Fernanda de Camargo Franceschini

Avaliação da especificidade do efeito da saliva do flebotomíneo vetor sobre a infectividade da espécie de *Leishmania*: infecção experimental de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* com a saliva de *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexus* em camundongo BALB/c

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Francesquini, Fernanda de Camargo

Avaliação da especificidade do efeito da saliva do flebotomíneo vetor sobre a infectividade da espécie de *Leishmania*: infecção experimental de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* com a saliva de *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* em camundongo BALB/c / Fernanda de Camargo Francesquini. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Aos meus pais, pelo exemplo, apoio e amor incondicional

Agradecimentos

À minha orientadora Márcia Dalastra Laurenti, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos, compreensão e incentivo nos momentos em que mais precisei. Sou imensamente grata por todas as oportunidades concedidas e amizade conquistada ao longo desses anos.

Aos meus queridos pais, Fernando e Sueli, que sempre me apoiaram não medindo esforços para que eu perseguisse os meus sonhos, pelo amor, carinho e dedicação de toda uma vida, nenhuma das minhas conquistas seria possível sem o incentivo de vocês.

Aos meus irmãos Emilio e Felipe, pelo amor, apoio e compreensão e às minhas queridas “agregadas”, Patrícia e Marina, que já são parte da minha família.

Ao meu namorado Luiz Felipe por sempre estar ao meu lado, pela paciência, amor e dedicação e à sua família, pelo carinho e torcida.

Aos meus avôs Aristides, Iracema, Pedro e Aparecida, pelos lindos exemplos de vida e a toda minha família pelo apoio e carinho.

Aos meus padrinhos Selma e Márcio, pela presença constante em minha vida e pelo carinho e amor que sempre me dedicaram.

A todos os queridos amigos conquistados ao longo da minha trajetória no LIM 50, pessoas incríveis que me ensinaram muito e a quem eu sou imensamente grata, este trabalho não existiria sem a ajuda de todos vocês: Alexis, Ana Kely, Bruno, Carol, Cláudia, Edson, Fábio, Felipe, Fernanda Rodrigues, Izildinha, Joyce, Lia, Malu, Marcela, Mariana, Marina, Thaís Bruna e Vânia.

Em especial, agradeço à Thaise, não só por ter se tornado uma grande amiga, cuja amizade espero levar para vida inteira, mas principalmente por sempre ter me ajudado nos momentos difíceis, inclusive em fins de semana, feriados e extensas noites! Não tenho palavras para agradecer sua generosidade!

A todos os meus amigos, pela torcida, amizade, e apoio, obrigada por fazerem parte da minha vida!

Às minhas amigas irmãs, Carol, Grazielle e Thammy por me ensinarem o significado de uma verdadeira amizade.

Aos amigos e colegas da CETESB, pela compreensão e apoio ao longo dessa trajetória.

Às minhas amigas da “Bubble” por tantas doces lembranças e por sempre torcerem por mim mesmo à distância.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, pela imensa colaboração neste trabalho, pela confiança, pelos ensinamentos e incentivo.

À equipe do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), pela gentil acolhida, pela ajuda na coleta dos flebotomíneos e na obtenção das glândulas salivares.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela confiança e por permitir minha entrada no LIM 50.

Ao Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50 HCFMUSP) do Departamento de Patologia da FMUSP e a CAPES, FAPESP e CNPQ.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos gerais das leishmanioses	2
1.2	Leishmaniose tegumentar americana	4
1.3	Imunidade na leishmaniose tegumentar americana.....	6
1.3.1	Imunidade Inata	6
1.3.2	Imunidade adquirida – O papel dos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	9
1.4	Papel da saliva do vetor na infecção por Leishmania	13
2	OBJETIVOS.....	19
3	MÉTODOS.....	21
3.1	Animais	22
3.2	Parasitos	22
3.3	Obtenção da glândula salivar.....	23
3.4	Preparo do lisado de glândula salivar - LGS.....	24
3.5	Produção de antígeno total de formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis e Leishmania (V.) braziliensis para análise da resposta imune celular	24
3.6	Infecção experimental	25
3.7	Evolução da infecção	25
3.8	Análise Histopatológica.....	26
3.9	Determinação da carga parasitária	26
3.10	Avaliação da imunidade celular.....	28
3.10.1	Caracterização da população de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ através da citometria de fluxo.....	28
3.11	Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo por ELISA	31
3.12	Análise Estatística.....	32

