3 vezes com álcool 70% por 10 minutos e homogeneizados em 1 mL de PBS. Esse material foi centrifugado a 1400 g por 10 minutos e o sobrenadante livre de células foi coletado e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas, conforme descrito no item 3.10. O *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 1640 e filtrado em membrana com poros de 70 μ m. Para a realização da quantificação de parasitas, foi feita uma diluição limitante numa placa de 96 poços. A placa foi incubada por a 25 °C por 7 dias para a confirmação de promastigotas. A análise de quantificação foi realizada utilizando o programa ELIDA (ELIDA software Carl Tarswel). A quantificação dos parasitas presentes em cada lesão foi realizada em triplicata.

3.6 Preparação dos linfonodos poplíteos e linfoproliferação

Os linfonodos poplíteos dos animais infectados foram retirados em condições assépticas e colocados individualmente em tubos contendo 3 mL de meio RPMI 1640. Os órgãos foram macerados gentilmente contra membranas com poros de 40 μ m com o auxílio de um êmbolo de seringa estéril e a suspensão celular foi então centrifugada a 400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi vigorosamente homogeneizado e ressuspensionado em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 25 mM HEPES e $2,5 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol (meio completo) (Gibco Invitrogen). A contagem das células totais foi realizada por microscopia óptica em câmaras de Neubauer após diluição das amostras em solução de Turk.

Para o ensaio de proliferação de linfócitos, as células do linfonodo poplíteo da pata infectada de cada animal foram semeadas em placas de 96 poços para cultura celular na proporção de 1×10^5 células/poço em alíquotas de 100 μL . As células foram incubadas com mais 100 μL /poço de meio somente (grupo “Controle”), ou concanavalina A na concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$ (grupo “Con A”) ou o equivalente a 10^6 *L. (L.) amazonensis* inativadas por autoclavação (grupo “Antígeno”), de forma que o volume final em todos os poços foi de 200 μL . A placa foi incubada a 37 °C em tensão de 5% de CO_2 por 72 horas. Vinte e quatro horas antes do término da incubação foram adicionados 25 μL de resazurina 0,01% estéril por poço, preparada em meio completo. A resazurina é um corante de cor azul não tóxico que possui pouca fluorescência, mas que por meio de reações de redução, torna-se altamente fluorescente sendo utilizado como um indicador de oxirredução em ensaios de viabilidade celular (BIZZARRO, 2012). Assim, ao final da incubação, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro utilizando os comprimentos de onda de 570 e 600 nm e a proliferação foi avaliada pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras.

Culturas semelhantes foram realizadas com as células dos linfonodos poplíteos, mas utilizando uma suspensão de 5×10^5 células/poço em alíquotas de 100 μL . Os estímulos foram realizados da mesma maneira descrita acima, e após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante livre de células de cada poço foi coletado e armazenado a -80 °C para determinação de citocinas, conforme descrito no item 3.10.

3.7 Ensaios de fagocitose

Foram semeados 2×10^5 macrófagos derivados de medula óssea em cada poço de uma placa de 24 poços com lamínula, sendo mantidos por 24 horas em estufa a 37 °C para aderência destes na lamínula. Em seguida, o EGS de *A. aegypti* foi adicionado às culturas em diversas concentrações (1, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ – concentração final) e a cultura foi mantida em estufa *overnight* a 37 °C. Para a realização da infecção, os macrófagos foram lavados com meio e promastigotas de fase estacionária foram utilizadas na proporção 5:1 (parasito:célula), em meio RPMI contendo 10% de SFB, sendo que esta foi avaliada após 1 hora e 48 horas. Para promover a adesão dos parasitas nas células, a placa foi colocada por 15 minutos no gelo, e depois mantida em estufa a 33 °C.

Após incubação nos diferentes tempos de infecção indicados, os poços foram lavados

três vezes com PBS em temperatura ambiente e fixados com metanol 100% gelado por 5 minutos. As lamínulas contendo as células fixadas foram lavadas com PBS e tratadas com solução bloqueadora permeabilizadora (1% BSA; 0,1% azida de sódio e 0,1% saponina/TBS–solução salina tamponada com tris 1X). Para imunofluorescência, as lamínulas foram incubadas com diferentes anticorpos primários: anti-LAMP1 e anti-*Leishmania* por 2 horas, e em seguida com os respectivos anticorpos secundários (anti-IgG de rato conjugado à Alexa Fluor 568 ou anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor 488 – Thermo Scientific), respectivamente por 1 hora. Todas as amostras foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – 10 μ M) para marcar o núcleo das células/parasitos. A análise foi realizada por microscópio de fluorescência (DMI6000B AFC-Leica), sendo contadas no mínimo 300 células por lamínula. A carga parasitária foi representada pelo número de parasitos intracelulares em 100 células infectadas. Imagens representativas foram adquiridas neste microscópio com o programa *LeicaAF6000* e editadas pelo software *ImageJ*.

Em um outro grupo de experimentos, macrófagos derivados de medula óssea foram preparados como descrito acima, incubados com 40 μ g/mL de EGS e mantidos em estufa *overnight* a 37 °C. Antes da realização da infecção, os macrófagos foram lavados com meio e posteriormente pré-tratados com genisteína (Sigma-Aldrich) na concentração de 250 μ M, ou com latrunculina (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 μ M por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas e promastigotas de fase estacionária da espécie *L. (L.) amazonensis* foram utilizadas para os ensaios de infecção, na proporção 5:1 (parasito:célula), em meio RPMI contendo 10% de SFB, e a avaliação da fagocitose foi realizada após 1 hora de infecção. As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% e marcadas com anticorpos anti-*Leishmania*, DAPI e faloidina Texas-Red (Thermo Scientific). O total de parasitos foi contabilizado pela marcação DAPI, e os parasitos aderidos à membrana dos macrófagos foram avaliados pela marcação com anticorpo anti-*Leishmania*. No total, 300 células infectadas foram contadas e os gráficos de infecção foram representados como o número de parasitos em 100 macrófagos infectados. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3.8 Ensaio de ELISA de ligação

Foram semeados 5×10^4 macrófagos por poço em placas de 96 poços, mantidos por 24 horas em estufa a 37 °C para aderência destes na placa. As células foram então incubadas com

40 µg/mL de EGS e mantidos em estufa *overnight* a 37 °C. Essas células foram então lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Promastigotas de fase estacionária foram utilizadas para os ensaios de ligação, na proporção 10:1 (parasito:célula), em meio RPMI contendo 10% de SFB, seguido de 2 horas de incubação. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS e fixada com PFA 4%. Seguidos 10 minutos, a placa foi novamente lavada e bloqueada com tampão de bloqueio (PBS 1 X + SFB 10%). Após a etapa de bloqueio, as placas foram lavadas novamente e incubadas por 1 hora com o anticorpo primário anti-*Leishmania*. A seguir, as placas foram lavadas novamente e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora de incubação. Por fim, após um novo ciclo de lavagem, foi adicionada uma solução de revelação, composta por partes iguais de uma solução de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico (H₃PO₄ 1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

3.9 Efeito direto do EGS na viabilidade de *Leishmania*

3.9.1 Cinética de incorporação de iodeto de propídeo

A potencial atividade leishmanicida do EGS foi avaliada pela incorporação de iodeto de propídeo nos parasitos. Brevemente, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (3×10^6 /mL) foram incubados em microplacas de poliestireno de 96 poços, pretas com fundo claro, em solução salina (PBS) contendo 10 µg/mL de iodeto de propídeo em um volume final de 100 µL por poço. A placa foi incubada a temperatura constante de 25 °C em um leitor de placa (POLAR star Omega, BMG Labtech) e a fluorescência ($\lambda_{ex} = 490$ nm; $\lambda_{em} = 638$ nm) foi quantificada a cada 2 minutos. Após a estabilização do sinal, o EGS de *A. aegypti* foi adicionado nas concentrações finais de 1, 5, 10, 20 e 40 µg/mL. Parasitos não tratados ou incubados com o diluente (PBS) foram utilizados como controles negativos. Um grupo sem parasitas e apenas com iodeto de propídeo e PBS, recebeu também EGS na concentração de 40 µg/mL, sendo utilizado como controle da leitura. Após duas horas de avaliação, os parasitos foram lisados com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%.

3.9.2 Avaliação do metabolismo do parasito: ensaio com resazurina

A avaliação do metabolismo do parasito quando exposto ao EGS de *A. aegypti* foi realizado por meio de ensaio com rezasurina (KULSHRESTHA et al., 2013). Suspensões de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* contendo 20×10^6 , 10×10^6 , 5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 e 0.625×10^6 parasitos/mL foram preparadas em meio Grace (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 μ L por poço, em placa de 96 poços, e a seguir, foram acrescentados 25 μ L de resazurina 0,01% por poço e incubados entre 18 e 24 horas. Após esse período, a densidade óptica (D.O.) de cada poço foi medida a 570 e 600 nm e o metabolismo dos parasitos foi avaliado pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras. Com base nesses resultados, foram preparadas suspensões de promastigotas de *L. (L.) amazonenses* em meio Grace (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB e distribuídas em alíquotas de 100 μ L por poço contendo 2×10^6 parasitos, em placa de 96 poços, e expostos à diferentes concentrações de EGS (1, 5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 μ g/mL), a seguir foram acrescentados 25 μ L de resazurina 0,01% por poço e incubados entre 18 e 24 horas. Após esse período, a D.O. de cada poço foi medida conforme descrito acima.