4	RESULTADOS	33
4.1	Evolução da Infecção	34
4.1.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	34
4.1.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
4.2	Análise Histopatológica das Lesões	36
4.2.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	36
4.2.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	40
4.3	Análise da carga parasitária	43
4.3.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	43
4.3.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	44
4.4	Quantificação da população de Linfócitos T em linfonodo de drenagem	45
4.4.1	Linfócitos CD4 ⁺	45
4.4.1.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	45
4.4.1.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	47
4.4.2	Linfócitos CD8 ⁺	49
4.4.2.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
4.4.2.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	51
4.5	Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo	54
4.5.1	Produção de IL-10	54
4.5.1.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
4.5.1.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	55
4.5.2	Produção de IL-12	56
4.5.2.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
4.5.2.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	57
4.5.3	Produção de IL-4	59
4.5.3.1	Infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	59
4.5.3.2	Infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	73
7	ANEXOS	75
7.1	Aprovação em Comitê de Ética	76
8	REFERÊNCIAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

< - menor

> - maior

µg - Micrograma (unidade de medida)

µL – Microlitro (unidade de medida volumétrica)

µM – Micro Molar (unidade de medida de concentração)

µm – Micrometro (unidade de medida)

°C – Grau centesimal, centígrado ou Celsius

BSA – Soro albumina bovina

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CO₂ – Dióxido de carbono

Dr. – Doutor

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

et al. – e outros

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC-A – Do inglês: forward scatter, dispersão frontal da luz que mede a área

FSC-H – Do inglês: forward scatter, dispersão frontal da luz que mede a altura

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

HCl – Ácido Clorídrico

IFN-γ – Interferon gamma

IL – Interleucina

kDa - Dalton, unidade de massa atômica

LCAD - Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa

LCDB - Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LM - Leishmaniose Mucosa

LIM-50 – Laboratório de Investigação Médica 50

LPG - Lipofosfoglicano

LGS - Lisado de Glândula Salivar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

mg – Miligramas (unidade de medida)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL – Mililitro (unidade de medida)

mM- Milimolar (unidade de medida)

mm² – Milímetro quadrado (unidade de medida)

NaCl – Cloreto de sódio

NaNO₃ – Nitrato de sódio

nm – Nanômetro (unidade de medida)

NO – Óxido nítrico

p – p valor, nível de significância

PA - Pará

PBS – tampão salino fosfatado

PBST – tampão salino fosfatado com Tween

PerCP – Proteína clorofilperidina

PFA – Paraformaldeído

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI – Pós-infecção

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura originalmente desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*

SBF – Soro fetal bovino

TA – Temperatura ambiente

TGF- β – Fator de crescimento tumoral beta

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Tris – Hidroximetil amino metano

UI – Unidade internacional

WHO – Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas promastigotas em meio de cultura	3
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.	4
Figura 3: Estratégia de definição de janelas (gate) para análise da população de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	30
Figura 4: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	35
Figura 5: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	36
Figura 6: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c	39
Figura 7: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c	42
Figura 8: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	43
Figura 9: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	45
Figura 10: Porcentagem de Linfócitos CD4 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	47
Figura 11: Porcentagem de Linfócitos CD4 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	49
Figura 12: Porcentagem de Linfócitos CD8 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	51
Figura 13: Porcentagem de Linfócitos CD8 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i>	53

Figura 14: Concentração de IL-10 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus* 55

Figura 15: Concentração de IL-10 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. 56

Figura 16: Concentração de IL-12 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus* 57

Figura 17: Concentração de IL-12 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. 58

Figura 18: Concentração de IL-4 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. 60

Figura 19: Concentração de IL-4 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus* 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pré-diluição utilizada para a realização do ensaio de diluição limitante.....	27
Tabela 2: Descrição de anticorpos monoclonais utilizados para análise da população de linfócitos CD3, CD4 e CD8.	29
Tabela 3: Análise histopatológica semi-quantitativa das lesões cutâneas desencadeadas pela infecção de <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i> em camundongos BALB/c.	38
Tabela 4: Análise histopatológica semi-quantitativa das lesões cutâneas desencadeadas pela infecção de <i>L. (V.) braziliensis</i> na ausência de LGS e na presença de LGS de <i>L. flaviscutellata</i> e de <i>L. (P.) complexus</i> em camundongos BALB/c.	41

RESUMO

No ciclo natural de transmissão da leishmaniose, as fêmeas infectadas de flebotomíneos regurgitam promastigotas na pele de hospedeiro junto com a saliva. Tem sido descrito que componentes da saliva do vetor possuem propriedades imunomodulatórias que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro, contudo a maior parte dos estudos emprega lisado de glândula salivar (LGS) de vetores colonizados em laboratório. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a especificidade do LGS dos flebotomíneos *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* capturados no campo na infectividade de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Camundongos BALB/c foram inoculados no coxim plantar traseiro com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na ausência ou presença do LGS de *L. flaviscutellata*, e *L. (P.) complexus*. A evolução da infecção foi acompanhada semanalmente e biópsias do ponto de inoculação foram coletadas para análise histopatológica e determinação de carga parasitária na 4ª e 8ª semana pós-infecção (PI); e o linfonodo de drenagem para caracterização de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. Células de linfonodo de drenagem foram também cultivadas, com estímulo homólogo, para quantificação de citocinas (IL-10, IL-12 e IL-4) no sobrenadante. A infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* não se mostrou exacerbada nos grupos co-inoculados com o LGS de ambas as espécies em relação ao grupo controle, inoculado somente com o parasito. O tamanho de lesão e carga parasitária do grupo controle foi maior ou igual aos grupos com saliva. Na infecção por *L. (L.) amazonensis* houve diminuição dos linfócitos CD4⁺ e aumento na população de linfócitos CD8⁺ enquanto na infecção por *L. (V.) braziliensis* houve manutenção da população de linfócitos CD4⁺ e aumento de linfócitos CD8⁺ em todos os grupos quando comparados ao grupo saudável. A produção de IL-10 e IL-12, não diferiram entre os grupos, assim como a produção de IL-4 no grupo infectado por *L. (V.) braziliensis*. No entanto, nos grupos infectados apenas com *L. (L.) amazonensis* e com saliva de *L. flaviscutellata*, foi observada uma maior produção de IL-4 em relação ao grupo saudável. De forma geral, os resultados mostraram que a saliva de *L. flaviscutellata* e de *Lutzomyia (P.) complexus*, no seu binômio natural vetor/parasito ou não, não favoreceram o estabelecimento da infecção causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c.

Descritores: Lisado de glândula salivar, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, leishmaniose experimental murina.