3.10 Quantificação de citocinas em amostras biológicas

A dosagem de citocinas presentes nas diferentes amostras biológicas coletadas ao longo dos experimentos foi realizada por ELISA (do inglês “*enzyme-linked immunosorbent assay*”).

Os sobrenadantes dos homogenatos das lesões das patas, descritos no item 3.5, foram utilizados para a determinação de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- α , utilizando OptEIA ELISA Set (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, placas de 96 poços com fundo chato foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído no tampão indicado pelo fabricante para cada citocina e incubadas *overnight* à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio (PBS/SFB 10%). Após a etapa de bloqueio, as placas foram lavadas novamente 3 vezes e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o diluente somente (“branco”), com as amostras e com uma diluição seriada da curva padrão para cada citocina. Após esse período, as placas foram lavadas 6 vezes e foi adicionado o reagente de detecção que consistiu nos respectivos

anticorpos secundários conjugados com biotina e em estreptoavidina conjugada com peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, após um novo ciclo de 7 lavagens, foi adicionado uma solução de revelação da reação, composta por partes iguais de uma solução de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). Após um período que variou de 10 a 30 minutos para cada citocina, a reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico (H_3PO_4 1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram calculados a partir da curva padrão e expressos em pg/mL. Os limites de detecção foram 31,3 pg/mL (IL-1 β), 62,5 pg/mL (IL-12p70), 31,3 pg/mL (IL-10), 15,6 pg/mL (TNF- α), 15,6 pg/mL (IL-6).

Os sobrenadantes de cultura de células totais dos linfonodos poplíteos, descritos no item 3.6, foram utilizados para a determinação de IFN- γ , IL-4 e IL-10 utilizando OptEIA ELISA Set (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e de IL-17 utilizando ELISA Max (Biolegend, San Diego, CA, EUA). O ensaio foi realizado de maneira semelhante ao descrito no parágrafo anterior. Os limites de detecção foram 15,6 pg/mL (IFN- γ), 7,8 pg/mL (IL-4), 31,3 pg/mL (IL-10) e 15,6 pg/mL (IL-17).

3.11 Quantificação de Óxido Nítrico

A quantificação de óxido nítrico foi realizada indiretamente pela avaliação do nitrito (NO_2^-) presente no material coletado ao longo dos experimentos por meio de reação de Griess (SÁ-NUNES et al., 2007). Cinquenta microlitros dos homogenatos de lesão das patas foram incubados com o mesmo volume do reagente de Griess [mistura v/v de uma solução de N-1-naftiletilenodiamina diidrocloreto (NEED) 0,1% em água destilada e de uma solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%] a temperatura ambiente. A concentração de NO_2^- foi determinada usando uma curva padrão de NaNO_2 . A reação foi lida em espectrofotômetro a 554 nm e o limite de detecção do ensaio foi de 0,78 μM .

3.12 Citometria de fluxo

As células dos linfonodos poplíteos foram preparadas como descrito no item 3.6 e em seguida centrifugadas, ressuspensas em tampão PBS contendo 1% de SFB e contadas em

câmara de Neubauer. O mesmo número de células de cada animal foi transferido para tubos de polipropileno de 12 × 75 mm (BD Biosciences, San José, CA, EUA). Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-F4/80, -CD45, -CD11b, -CD11c, -Ly6G, -CD19, -CD4 e -MHC II conjugados com fluorocromos e em diluições adequadas, seguido de incubação de 30 minutos a 4 °C, protegido da luz. Após lavagem as amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II (BD Biosciences, San José, CA, EUA), do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA) e a estratégia de análise utilizada nesses experimentos é apresentada na Figura 1.

3.13 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) de cada grupo. Os grupos experimentais foram comparados com seus respectivos controles pelo teste *t* de Student ou por análise de variância (ANOVA) usando Tukey como pós-teste. A significância estatística mínima estabelecida será de $p \leq 0,05$.

Figura 1 - Estratégia de análise utilizada para células de linfonodo poplíteo e de material derivado da lesão, dos ensaios de infecção *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *L. (L.) amazonensis* na presença ou na ausência de *EGS A. aegypti* conforme explicado em Material e Métodos. (A) Seleção de células que passaram sozinhas pelo laser, chamadas de “singlets”; (B) Seleção de células CD45⁺; (C) Seleção de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e linfócitos B (CD19⁺); (D) Na população CD4⁺/CD19⁻, foram selecionadas células dendríticas (CD11c⁺) e neutrófilos (Ly6G⁺); (E) Na população CD4⁺/CD19⁻, foram selecionados macrófagos (F4/80⁺/CD11b⁺).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito direto do EGS na viabilidade de *L. (L.) amazonensis*

Uma vez que um peptídeo salivar de *A. aegypti* semelhante à cecropina foi descrito como tendo atividade anti-parasitária, iniciamos nosso estudo avaliando o possível efeito direto do EGS de *A. aegypti* na viabilidade de *L. (L.) amazonensis* de duas maneiras. Primeiramente, empregamos um ensaio já padronizado em nosso grupo usando iodeto de propídio, o qual intercala-se ao DNA de células inviáveis, uma vez que estas estão permeáveis, aumentando-se assim o sinal fluorescente do composto. Os parasitos foram expostos a diferentes concentrações de EGS e então submetidos a avaliação. Entretanto, nenhuma das concentrações empregadas foi capaz de alterar a viabilidade dos mesmos (Figura 2). Como controle, ao final do experimento adicionamos SDS 10% para lise de todos os parasitos e observamos a completa incorporação de iodeto de propídio.

Como uma maneira de complementar esses dados, realizamos também um ensaio utilizando resazurina, um reagente capaz de avaliar o metabolismo celular por meio de reações de redução nas quais os parasitos com metabolismo ativo convertem a resazurina em uma molécula vermelha fluorescente chamada resorufina. Sendo assim, a quantidade de fluorescência, bem como a variação na coloração produzida é proporcional ao número de parasitos metabolicamente ativos. Na Figura 3A padronizamos a quantidade de parasitos mais adequada para utilizar no ensaio de viabilidade. A seguir, o ensaio foi novamente realizado na presença de 2×10^5 parasitos/poço incubados com concentrações crescentes de EGS de *A. aegypti*. Porém, mesmo quando incubados com concentrações altas de EGS (máximo de 320 $\mu\text{g/mL}$), não observamos diferenças significativas no metabolismo celular dos parasitos (Figura 3B).

Figura 2 - Efeito do EGS de *A. aegypti* na viabilidade de *L. (L.) amazonensis*: incorporação de iodeto de propídeo (IP). Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram incubados na presença de iodeto de propídeo e a incorporação do marcador nuclear fluorescente foi determinada a partir da leitura da absorbância (λ_{ex} = 490 nm; λ_{em} = 638 nm) a cada 2 minutos ao longo de 2 horas. Os parasitos foram tratados com diferentes concentrações de EGS (40, 20, 10, 5 e 1 μ g/mL). Parasitos incubados com o diluente (PBS) foram utilizados como controle negativo (não tratados). Após duas horas de quantificação, SDS 10% foi utilizado para lisar todos os parasitos (indicado pela seta vermelha).

Figura 3- Efeito do EGS de *A. aegypti* na viabilidade de *L. (L.) amazonensis*: avaliação do metabolismo. (A) Diferentes suspensões de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram incubados na presença de resazurina 0,01% por 18-24 horas e após esse período foi determinada a densidade óptica D. O. ($\lambda = 570 \text{ nm}$; $\lambda = 600 \text{ nm}$). (B) Com base nesses resultados, uma suspensão de 2×10^6 parasitos por poço foi distribuída em alíquotas de $100 \mu\text{L}$ e expostas a diferentes concentrações de EGS (320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 e $1 \mu\text{g/mL}$), a seguir foram incubados na presença de resazurina 0,01% por 18-24 horas. Após esse período foi determinada a D.O. ($\lambda = 570 \text{ nm}$; $\lambda = 600 \text{ nm}$). Os resultados estão expressos como a diferença entre os valores das duas leituras.

4.2 Infecção in vivo

Assim, descartado qualquer possível efeito direto do EGS de *A. aegypti* sobre o parasito, iniciamos nossos estudos avaliando o papel do EGS em infecções por *L. (L.) amazonensis* in vivo em camundongos C57BL/6 fêmeas. Como descrito em Material e Métodos, 2×10^6 promastigotas de fase estacionária foram inoculados subcutaneamente na pata posterior esquerda, após diluição conforme os grupos experimentais descritos a seguir: I) PBS (grupo “PBS”); II) EGS equivalente a 1 par de glândulas salivares (grupo “EGS 1”); III) EGS equivalente a 5 pares de glândulas salivares (grupo “EGS 5”); IV) EGS equivalente a 25 pares de glândulas salivares (grupo “EGS 25”). O tamanho das lesões foi então avaliado semanalmente e a progressão da infecção está apresentada na Figura 4. É possível observar que o tamanho das lesões aumentou em todos os grupos ao longo do período avaliado, tanto na presença quanto na ausência do EGS. Porém, nas 3 primeiras semanas de infecção, houve um aumento significativo da lesão nos animais do grupo “EGS 25” quando comparado ao grupo “PBS” (Figura 4A). Nos demais grupos (“EGS 1” e “EGS 5”), a espessura da pata foi essencialmente o mesmo do grupo “PBS”, exceto na terceira semana de infecção onde o grupo “EGS 5” também apresentou um aumento significativo da lesão de seus animais em comparação ao grupo “PBS” (Figura 4A). As imagens das Figuras 4B e 4C mostram as lesões na terceira semana de infecção, comparando-se os grupos “PBS” e “EGS 25”, respectivamente, que foram então escolhidos para as análises posteriores.

Visto que diferenças significativas nos tamanhos das lesões foram observadas somente nas primeiras semanas de infecção, realizamos uma avaliação mais detalhada dos parâmetros imunoparasitológicos dos animais na terceira semana de infecção. Confirmando os dados anteriores, observamos um aumento significativo na espessura da pata do grupo “EGS 25” quando comparado com o grupo “PBS” (Figura 5A), e o mesmo ocorreu com o peso da pata dos animais (Figura 5B). As lesões das patas foram individualmente processadas e a carga parasitária apresentava-se maior na maioria dos animais no grupo tratado com EGS, comparado com os animais do grupo que recebeu apenas PBS durante a infecção, mesmo não sendo significativa (Figura 5C). Além disso, observamos um aumento significativo de IL-1 β no homogeneizado da lesão dos animais do grupo “EGS 25” quando comparado com o grupo “PBS” (Figura 5E). Um pequeno aumento também foi observado na citocina IL-6, e também na produção de NO, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (Figura 5D e 5F). Curiosamente, detectamos mais IL-12 no homogeneizado das lesões do grupo “PBS” do que no grupo “EGS 25” (Figura 5G), enquanto a presença de IL-10 foi

bastante semelhante entre os grupos experimentais (Figura 5H). Não detectamos a presença de TNF- α em amostras de nenhum dos dois grupos nesse tempo de infecção (dados não mostrados).

A seguir, comparamos a porcentagem relativa de linfócitos T CD4⁺ (Figura 6A), linfócitos B (Figura 6B), células dendríticas (Figura 6C), macrófagos (Figura 6D) e neutrófilos (Figura 6E) nos tecidos das lesões, mas não observamos diferenças significativas entre o grupo “PBS” e o grupo “EGS 25”, possivelmente por conta da grande variabilidade dos resultados.

A presença dessas mesmas células também foi avaliada nos linfonodos poplíteos por citometria de fluxo. Observamos uma tendência à diminuição no número absoluto de todos os tipos celulares no grupo co-inoculados com EGS (Figura 7). Porém, somente os neutrófilos apresentaram-se significativamente reduzidos no grupo “EGS 25” quando comparado com o grupo “PBS” (Figura 7E).

Realizamos um ensaio de linfoproliferação com as células dos linfonodos poplíteos e observamos que as células do grupo “EGS 25” apresentaram uma proliferação basal maior do que as células do grupo “PBS”, mesmo esta não sendo significativa. O estímulo com antígeno do parasita não parece ter induzido proliferação extra dessas células em nenhum dos dois grupos. E o estímulo com um mitógeno policlonal (Con A) induziu proliferação dos linfócitos em ambos os grupos, embora as células dos animais co-inoculados com EGS tenham proliferado mais do que as células dos animais que receberam PBS junto com a infecção (Figura 8A). Dentre as citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura, as células do grupo “EGS 25” produziram mais IFN- γ do que as células do grupo “PBS” em todas as situações avaliadas (Figura 8B). Os níveis de IL-4 foram semelhantes entre os dois grupos, embora o estímulo com antígeno do parasito tenha induzido maior produção de IL-4 nas células do grupo “EGS 25” (Figura 8C). A produção basal de IL-17 foi praticamente indetectável, porém após o estímulo com antígeno ou com Con A, as células dos animais do grupo “PBS” produziram mais IL-17 do que as células do grupo “EGS 25” (Figura 8D). Finalmente, a produção de IL-10 foi semelhante nos dois grupos em condições basais (sem estímulo *in vitro* e na presença de antígenos do parasita), mas em células estimuladas com Con A, a produção dessa citocina foi maior no grupo “EGS 25” do que no grupo “PBS” (Figura 8E).

Figura 5—Análise de parâmetros imunoparasitológicos da lesão na terceira semana da infecção de camundongos com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 foram injetados via subcutânea na pata posterior esquerda com 2×10^6 *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária em PBS estéril ou com EGS de *A. aegypti* (equivalente a 25 pares de glândulas salivares por animal). As lesões foram medidas semanalmente com o auxílio de um paquímetro, os camundongos foram submetidos à eutanásia na terceira semana de infecção e a pata com o tecido lesionado foi processado conforme descrito em Material e Métodos. (A) Tamanho da pata em mm; (B) Peso da pata em gramas; (C) Carga parasitária determinada por diluição limitante; (D) Produção de NO, determinada pela reação de Griess; (E) Dosagem de IL-1 β ; (F) IL-6; (G) IL-12; (H) IL-10 no homogenato das lesões, pelo método de ELISA. (* $p \leq 0,05$ versus grupo “PBS”).

Figura 6 - Citometria de fluxo das células da lesão da pata de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 foram injetados via subcutânea na pata posterior esquerda com 2×10^6 *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária em PBS estéril ou com EGS de *A. aegypti* (equivalente a 25 pares de glândulas salivares por animal). Os camundongos foram submetidos à eutanásia na terceira semana de infecção e a pata com o tecido lesionado foi processado conforme descrito em Material e Métodos. O conteúdo celular da lesão foi analisado por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células CD4⁺; (B) porcentagem de células CD19⁺, (C) porcentagem de células CD11c⁺, (D) porcentagem de células F4/80⁺; (E) porcentagem de células Ly6G⁺.

Figura 7 -Citometria de fluxo das células do linfonodo poplíteo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 foram injetados via subcutânea na pata posterior esquerda com 2×10^6 *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária em PBS estéril ou com EGS de *A. aegypti* (equivalente a 25 pares de glândulas salivares por animal). Os camundongos foram submetidos à eutanásia na terceira semana de infecção, o linfonodo poplíteo da pata infectada foi processado e suas células seguiram para análise em citometria de fluxo. **(A)** Número de células CD4⁺; **(B)** número de células CD19⁺, **(C)** número de células CD11c⁺; **(D)** número de células F4/80⁺, **(E)** número de células Ly6G⁺.(* $p \leq 0,05$ versus grupo “PBS”).

Figura 8 –Linfoproliferação e produção de citocinas pelas células do linfonodo poplíteo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 foram injetados via subcutânea na pata posterior esquerda com 2×10^6 *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária em PBS estéril ou com EGS de *A. aegypti* (equivalente a 25 pares de glândulas salivares por animal). Os camundongos foram submetidos à eutanásia na terceira semana de infecção, o linfonodo poplíteo foi retirado em condições assépticas e suas células utilizadas para o ensaio de proliferação e cultura para dosagem de citocinas. **(A)** Avaliação da proliferação das células do linfonodo poplíteo. **(B)** Dosagens de IFN- γ , **(C)** de IL-4, **(D)** de IL-17 e de **(E)** IL-10 realizadas pelo método de ELISA. (* $p \leq 0,05$ versus grupo “PBS”).

4.3 Efeito do EGS na infecção de macrófagos por *Leishmania*

Considerando as diferenças observadas na infecção *in vivo*, nosso próximo passo foi avaliar se o EGS de *A. aegypti* estaria interferindo na interação de *L. (L.) amazonensis* com os macrófagos, células que reconhecidamente fazem parte da resposta imune contra o parasita. Iniciamos nosso estudo *in vitro* avaliando o efeito da pré-incubação com diferentes concentrações do EGS de *A. aegypti* na infecção de macrófagos por *L. (L.) amazonensis* por 1 horas (curva de concentração-resposta - Figura 9). Observamos um aumento gradual do número de parasitos por célula, de maneira proporcional à concentração do extrato pré-incubado nas culturas, já a partir de 10 µg/mL, alcançando significância estatística somente nas células pré-incubadas com 40 µg/mL de EGS, em relação ao controle. A partir desses dados iniciais, os experimentos seguintes foram realizados sempre com 40 µg/mL de EGS.