SUMMARY

During the natural transmission of leishmaniasis, the infected female phlebotomine regurgitates promastigotes into the host's skin together with the saliva. It has been reported that components of vector saliva contain immunomodulatory properties that facilitate the establishment of infection in the host, however the most studies employed salivary gland lysate (SGL) of laboratory colonized vectors. Thus, the main objective of this study was to evaluate the specificity of SGL of the phlebotomines *Lutzomyia flaviscutellata* and *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* caught in the field in the infectivity of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*. BALB/c mice were inoculated in the hind footpad with promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* in the absence or presence of *L. flaviscutellata*, and *L. (P.) complexus* SGL. The evolution of the lesion size was evaluated weekly and biopsies from the site of infection were collected for histopathological analysis and determination of parasite load in the 4th and 8th week post infection (PI), and the draining lymph node to characterize subsets of T cells by flow cytometry. The draining lymph nodes cells were also cultured with specific antigen to determine the cytokines (IL-10, IL-12 and IL-4) in the supernatant. *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* infection was not exacerbated in the groups co-inoculated with the SGL of both species in the control group, only inoculated with the parasite. The lesion size and parasite burden of the control group was higher or equal to the groups with saliva. In *L. (L.) amazonensis* infection there was a decrease of CD4⁺ cells and an increase in the population of CD8⁺ cells while in *L. (V.) braziliensis* infection there was a maintenance of CD4⁺ cells and an increase in the population of CD8⁺ cells in all groups compared with the health group. The production of IL-10 and IL-12, did not differ between groups, as well as the production of IL-4 in the group infected by *L. (V.) braziliensis*. However, in the groups infected only with *L. (L.) amazonensis* in the presence of *L. flaviscutellata* saliva, it was observed a higher production of IL-4 in relation with the health group. As a whole, the results show that the saliva of *L. flaviscutellata* and *L. (P.) complexus*, in the natural vector/parasite binomium or not, did not favor the establishment of the infection caused by *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* in BALB/c mice.

Descriptors: Salivary gland lysate, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Murine experimental leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são representadas por um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, de evolução crônica, causadas por diferentes espécies de parasitos protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. O ciclo biológico destes parasitos ocorre em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos, como o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (Herrer; Christensen, 1976; Braga *et al.*, 1986; Silveira *et al.*, 1982; Souza *et al.*, 2005; WHO, 2010). Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (WHO, 2010).

A infecção no hospedeiro vertebrado se estabelece no momento em que a fêmea do flebotomíneo infectada, ao realizar o repasto sanguíneo, regurgita na pele do mamífero as formas promastigotas metacíclicas do parasito que apresentam morfologia fusiforme e um longo flagelo (Mohiuddin, 1952; Wheeler *et al.*, 2011) (Figura 1-A). Durante o repasto sanguíneo ocorre a inoculação de grande parte do conteúdo salivar do inseto vetor, que irá modular a resposta imune local. Nesta ocasião, acredita-se que a maioria dos parasitos é eliminada pela ação lítica do sistema complemento e pela ação dos neutrófilos e eosinófilos presentes no sangue do hospedeiro que flui para o ponto da pele lacerada pela probóscida do inseto vetor (Laurenti *et al.*, 1996). Entretanto, algumas formas promastigotas que escapam dos mecanismos de defesa

inespecíficos do hospedeiro são fagocitadas pelos macrófagos da pele, alojando-se no interior dos vacúolos parasitóforos, para em seguida se transformarem em formas amastigotas com formato arredondado e sem flagelo aparente (Figura 1-B). Essa modificação é necessária para que os parasitos possam se adaptar ao novo microambiente fagolisossomal (Naderer; McConville, 2008).

Figura 1: Formas promastigotas em meio de cultura (A) e formas amastigotas em *inprint* de baço de hamster infectado cronicamente, (B) com *Leishmania* sp. Coradas com Giemsa no aumento de 1000x. Fonte: figura A – Bruno Luiz Soares Campos, figura B – Thaíse Yumie Tomokane.

Após sucessivas divisões binárias, os inúmeros parasitos provocam um aumento da pressão intracitoplasmática no interior do macrófago, rompendo, assim, a célula hospedeira. A seguir, as formas amastigotas extracelulares são fagocitadas por outros macrófagos, mantendo o ciclo infeccioso no hospedeiro (Lainson & Shaw, 1987). Quando o inseto vetor saudável realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo poderá se infectar fechando seu ciclo biológico (Figura 2).

Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* sp. – (1) representa repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos infectadas e início da infecção em hospedeiros vertebrados; após a infecção as formas promastigotas são fagocitadas por células apresentadoras de antígeno e se diferenciam em amastigotas (2) que se multiplicam ativamente nas células hospedeiras causando a ruptura destas células (3). Após novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, as fêmeas do flebótomo podem ingerir células infectadas (4) que por ação de uma série de enzimas digestivas do inseto vetor serão rompidas liberando os amastigotas (5), que novamente se diferenciarão em promastigotas (6), se ligarão a superfície intestinal destes insetos, multiplicando-se (7) sendo então capaz de infectar novo hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (1). Fonte: Center for Disease Control adaptado por Ana Kely de Carvalho.