A seguir, realizamos uma cinética temporal para avaliar se o tempo de exposição do macrófago ao EGS também poderia afetar na infecção de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea. No entanto, não observamos diferenças no número de parasitos por célula, bem como na porcentagem de infecção quando macrófagos foram pré-tratados com EGS de *A. aegypti* por 3 e 6 horas, sendo esse parâmetro significativamente diferente somente após pré-tratamento dos macrófagos por 18 horas (*overnight* - Figura 10).

Figura 9 - Efeito do EGS de *A. aegypti* na infectividade de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea: cinética concentração-resposta. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-incubados *overnight* com diferentes concentrações de EGS em estufa a 37 °C e com 5% de CO₂. Promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas à cultura, na proporção 5:1 (parasito:célula), e a fagocitose foi avaliada após 1 hora conforme descrito em Material e Métodos. Os dados são apresentados como o número de parasitos em 100 macrófagos infectados. (* $p \leq 0,05$ versus grupo controle “0 µg/mL”).

Figura 10 - Efeito do EGS de *A. aegypti* na infectividade de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea: cinética tempo-resposta. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-incubados por 3 horas, 6 horas ou *overnight* com 40 µg/mL de EGS. Promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas à cultura, na proporção 5:1 (parasito:célula), e a fagocitose foi avaliada após 1 hora conforme descrito em Material e Métodos. Os dados são apresentados como (A) número de parasitos em 100 macrófagos infectados e (B) porcentagem de infecção. (* $p \leq 0,05$ versus grupo “controle”).

Nos ensaios seguintes, realizamos a infecção de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos tratados ou não tratados com o EGS de *A. aegypti*, nos períodos de 1 e 48 horas. Encontramos aumento significativo no número de parasitos por célula quando avaliados após 1 hora de infecção nos grupos tratados com EGS em relação aos respectivos controles (Figura 11A). Por outro lado, a análise dos dados de 48 horas de infecção sugere que o efeito do EGS no macrófago não é duradouro, uma vez que não observamos diferenças entre os grupos controle e tratados com EGS em termos de número de parasitos por célula (Figura 11A). Além do número de parasitos por célula, avaliamos também a porcentagem de infecção dos macrófagos após 1 e 48 horas, mas não encontramos diferenças significativas em nenhum dos dois tempos de infecção (Figura 11B). Os ensaios descritos acima correspondem à análise das amostras processadas por imunofluorescência. Assim, de maneira representativa, pode ser visualizado *L. (L.) amazonensis* em 1 hora de infecção no interior dos macrófagos do grupo controle não tratado (Figura 11C) e nos macrófagos pré-incubados com EGS (Figuras 11D). Em verde observa-se o parasita (anticorpo anti-*Leishmania* + anti- IgG/Alexa 488), em vermelho os lisossomos da célula (anticorpo anti-Lamp1 + anti- IgG/Alexa 568) e em azul o DNA das células (DAPI, 10 μ M).

Uma vez observado o fenótipo de maior susceptibilidade à infecção (Figuras 9, 10 e 11), analisamos mais a fundo as diferenças na fagocitose com 1 hora de infecção para avaliar se o EGS de *A. aegypti* poderia estar conferindo maior susceptibilidade ao macrófago na ligação ou na internalização do parasito na célula. Nesse ensaio, utilizamos macrófagos pré-incubados ou não com o EGS de *A. aegypti*, e posteriormente incubados ou não com genisteína ou latrunculina e infectados com de *L. (L.) amazonensis*. A genisteína é um flavonóide que em altas concentrações é capaz de inibir a fosforilação das proteínas tirosino-quinase que estão envolvidas em vias de sinalização dos macrófagos, já a latrunculina é uma toxina encontrada em poríferos que promove a despolimerização dos filamentos de actina, sendo assim, ambas as drogas são capazes de atuar no processo de inibição de fagocitose, que neste ensaio, foram utilizadas como controle. Na Figura 12A é possível observar a imunofluorescência do ensaio de infecção de amostras fixadas, mas não permeabilizadas, realizada para contagem dos parasitos internalizados (em azul – DAPI) e aderidos (em verde – anticorpo anti-*Leishmania*) nas células. Como esperado, os macrófagos incubados com ambas as drogas apresentaram deficiência significativa na internalização dos parasitos, porém não houve diferença na fagocitose (número de parasitos internalizados) entre os grupos incubados com meio apenas ou pré-incubados com EGS (Figura 12C). O mesmo fenótipo também pode

ser observado no grupo controle (no qual os macrófagos não foram expostos às drogas inibidoras de fagocitose), os valores das porcentagens de parasitos internalizados não foi significativamente diferente entre os grupos tratados e não tratados com EGS (Figura 12C). Os valores correspondem à porcentagem do total de parasitos internalizados contabilizados em relação ao total de parasitos contados em cada lamínula.

Figura 11 - Efeito do EGS de *A. aegypti* na infecção de macrófagos derivados de medula óssea por *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-incubados *overnight* com 40 µg/mL de EGS. Promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas à cultura, na proporção 5:1 (parasito:célula), e a fagocitose foi avaliada após 1 e 48 horas conforme descrito em Material e Métodos. Os dados são apresentados como (A) número de parasitos em 100 macrófagos infectados e (B) porcentagem de infecção. (* $p \leq 0,05$ versus respectivo grupo “Não tratado”). Imagens representativas da contagem por imunofluorescência do ensaio realizado em (A), sendo: (C) macrófagos não tratados e (D) macrófagos tratados com 40 µg/mL de EGS e infectados com *L. (L.) amazonensis* por 1 hora e posteriormente processados por imunofluorescência para contagem de parasitas.

Figura 12 - Porcentagem de parasitos internalizados em macrófagos derivados de medula óssea previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-incubados *overnight* com 40 µg/mL de EGS. Em seguida, foram tratados com genisteína (250µM) e latrunculina (5µM) por 30 minutos a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (5:1) por 1 hora a 33 °C. As células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos para imunofluorescência. (A, B) Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência indicando quando o parasito está apenas aderido à membrana do macrófago ou internalizado. (C) representa os valores da porcentagem de parasitos internalizados.

4.4 Ensaio de ELISA de ligação

Uma vez que não observamos diferenças significativas na fagocitose pelos macrófagos, padronizamos um ensaio de ELISA de ligação para que pudéssemos observar se o maior número de parasitos por célula seria decorrente do aumento da expressão de algum receptor no macrófago, quantificando o número de parasitos aderidos à membrana do mesmo. Neste ensaio plaqueamos e fixamos macrófagos em placas de 96 poços, e infectamos com *L. (L.) amazonensis* em diferentes proporções (1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 e 80:1). Após fixação, anticorpos anti-*Leishmania* foram utilizados para quantificar a presença de parasitos, conforme explicado em Material e Métodos. Assim, na Figura 13A, podemos observar um valor de densidade óptica proporcional ao número de parasitas adicionados à cultura. Assim, pré-incubamos macrófagos com meio de cultura apenas ou com EGS de *A. aegypti*, realizamos a infecção com *L. (L.) amazonensis* na proporção 10:1 e realizamos nova quantificação como explicado acima. Observamos que as células que foram pré-incubadas com o EGS de *A. aegypti* apresentaram um número significativamente maior de parasitas aderidos em sua membrana quando comparado àquelas células que não foram pré-incubadas com o EGS (Figura 13B). Aparentemente, o EGS de *A. aegypti* é capaz de aumentar a expressão de receptores no macrófago refletindo assim no aumento do número de parasitas por célula.

Figura 13 - Efeito do EGS de *A. aegypti* na adesão de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos: ELISA de ligação. (A) Curva de padronização do ensaio de ELISA de ligação. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram fixados com PFA 4% em placas de 96 poços. Promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas à cultura, em diferentes proporções sendo fixadas com PFA 4% após 2 horas de infecção. (B) Após padronização, macrófagos foram expostos ao EGS de *A. aegypti* na concentração de 40 µg/mL e depois de fixados foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10:1 (parasito:célula) sendo fixadas novamente com PFA 4% após 2 horas de infecção. Os ensaios foram desenvolvidos e revelados conforme descrito em Material e Métodos (* $p \leq 0,05$ versus grupo “Meio”).

5 DISCUSSÃO

Na saliva de artrópodes hematófagos encontramos um coquetel farmacológico cujos componentes podem atuar tanto na hemostasia, como no sistema imune do hospedeiro vertebrado. Além disso, como já descrito na literatura, alguns desses componentes salivares também possuem atividades antimicrobianas (DA YU et al., 2006; GODREUIL et al., 2014; KOTSYFAKIS et al., 2006; LUPLERTLOP et al., 2011; PICHU et al., 2009; ROSSIGNOL; LUEDERS, 1986; WU et al., 2015), incluindo peptídeos provenientes de artrópodes com atividade anti-*Leishmania* (KONNO et al., 2007, LÖFGREN et al., 2008, LUPLERTLOP et al., 2011, RANGEL et al., 2011, SILVA et al., 2000, TÉNÉ et al., 2016). Nesse sentido, iniciamos nosso estudo explorando possíveis efeitos diretos do EGS de *A. aegypti* em *L. (L.) amazonensis*. Apesar de Luplertlop et al. (2011) terem demonstrado que um peptídeo homólogo à cecropina presente na saliva de *A. aegypti* apresentou atividade leishmanicida em duas espécies de parasitos (*L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*), nossos resultados não mostram efeitos diretos do EGS dessa espécie na viabilidade do parasita. Em nossas condições experimentais, mesmo tendo utilizado altas concentrações do extrato nas culturas (320 µg/mL de proteína) (Figura 2), é possível que não tenha sido possível alcançar a concentração de cecropina utilizada no estudo supracitado (15 µM). Porém, como a cecropina possui aproximadamente 6,6 kDa de massa molecular, isso significa que os autores utilizaram quase 100 µg/mL da proteína em seus ensaios, o que é uma concentração biologicamente impossível de ser alcançada em termos de material bruto, considerando que a saliva de *A. aegypti* possui dezenas ou talvez mais de uma centena de proteínas. Assim, embora as concentrações utilizadas por Luplertlop et al. (2011), possam ser farmacologicamente viáveis em termos de um possível tratamento com a proteína recombinante, estão superestimadas e certamente não representam a concentração do peptídeo existente na saliva. Além disso, esse peptídeo foi identificado em mosquitos infectados com o vírus da dengue e é sabido que a infecção viral aumenta a expressão de diversas proteínas, como mostrado por Chisenhall et al. (2014) que observaram a mudança no proteoma das glândulas salivares de *A. aegypti* infectados por DENV2. Nessa mesma linha, o trabalho realizado por Marinotti et al. (1990) mostrou que a concentração de proteínas presente nas glândulas salivares de mosquitos fêmeas da espécie *A. aegypti* pode variar antes da alimentação, depois da alimentação sanguínea e depois da alimentação com sacarose. Como os mosquitos utilizados no presente estudo são alimentados apenas com sacarose 10%, portanto, é certo que suas glândulas salivares possuem um perfil protéico distinto daquele observado em mosquitos infectados ou mosquitos que tenham realizado repasto sanguíneo. Além disso, como utilizamos uma preparação bruta de glândulas salivares, é possível que as quantidades presentes de potenciais

moléculas leishmanicidas estejam abaixo da concentração mínima necessária para observação de efeito em nosso sistema experimental.

Artrópodes hematófagos também possuem em sua saliva potentes fatores que são capazes de modular e/ou suprimir a resposta imune do hospedeiro vertebrado, potencializando a transmissão de um possível patógeno. Um crescente número de trabalhos vem demonstrando as propriedades imunomoduladoras da saliva de *A. aegypti* em células do sistema imunológico como linfócitos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos (BISSONETTE et al., 1993; BIZZARRO et al., 2013; CROSS et al., 1994; SCHNEIDER et al., 2010; WASSERMAN et al., 2004). Sabendo que as moléculas salivares de nossa preparação não possuem efeito direto no parasito, mas reconhecendo o papel dessas mesmas moléculas na imunomodulação do hospedeiro vertebrado, propusemos-nos a estudar o efeito dos componentes presentes na saliva de *A. aegypti* em infecções por *Leishmania*. Nossos experimentos iniciais revelaram um aumento no tamanho das patas dos animais que foram infectados na presença do EGS de *A. aegypti* (Figura 4). Vários trabalhos na literatura já demonstraram o efeito da saliva de flebotomíneos na infecção murina por *Leishmania* spp., que promove um desenvolvimento maior e mais exacerbado da lesão quando comparado a animais inoculados somente com o parasito (BELKAID et al., 1998; BEZERRA; TEIXEIRA, 2001; LIMA; TITUS, 1996; MBOW et al., 1998; TITUS; RIBEIRO, 1988). Entretanto, em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que mostra um fenótipo semelhante quando componentes salivares de *A. aegypti* são co-inoculados com *Leishmania*, uma vez que o trabalho realizado por Titus e Ribeiro (1988) que co-inocularam EGS de *A. aegypti* com *L. major* em camundongos CBA não observaram diferença no tamanho da lesão. Porém, diversas diferenças podem ser apontadas entre nosso estudo e o trabalho supracitado. Primeiro, tanto a espécie de *Leishmania* quanto a linhagem de camundongos foram diferentes daqueles utilizados por nós. É bem sabido que a interação patógeno-hospedeiro varia bastante de acordo com a cepa utilizada (no caso do parasita) e do fundo genético do hospedeiro (no caso do camundongo), gerando fenótipos de resistência e susceptibilidade. Segundo, enquanto os autores do trabalho utilizaram o equivalente a meio par de glândula salivar, nós realizamos uma cinética com doses crescentes de EGS e encontramos um efeito somente quando os parasitos foram co-inoculados na presença do equivalente a 25 pares de glândulas salivares. Contudo, durante a avaliação da espessura da pata (usada como parâmetro da infecção), observamos diferenças no grupo co-inoculado com a maior dose de EGS somente nas 3 primeiras semanas, quando comparado ao grupo que recebeu PBS no inóculo. No caso do

grupo co-inoculado com o parasita na presença do equivalente a 5 pares de glândulas salivares, uma pequena diferença pontual foi observada, mas somente na terceira semana de avaliação (Figura 4). Apesar de não observarmos diferenças no tamanho da lesão, quando comparamos o grupo “PBS” com o grupo “EGS 25”, na sexta semana de infecção, as lesões dos animais do grupo co-inoculado com EGS apresentou ulcerações (dados não mostrados). Esses dados sugerem que o EGS provavelmente atua nos tempos iniciais da infecção, e seu efeito pode se refletir no fenótipo observado em tempos mais tardios da infecção.

O número de células inflamatórias recuperadas das lesões não apresentou diferenças significativas entre os grupos, mas pudemos notar uma tendência à diminuição na porcentagem de macrófagos no grupo “EGS 25” (Figura 6). Assim inferimos que nesse grupo temos um maior número de parasitos por célula uma vez que a carga parasitária não apresentou diferenças significativas em comparação ao grupo “PBS” (Figura 5), refletindo no maior tamanho das lesões e peso das patas dos camundongos. E de fato, a produção de IL-12, citocina associada ao perfil de resistência à leishmaniose (GÜLER et al., 1996; HEINZEL et al., 1993; SYPEK et al., 1993) estava significativamente diminuída no grupo “EGS 25”. Por outro lado, a IL-1 β , outra citocina inflamatória, estava aumentada no grupo “EGS 25” quando comparada ao grupo “PBS”. Sabe-se que a produção de IL-1 β associada ao óxido nítrico confere resistência à *Leishmania* spp. (LIMA-JUNIOR et al., 2013), e apesar de o grupo “EGS 25” apresentar maior susceptibilidade à infecção, apresentou maior expressão de IL-1 β e de NO no local da lesão, provavelmente devido a presença de um número maior de parasitas no local. Inclusive, já foi relatado na literatura que o IFN- γ pode promover a replicação de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos, dependendo da presença de outros fatores (QI et al., 2004). Nesse sentido, sugere-se que a maior produção das citocinas como IL-4 e IL-10 no grupo “EGS 25” (Figura 8C e 8E), poderia estar atuando no aumento da atividade arginase-1, o que promoveria o crescimento do parasita no macrófago (QI et al., 2004). A resposta imune adaptativa do hospedeiro tem um papel fundamental no controle da infecção por *Leishmania*. Neste contexto, Reed e colaboradores (1986) removeram os linfonodos poplíteos de camundongos C57BL/10, infectando-os com *L. (L.) amazonensis*, o que resultou em um estado de imunocomprometimento dos animais e na exacerbação da doença, demonstrando assim a importância das células presentes nesse linfonodo drenante em infecções por *Leishmania*. Em nossos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, a co-inoculação com EGS de *A. aegypti*, provocou redução de todos os tipos celulares analisados em comparação ao grupo “PBS”, mostrando que o EGS pode ter algum efeito

direto nas células do linfonodo poplíteo e dessa forma estar contribuindo para o aumento da infecção (Figura 7). A resposta proliferativa tanto ao antígeno (específica), quando à Con A (policlonal), está suprimida no grupo co-inoculado com PBS, quando comparado ao grupo EGS (Figura 8A). Com relação ao perfil de citocinas na terceira semana de infecção (Figura 8), houve um aumento na produção de IL-10 e de IL-4. Pernichelli (2008) já havia observado resultados semelhantes na primeira semana de infecção em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* na presença de EGS de *L. longipalpis*, o que poderia estar estimulando uma resposta do tipo Th2, corroborando com uma maior susceptibilidade à infecção nesse grupo. O aumento da proteção contra fungos e bactérias em modelos experimentais já foram previamente mostradas devido à presença de IL-17 (CHO et al., 2010; WU et al., 2007), na infecção por *L. donovani* em seres humanos, foi associada à proteção contra a doença (PITTA et al., 2009), nesse sentido, nossos resultados sugerem que a diminuição da IL-17 nos animais do grupo co-inoculado com EGS poderia estar associada ao fenótipo de maior susceptibilidade do que os do grupo “PBS” que apresentaram uma maior produção dessa citocina. Assim, os resultados de nossos experimentos *in vivo* sugerem que o EGS de *A. aegypti* é capaz de modular o sistema imune do hospedeiro vertebrado, e também de aumentar a infecção por *Leishmania*.