1.2 Leishmaniose tegumentar americana

A Leishmaniose cutânea ou Leishmaniose tegumentar americana – LTA (no Novo Mundo) é uma doença caracterizada principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunogenéticos do hospedeiro, por lesão do tecido mucoso nasobucofaríngeo.

No Brasil, são reconhecidas até o presente momento sete espécies causadoras de doença cutânea: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* (Lainson, 1997; Silveira *et al.*, 2001; WHO, 2010), sendo que a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis* são as espécies que causam lesões de maior interesse médico no Brasil, devido à gravidade e alta incidência, respectivamente.

A *L. (V.) braziliensis*, é o agente de LTA de maior prevalência no homem. É responsável pela forma clínica localizada, que pode evoluir para a forma severa de leishmaniose cutâneo-mucosa que ocorre comumente na forma de recidiva da doença, às vezes anos após a cura da lesão primária (Lessa *et al.*, 2007). Sua distribuição geográfica é bastante extensa, desde a América Central até a América do Sul, atravessando o Brasil e se estendendo até o norte da Argentina. No Brasil, várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas vetores desta espécie do parasito, entre elas destacam-se: *Lutzomyia intermedia*, *L. whitmani*, *Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei* e *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* (Rangel *et al.*, 1984; Ryan *et al.*, 1987; Gomes, 1992; de Souza *et al.*, 1996). O fato destas espécies serem antropofílicas contribui para a alta prevalência da infecção humana por este agente (Silveira, 2001). Seus reservatórios naturais são roedores silvestres dos gêneros *Bolomys* e *Nectomys*, roedores sinantrópicos como o *Rattus rattus* e outras espécies como *Canis familiaris* (Mayrink *et al.*, 1979; Brandão-Filho *et al.*, 2003; WHO, 2010).

A *L. (L.) amazonensis* é uma espécie de importância no cenário da LTA no Brasil, apesar de sua prevalência não ser muito alta entre os casos humanos. Este parasito é responsável pela forma cutânea localizada (Moraes; Silveira, 1994), porém pode causar também as formas leishmaniose cutânea disseminada borderline e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (Silveira, *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2005). Ocorre em toda a região Amazônica brasileira e em países vizinhos. Os principais insetos vetores associados a esta espécie são os flebotomíneos *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* (Ready; 2013), sendo *L. flaviscutellata* considerado como principal vetor apesar de apresentar hábitos alimentares pouco antropofílicos, por esta razão *L. (L.) amazonensis* tem uma baixa prevalência entre os casos de LTA (Rebelo *et al.*, 1999). Os reservatórios naturais são principalmente espécies de roedores silvestres dos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys* e *Wiedomys* dos quais o parasito tem sido isolado somente da pele (Lainson *et al.*, 1981; WHO, 2010).

1.3 Imunidade na leishmaniose tegumentar americana

1.3.1 Imunidade Inata

A infecção por parasitos do gênero *Leishmania* desencadeia uma resposta inflamatória aguda no hospedeiro vertebrado, com a participação de componentes humorais e celulares da resposta imune inata tais como: proteínas do sistema complemento, mediadores pró-inflamatórios, assim como os neutrófilos e as células apresentadoras de antígenos. A partir da interação destes componentes com o parasito ocorre o estímulo de uma resposta imune

celular específica com a participação de linfócitos podendo levar a um quadro de resistência ou suscetibilidade a infecção.