Sabe-se que os macrófagos estão dentre as principais células de mamíferos parasitadas por *Leishmania* spp. (ALEXANDER; RUSSELL, 1992), sendo uma de suas funções essenciais a de atuar como sensor de sinais de perigo endógenos ou exógenos apresentados pelos parasitos. Essas células imunes efectoras são derivadas dos monócitos sanguíneos, que por sua vez provém de células-tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea e se apresentam *in vivo* de maneira bastante heterogênea em diversos tecidos, sendo responsáveis por processos inflamatórios, imunológicos e metabólicos, podendo ser divididas em subpopulações, que recebem denominações especiais dependendo de sua localização e fenótipo funcional (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; GORDON; TAYLOR, 2005). Trabalhos na literatura têm descrito as propriedades imunomoduladoras do EGS de *A. aegypti* nessas células (WASSERMAN, 2005; SCHNEIDER, 2010). Nesse sentido, avaliamos o efeito do EGS de *A. aegypti* em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*. Nossos resultados mostraram um aumento no número de parasitos por célula (Figura 11) e esses dados que se assemelham aos de Zer et al. (2001) que observaram um aumento significativo no número de parasitos em macrófagos peritoneais infectados quando cultivados na presença de saliva de *P. papatasi*. Entretanto, após 48 horas de infecção, não observamos diferenças no

número de parasitos por célula, o que pode sugerir que o efeito do EGS no macrófago não é duradouro. Vale ressaltar que optamos por não repor o EGS nas culturas ao longo do tempo (48 horas) uma vez que essa situação não mimetizaria os parâmetros biológicos de uma infecção.

Os macrófagos expressam uma grande diversidade de receptores que são capazes de mediar a adesão microbiana e o processo de fagocitose. Do mesmo modo, com relação à interação *Leishmania*-célula, uma série de eventos medeiam essa interação por meio da expressão e da fisiologia dos receptores do macrófago (MOSSER; ROSENTHAL, 1993). Como observamos um fenótipo de maior susceptibilidade do macrófago à infecção quando este foi exposto ao EGS, analisamos mais a fundo as diferenças na fagocitose com 1 hora de infecção. Nossos resultados permitiram concluir que o EGS não está afetando diretamente a capacidade fagocítica do macrófago (Figura 12). Alguns trabalhos avaliaram o efeito da saliva de artrópodes hematófagos em macrófagos, entretanto poucos estudam seu efeito no processo de fagocitose dessas células (KRAMER et al., 2011; KYCKOVA; KOPECKY, 2006; WASSERMAN, 2005). Mais especificamente, com relação ao efeito da saliva de *A. aegypti* em macrófagos, somente um estudo relatou que o EGS do mosquito diminuiu de maneira significativa a fagocitose de *Escherichia coli* por essas células provenientes de camundongos BALB/c (WASSERMAN, 2005). Esses resultados diferem dos nossos, porém, uma comparação direta entre os dois estudos não é possível, uma vez que as condições experimentais e o microorganismo utilizado são diferentes nos dois estudos. Além de tratar-se de macrófagos de outra linhagem de camundongos, os tempos de incubação com o EGS foram diferentes e, mais importante, as interações entre os macrófagos e *E. coli* são provavelmente diferentes daquelas entre macrófagos e *Leishmania*. As formas promastigotas de *Leishmania* spp. são capazes de ligar especificamente a receptores do macrófago, que irão desencadear o processo de fagocitose e a subsequente internalização do parasita que passará ao seu estágio intracelular, a forma amastigota. Nesse sentido, o aumento no número de parasitas sugere uma maior expressão de determinado(s) receptor(es) na superfície do macrófago (Figura 13). Alguns desses receptores que já foram descritos por facilitar a internalização do parasita são o receptor 3 do complemento (CR3), o receptor 1 do complemento (CR1), receptor para manose (MR), receptores Fcγ (FcγR) e receptores para fibronectina (FnR) (UENO; WILSON, 2012). Vale ressaltar ainda que, outros estudos também mostraram o efeito da saliva de outros artrópodes hematófagos na expressão de receptores em células do sistema imune, como por exemplo, estudo realizado por Macaluso e

Wikel (2001) que por meio de um ensaio similar ao nosso, estudaram o efeito da saliva de *Dermacentor andersoni* na expressão de integrinas de linfócitos. Nossos resultados levam a crer que a saliva de *A. aegypti* poderia estar atuando no aumento da expressão de algum desses receptores, uma vez que por meio do ensaio de ELISA de ligação fica claro o aumento no número de parasitas aderidos aos macrófagos. Entretanto, a(s) molécula(s) envolvida(s) nesse fenótipo ainda precisa(m) ser estudada(s).

Um aspecto que deve ser levado em consideração em nosso trabalho é que o efeito observado tanto *in vivo* quanto *in vitro* parece ter ocorrido com quantidades relativamente altas de material, o que definitivamente não é o caso. Já realizamos experimentos com exposição de camundongos a picadas de 50 mosquitos (dados não publicados) e a co-inoculação dos parasitas com o equivalente a 25 pares de glândulas salivares por camundongo (aproximadamente 50 µg de proteína) equivale a uma dose de 2 mg/kg de material bruto, considerando um camundongo de aproximadamente 25 gramas. Humanos adultos ingerem drogas anti-inflamatórias conhecidas em doses mais altas, como por exemplo aspirina (7-15 mg/kg), dipirona sódica (7-15 mg/kg), nimesulida (1,5 a 3 mg/kg), dentre outras. Além disso, devemos considerar que o EGS provavelmente possui uma série de proteínas que não são secretadas na saliva e que a própria saliva possui mais de uma centena de proteínas potencialmente secretadas de acordo com o transcriptoma de glândulas salivares (RIBEIRO et al., 2007). Assim, se a atividade observada for decorrente da ação de uma ou poucas proteínas salivares, e considerando que a grande maioria dessas proteínas está presente na saliva numa quantidade não maior do que 1%, isso significa que provavelmente 20 µg/kg, o que seria uma dose bem abaixo daquelas citadas acima para fármacos anti-inflamatórios.

Raciocínio semelhante pode ser aplicado aos ensaios *in vitro*. Quando nossos ensaios são realizados em placas de 96 poços, o volume de trabalho é de 100 a 200 microlitros. Assim, a concentração efetivamente usada de extrato nessas condições é de aproximadamente 4 a 8 µg de material bruto, ou algo em torno de 40 a 80 ng de uma potencial proteína presente na proporção de 1% do EGS. Só para efeito comparativo, diversas proteínas salivares recombinantes de *A. aegypti* com atividade biológica já desvendada foram descritas como sendo biologicamente ativas *in vitro* na faixa de micromolar: apyrase (0,4 a 2,4 µM – SUN et al., 2006), aegyptina (0,1 a 3 µM – CALVO et al., 2007) e aedesina (0,25 a 1 µM – GODREUIL et al., 2014). Se considerarmos um peptídeo de 10 kDa, isso significa uma concentração de 100 ng/mL a 10 µg/mL, totalizando algo entre 10-20 ng a 1-2 µg da proteína

em condições semelhantes às nossas. Esses valores podem ser até 10 vezes mais altos se a proteína tiver algo próximo a 100 kDa de massa molecular. Esse exercício teórico mostra que as concentrações usadas estão totalmente de acordo com trabalhos publicados nessa área.

6 CONCLUSÕES

- O EGS de *A. aegypti* afeta o curso da infecção *in vivo* em camundongos C57BL/6, com maior aumento da espessura da pata nas primeiras semanas de infecção e modulação dos parâmetros imunológicos envolvidos na proteção contra a doença.
- O EGS de *A. aegypti* aumenta a infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos murinos *in vitro*.
- O EGS de *A. aegypti* não possui efeito direto em *L. (L.) amazonensis*, mesmo em altas concentrações.

REFERÊNCIAS*

AKUFFO, H.; HULTMARK, D.; ENGSTOM, A.; FROHLICH, D.; KIMBRELL, D. *Drosophila* antibacterial protein, cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipathic peptides. **Int. J. Mol. Med.**, v. 1, p. 77-82, 1998.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmaniasis: paradox rather than paradigm. **Immunol. Lett.**, v. 99, p. 17-23, 2005.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, v. 31, p. 176-231, 1992.

ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BAGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta. Biochim. Pol.**, v. 52, p. 655-658, 2005.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 2-70, 2007.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural model os cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1941-1953, 1998.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Ver Infect Dis.**, v. 10, p. 560-86, 1988.

BEZERRA, H. S. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 93, p. 349-351, 2001.

BISSONETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite Immunol.**, v. 15, p. 27-33, 1993.

BIZZARRO, B.; BARROS, M. S.; MACIEL, C.; GUERONI, D. I.; LINO, C. N.; CAMPOPIANO, J.; KOTSYFAKIS, M.; AMARANTE-MENDES, G. P.; CALVO, E.; CAPURRO, M. L.; SÁ-NUNES, A. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasit. Vectors**, v. 6, p. 1-13, 2013.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIZZARRO, B. **Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T.** 2012. 99 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, 2012.

BLACK, W. C. T.; BENNETT, K. E.; GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N.; BARILLAS-MURY, C. V.; FERNANDEZ-SALAS, I.; DE LOURDES MUNOZ, M.; FARFAN-ALE, J. A.; OLSON, K. E.; BEATY, B. J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 379-388, 2002.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v. 16, p. 113-118, 2007.

BRODIE, T. M.; SMITH, M. C.; MORRIS, R. V.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 2359-2365, 2007.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 329-344, 1999.

CALVO, E.; MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. C. Function and Evolution of a mosquito salivary protein family. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 1935-1942, 2006.

CALVO, E.; TOKUMASU, F.; MARINOTTI, O.; VILLEVAL, J. L.; RIBEIRO, J. M. C.; FRANCICHETTI, I. M. B. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin $\alpha 2\beta 1$, and von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 26928-26938, 2007.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika vírus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1885-1886, 2015.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHISENHALL, D. M.; LONDONO, B. L.; CHRISTOFFERSON, R. C.; MCCracken, M. K.; MORES, C. N. Effect of Dengue-2 Virus infection on protein expression in the salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 431-437, 2014.

CHO, J. S.; PIETRAS, E. M.; GARCIA, N. C.; RAMOS, R. I.; FARZAM, D. M.; MONROE, R. H.; MAGORIEN, J. E.; BLAUVELT, A.; KOLLS, K. J.; CHEUNG, A. L.; CHENG, G.; MODLIN, R. L.; MILLER, L. S. IL-17 is essential for host defence against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 1762-1773, 2010.

COSTA, D. J.; FAVALI, C.; CLARÊNCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; MIRANDA, J. C.; TITUS, R. G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKY, C. I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1298-1305, 2004.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances

in the search for new drugs. **Trends Parasitol.**, v. 9, p.502-508, 2003.

CROSS, M.L.; CUPP, E.W.; ENRIQUEZ, F.J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 690-696, 1994.

DA YU; SHENG, Z.; XU, X.; LI, J.; YANG, H.; LIU, Z.; REES, H. H.; LAI, R. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. **Peptides**, v. 27, p. 31-35, 2006.

DUCLOS, S.; DESJARDINS, M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 365-377, 2000.

FELICETTI, S. A.; THOMAS, R. G.; MCCLELLAN, R. O. Metabolism of two valence states of inhaled antimony in hamsters. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, v. 35, p. 292-300, 1974.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, M. I.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 2051-2088, 2009.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 308-329, 1990.

GODREUIL, S.; LEBAN, N.; PADILLA, A.; HAMEL, R.; LUPLERTLOP, N.; CHAUFFOUR, A.; VITTECOQ, M.; HOH, F.; THOMAS, F.; SOUGAKOFF, W.; LIONNE, C.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Aedesin: structure and antimicrobial activity against multidrug resistant bacterial strains. **Plos One.**, v. 9, p. 1-9, 2014.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 1-8, 2012.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. London: CAB International. 1997. p. 1-22.

GUEDES, M. L. P. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecologia Australis**, v. 16, p. 283-296, 2012.

GÜLER, M. L.; GORHAM, J. D.; HSIEH, C. S.; MACKEY, A. J.; STEEN, R. G.; DIETRICH, W. F.; MURPHY, K. M. Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in Th1 cell development. **Science**, v. 271, p. 984-987, 1996.

HANDMAN, E.; BULLE, V. R. D. Interaction of *Leishmania* with host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 332-334, 2002.

HARBACH, R. E. Mosquito Taxonomic Inventory [internet]. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list>>. Acesso em: 07 mar. 2016.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1505-1509, 1993.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 24, p. 1795-1800, 1999.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1765-1773, 2000.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A.; ABOLHASSANI, M.; TURCO, S. J. *Leishmania major*: reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 114, p. 323-328, 2006.

KIMUTAI, R.; MUSA, A. M.; NJOROGE, S.; OMOLLO, R.; ALVES, F.; HAILU, A.; KHALIL, E. A. G.; DIRO, E.; SOIPEI, P.; MUSA, B.; SALMAN, B.; RITMEIJER, K.; CHAPPUIS, F.; RASHID, J.; MOHAMMED, R. Safety and effectiveness of sodium stibogluconate and paromomycin combination for treatment of visceral leishmaniasis in eastern Africa: Results from Pharmacovigilance programme. **Clin. Drug. Investig.**, v. 37, p. 259-272, 2017.

KISHORE, K.; KUMAR, V.; KESARI, D.; DINESH, D. S.; KUMAR, A. J.; DAS, P.; BHATTACHARYA, S. K. Vector control in leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 467-472, 2006.

KONNO, K.; RANGEL, M.; OLIVEIRA, J. S.; CABRERA, M. P. S.; FONTANA, R.; HIRATA, I. Y.; HIDE, I.; NAKATA, Y.; MORI, K.; KAWANO, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; NETO, J. R. Decoralin, a novel linear cationic α -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. **Peptides**, v. 28, p. 2320-2327, 2007.

KOTSYFAKIS, M.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M.; MATHER, T. N.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 26298-26307, 2006.

KRAMER, C. D.; POOLER, M. N.; COONS, L. B.; COLE, J. A. Tick saliva regulates migrations, phagocytosis and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 665-671, 2011.

KULSHRESTHA, A.; BHANDARI, V.; MUKHOPADHYAY, R.; RAMESH, V.; SUNDAR, S.; MAES, L.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S.; SALOTRA, P. Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitol. Res.**, v. 112, p. 825-828, 2013.

KYCKOVA, K.; KOPECKY, J. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response

against *Borrelia afzelii*. **J. Med. Entomol.**, v. 6, p. 1028-1214, 2006.

LACERDA, A. F.; PELEGRINI, P. B.; OLIVEIRA, D. M.; VASCONCELOS, E. A. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1-11, 2016.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M. C.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 11234-11236, 1991.

LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5442-5445, 1996.

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. I.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L. N.; MINEO, T. W. P.; GUTIERREZ, F. R. S.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, S. J.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric-oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat. Med.**, p. 1-9, 2013.

LIU, Z.; LIU, H.; LIU, X.; WU, X. Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. **Comp. Biochem. Physiol. part B**, v. 149, p. 557-561, 2008.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; FANKHAUSER, J. E.; NELSON, C. S.; SADICK, M. D. Cutaneous host defense leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigotes. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 336-342, 1988.

LÖFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDEL, M.; BACHÈRE, E.; BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 197-202, 2008.

LUPLERTLOP, N.; SURASOMBATPATTANA, P.; PATRAMOOL, S.; DUMAS, E.; WASINPIYAMONGKOL, L.; SAUNE, L.; HAMEL, R.; BERNARD, E.; SERENO, D.; THOMAS, F.; PIQUEMAL, D.; YSSEL, H.; BRIANT, L.; MISSÉ, D. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with Dengue virus. **Plos Pathog.**, v. 7, p. 1-15, 2011.

LU, X.; CHE, Q.; LV, Y.; WANG, M.; LU, Z.; FENG, F.; LIU, J.; YU, H. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Prot. Sci.**, v. 19, p. 392-397, 2009.

MACALUSO, K. R.; WIKEL, S. K. *Dermacentor andersoni*: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by Balb/c mice. **Ann. Med. Trop. Parasitol.**, v. 4, p. 413-427, 2001

MADDUX, M. S.; BARRIERE, S. A review of complications of amphotericin-B therapy: recommendations for prevention and management. **Drug Intell. Clin. Pharm.**, v. 14, p. 177-181, 1980.

MARINOTTI, O.; JAMES, A. A.; RIBEIRO, J. M. C. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Insect. Physiol.**, v. 36, p. 545-548, 1990.

MARSDEN, P. D. Pentavalent Antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 187-188, 1985.

MBOW, M. L.; BLEYENBERG, A. J.; HALL, L. R.; TITUS, R. G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *L. major*. **J. Immunol.**, v. 161, p. 5571-5577, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/11/2015-053-para-substituir-na-pgina.pdf>> Acesso em: 10 Jul. 2016a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/30/2016-021.pdf>> Acesso em: 10 Jul. 2016b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/LV-Casos.pdf>> Acesso em: 3 Set. 2016c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>> Acesso em: 3 Set. 2016d.