A introdução de formas promastigotas na derme através da picada do flebotomíneo leva à ativação do sistema complemento pela via clássica, alternativa ou das lectinas (Mosser; Edelson, 1984; Navin *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1994; Dominguez; Toraño, 1999) o que pode induzir a morte de parasitos, em especial das espécies cutâneas, que são mais sensíveis à lise pelo complemento. Durante este processo, ocorre o espessamento do glicocálice na membrana das formas promastigotas, o qual é basicamente composto por lipofosfoglicano (LPG), da mesma maneira que ocorre o aumento do número de metaloproteína de 63kDa (gp63), permitindo que os parasitos se tornem mais resistentes a ação do sistema complemento (Talamá-Rohana *et al.*, 1990).

A resistência ao complemento é basicamente efetuada pela inativação do fragmento C3b do complemento ocasionada pela ação da gp63, gerando o componente inativo do complemento, o C3bi, capaz de se ligar à superfície das formas promastigotas. Os parasitos então opsonizados pelo C3bi, são capazes de se ligar aos receptores do complemento, como o CR1 e ou CR3, presente em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos. Quando o parasito utiliza principalmente estes receptores da membrana do macrófago para a sua adesão e internalização, um baixo metabolismo oxidativo da célula hospedeira é desencadeado constituindo, assim, um mecanismo essencial para a sobrevivência intracelular da forma promastigota infectiva (Wright; Silverstein, 1983; Bogdan *et al.*, 1990).

Embora o parasito se beneficie do sistema complemento para entrar na célula hospedeira, este componente da imunidade inata também pode desempenhar um importante papel na eliminação de alguns parasitos. Tal função protetora e lítica contra as formas promastigotas foi observada em camundongos BALB/c depletados de complemento, que na fase inicial da infecção por *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma menor resposta inflamatória e alto parasitismo (Laurenti *et al.*, 2004).

Quanto aos componentes celulares da resposta inflamatória aguda inicial, os leucócitos polimorfonucleares mostram-se importantes na fagocitose dos parasitos, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento. Na década de 80, os relatos *in vitro* apontavam para um papel importante dos neutrófilos na morte de parasitos por ativação do sistema microbicida dependente de oxigênio (Pearson; Steigbigel, 1981). Da mesma maneira, foi também demonstrado que os eosinófilos fagocitavam e destruíam promastigotas de *L. (L.) donovani* por mecanismos microbicidas destas células e/ou outros constituintes lisossomais (Pearson *et al.*, 1987). Comparativamente, no entanto, foi demonstrado que os neutrófilos foram mais eficazes no processo de fagocitose, sem opsonização específica por soro imune, das formas amastigotas de *L. (L.) donovani* seguidos dos monócitos e dos eosinófilos (Chang, 1981).

No entanto, estudos recentes apontam uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com parasitos do gênero *Leishmania*, chamada de “Cavalo de Tróia” (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Peters e colaboradores em 2008 mostraram através de microscopia intravital e citometria, que

promastigotas de *Leishmania major* invadem eficientemente neutrófilos, que são recrutados para o local da picada do vetor ou da inoculação experimental, e que os parasitos permanecem viáveis dentro destas células. A depleção de neutrófilos reduziu a habilidade dos parasitos em estabelecer uma infecção produtiva. Desta maneira, os neutrófilos seriam células hospedeiras parasitos nos macrófagos, que facilmente ingerem os neutrófilos apoptóticos infectados, sem ativar mecanismos microbicidas nestas células (Rogers *et al.*, 2009).

1.3.2 Imunidade adquirida – O papel dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

O modelo de imunidade na leishmaniose cutânea murina causada pela infecção por *Leishmania major* é amplamente conhecido. Camundongos C57BL/6 mostram um perfil de resistência à infecção por *L. major*, o que foi correlacionado com um fenótipo de células T CD4⁺ do tipo Th1, produtoras principalmente de IFN- γ . Já camundongos BALB/c mostram um perfil de suscetibilidade à infecção relacionado ao fenótipo de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 produtores principalmente de IL-4, IL-5 e IL-10 (Reiner; Locksley, 1995; Sacks; Noben-Trauth, 2002).