MELO, B. M. S.; SILVA, N. L. L.; GOMES, R. S.; NAVEGANTES, K. C.; OLIVEIRA, A. L. B.; ALMEIRA, L.; AZEVEDO, C. H. M.; MONTEIRO, M. C. Bioactive compounds of the salivary glands from *Aedes aegypti* with anti-hemostatic action. **Annu. Res. Rev. Biol.**, v. 2, p. 1-17, 2015.

MONDAL, D.; HASNAIN, M. G.; HOSSAIN, M. S.; GHOSH, D.; GHOSH, P.; HOSSAIN, H.; BAKER, J.; NATH, R.; HAQUE, R.; MATLASHEWSKI, G.; HAMANO, S. Study on safety and efficacy of miltefosine for the treatment of children and adolescent with post-kala-azar dermal leishmaniasis in Bangladesh, and an association of serum vitamin E and exposure to arsenic with post-kala-azar dermal leishmaniasis: an open clinical trial and case – control study protocol. **BJM Open.**, v. 6, p. 1-9, 2015.

MOREAU, P.; MILPIED, N.; FAYETTE, N.; RAMÉE, J. F.; HAROUSSEAU, J. L. Reduced renal toxicity and improved clinical tolerance of amphotericin B mixed with intralipid compared with conventional amphotericin B in neutropenic patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 30, p. 535-541, 1992.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J. Immunol.**, v. 135, p. 2785-2789, 1985.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin. cell. biol.**, v. 4, p. 315-322, 1993.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in Leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

MUSA, A. M.; KHALIL, E. A.; MAHGOUB, F. A.; HAMAD, S.; ELKADARU, A. M.; EL HASSAN, A. M. Efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome) in treatment of persistente post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 99, p. 563-569, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPULOU, B. Leishmaniasis: drugs in clinic, resistance and new developments. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, p. 257-266, 2004.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em: Jul. 2016.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; JÚNIOR, F. E. F. L. Tratamento de leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, p. 107-110, 2011.

PERNICHELLI, T. **Infecção experimental de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) amazonensis* na presença de saliva de *L. longipalpis*: estudo da relação parasite-hospedeiro com ênfase em parâmetros da imunidade**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, 2008.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PICHU, S.; RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from tick, *Ixodes scapularis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 390, p. 511-515, 2009.

PITTA, M. G. R.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; KHEIR, M.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 2379-2387, 2009.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BOZZA, P. T.; DOS REIS, G. A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, V. M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 90, p. 575-82, 2011.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in Gamma Interferon-stimulated murine macrophages: Implications of pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 988-995, 2004.

QURESHI, A. A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R. D.; LERNER, E. A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from

sand fly salivary gland extract. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 665-671, 1996.

RAHMAN, R.; GOYAL, V.; HAQUE, R.; JAMIL, K.; FAIZ, A.; SAMAD, R.; ELLIS, S.; BALASEGARAM, M.; DEN BOER, M.; RIJAL, S.; STRUB-WOURGAFT, N.; ALVES, F.; ALVAR, G.; SHARMA, B. Safety and efficacy of short course combinations regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (LV) in Bangladesh. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, p. 1-15, 2017.

RANGEL, M.; CABRERA, M. P. S.; KAZUMA, K.; ANDO, K.; WANG, X.; KATO, M.; NIHEI, K.; HIRATA, I. Y.; CROSS, T. J.; GARCIA, A. N.; FAQUIM-MAURO, E. L.; FRANZOLIM, M. R.; FUCHINO, H.; MORI-YASUMOTO, K.; SEKITA, S.; KADOWAKI, M.; SATAKE, M.; KONNO, K. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon.**, v. 57, p. 1081-1092, 2011.

RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESUS, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova.**, v. 26, p. 550-555, 2003.

REED, S. G.; ANDRADE, Z. A.; ROTERS, S. B.; INVERSO, J. A.; SADIGURSKY, M. Leishmania mexicana amazonensis infections in resistant inbred mice following removal of the draining lymph node. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 64, p. 8-13, 1986.

REITER, P. Climate change and Mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p. 141-161, 2001.

REUNALA, T.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; LAPPALAINEN, P.; RÄSÄNEN, L.; PALOSUO, T. Immunology and treatment of mosquito bites. **Clin. Exp. Allergy**, v. 20, p. 19-24, 1990.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 79, p. 81-86, 1984.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463-78, 1987.

RIBEIRO, J. M. C.; ARCA, B.; LOMBARDO, F.; CALVO, E.; PHAN, V. M.; CHANDRA, P. K.; WIKEL, S. K. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1-27, 2007.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – A systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 1-17, 2010.

ROSSIGNOL, P. A.; LUEDERS, A. M. Bacteriolytic factor in the salivary glands of *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physiol. part B.**, v. 86, p. 819-822, 1986.

SÁ-NUNES, A.; BAFICA, A.; LUCAS, A. D.; CONRADS, T. P.; VEENSTRA, T. D.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodis scapularis* saliva. **J. Immunol.**, v. 179, p. 1497-1505, 2007.

SÁ-NUNES, A.; OLIVEIRA, C. J. F. Sialogenins and other immunomodulators derived from blood feeding parasites. In: KINI, R. M., MCLANE, M. A., CLEMETSON, K. J., MARKLAND, F. S. JR., MORITA, T. **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside**. Springer, 2010.

SCHNEIDER, B. S.; SOONG, L.; COFFEY, L. L.; STEVENSON, H. L.; McGEE, C. E.; HIGGS, S. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **PLoS One.**, v. 5, p. 1-12, 2010.

SCHOELER, G. B.; WIKEL S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, p. 755-771, 2001.

SILVA JR, P.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of Gomesin, an 18-Residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptide of the Tachyplesin Family. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 33464-33470, 2000.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.41, p.363-382, 1987.

SOARES, M. B. P.; TITUS, R. G.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J. R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- α and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1811-1816, 1998.

SOLOMON, M.; BAUM, S.; BARZILAI, A.; SCOPE, A.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 56, p. 612-616, 2007.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.**, v. 81, p. 321-331, 1995.

SHYAM SUNDAR, M. D.; JHA, T. K.; CHANDRESHWAR P. THAKUR, M. D.; SUJIT K. BHATTACHARYA, M. D. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, p. 2571-2581, 2007.

SUN, D.; MCNICOL, A.; JAMES A. A.; PEN, Z. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic potential aggregation inhibitor. **Platelets**, v. 17, p. 178-184, 2006.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E. H.; SUBRAMANYAN, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper Type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1797-1802, 1993.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F.; DE SOUZA, W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog.**, v. 9, p. 1-4, 2013.

TÉNÉ, N.; BONNAFÉ, E.; BERGER, F.; RIFFLET, A.; GUILHAUDIS, L.; SÉGALAS-MILAZZO, I.; PIPY, B.; COSTE, A.; LEPRINCE, J., TREILHOU, M. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. **Peptides**, v. 79, p. 103-113, 2016.

THEODOS, C. M.; TITUS, R. G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. **Parasite Immunol.**, v. 15, p. 481-487, 1993.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary gland lysates from sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1988.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P.; NAKAMURA. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int. Infect. Dis.**, v. 15, p. 525-532, 2011.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.**, v. 8, p. 335-344, 2012.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p. 421-428, 2005.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry in macrophages. **J. Immunol.**, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

WANASEN, N.; NUSSENZVEIG, R. H.; CHAMPAGNE, D. E.; SOONG, L.; HIGGS, S. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, p. 191-199, 2004.

WASSERMAN, H. A.; SINGH, S.; CHAMPAGNE, D. E. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti* modulates murine lymphocyte function. **Parasite Immunol.**, v. 26, p. 295-306, 2004.

WASSERMAN, H. A. **Modulation of mammalian immune effector cell functions by saliva of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2005. 168 p. [Dissertation] – University of Georgia. Athens, Georgia, 2005.

WHEAT, W. H.; PAUKEN, K. E.; MORRIS, R. V.; TITUS, R. G. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, an cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediate cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **J. Immunol.**, v. 180, p. 8286-8298, 2008.

WU, J.; MU, L.; ZHUANG, L.; HAN, Y.; LIU, T.; LI, J.; YANG, Y.; YANG, H.; WEI, L. A cecropin-like antimicrobial peptide with anti-inflammatory activity from black fly salivary glands. **Parasit. Vectors**, v. 8, p. 561, 2015.

WU, Q.; MARTIN, R. J.; RINO, J. G.; BREED, R.; TORRES, R. M.; CHU, H. W. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumonia* infection. **Microb. Infect.**, v. 9, p. 78-86,

2007.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 810-814, 2001.

ZHANG, H.; ZHANG, W.; WANG, X.; ZHOU, Y.; WANG, N.; ZHOU, J. Identification of a cysteine-rich antimicrobial peptide from salivary gland of the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Peptides**, v. 32, p. 441-446, 2011.