No entanto, estudos demonstraram que o controle da infecção pode diferir significativamente em relação à espécie infectante. Estudos com camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) amazonensis* apresentaram progressão da doença, com aumento crescente do tamanho da lesão e coexistência de respostas imunológicas antagônicas, com produção de IL-10 e de IFN- γ (Laurenti *et al.*, 2009a). Já camundongos BALB/c com depleção de linfócitos T CD4⁺, que são altamente suscetíveis a infecção por *L. (L.) amazonensis*, apresentaram redução do tamanho de lesão, da carga

parasitária e da incidência de metástase, demonstrando o importante papel dos linfócitos T CD4⁺ na progressão da infecção por esta espécie de parasito (Silva *et al.*, 1994). Seguindo o mesmo perfil, camundongos C57BL/6 deficientes na produção de moléculas de MHC-II, o que torna as células T CD4⁺ não funcionais, não desenvolveram lesão e mostraram redução no parasitismo. A inabilidade de montar uma resposta inflamatória se correlacionou com a falha na produção de citocinas que leva ao recrutamento de monócitos e granulócitos (Soong *et al.*, 1997). Assim, estes parasitos não são capazes de produzir uma forte resposta Th2, como postulado no modelo de suscetibilidade com *L. major*, mas produzem comparáveis níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 (Ji *et al.*, 2002), apresentando desta forma uma resposta imunológica mista. Contudo, camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* mostram-se relativamente resistentes à infecção graças à uma potente resposta imune do tipo Th1 com a produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10 (DeKrey *et al.*, 1998). Tais relatos evidenciam as diferenças na resposta imunológica causada por espécies de parasito do Novo Mundo e como estas diferem do padrão de resistência e suscetibilidade bem definido na infecção por *L. major*.

Entretanto, a resistência à infecção é dependente da habilidade das células T CD4⁺ secretarem IFN- γ , que leva à ativação dos macrófagos, resultando na produção de óxido nítrico que tem a capacidade de destruir os parasitos intracelulares (Bogdan, 2001). Todavia, vale ressaltar que em algumas circunstâncias, o IFN- γ pode desempenhar um papel ambíguo na infecção por *L. (L.) amazonensis*, uma vez em sinergia com citocinas do tipo Th1 (IL-12 ou

TNF- α) pode proteger o camundongo contra a infecção, mas na ausência desta sinergia, promove a replicação do parasito, revelando uma surpreendente capacidade da *L. (L.) amazonensis* em usar mecanismos de defesa do hospedeiro para benefício próprio (Qi *et al.*, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) em humanos, causada tanto por *L. (L.) amazonensis* quanto por *L. (V.) braziliensis*, assume uma posição central no espectro da doença e mostram boa resposta ao tratamento com as drogas habituais, face ao seu perfil imunológico ser predominantemente CD4⁺Th1, o que lhe confere um alto grau de resistência imunológica à infecção. Entretanto, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imunológico do hospedeiro, algumas infecções, não totalmente controladas pelos mecanismos de imunidade celular podem evoluir para as formas polares da doença dentro do espectro clínico. No caso de infecção por *L. (V.) braziliensis*, a infecção pode evoluir para o polo hiperérgico de resposta do hospedeiro, representado pela forma de leishmaniose mucosa (LM), com perfil imunológico fortemente CD4⁺ Th1; enquanto que, no caso de infecção por *L. (L.) amazonensis*, a infecção pode evoluir para o polo hipoérgico, representado pela forma de leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), caracterizada por um perfil imunológico nitidamente CD4⁺ Th2 (Silveira *et al.*, 2009). Entre a forma central LCL e as duas formas polares LM e LCAD, as infecções podem passar por uma forma intermediária chamada de leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB), durante a qual a imunidade celular dos pacientes apresenta-se parcialmente deprimida ou inibida, porém, com certo grau de predomínio da resposta CD4⁺ Th1 em relação da CD4⁺ Th2, motivo

pelo qual se atribui a denominação específica *borderline* (Silveira, 2001; Silveira *et al.*, 2004)

Os linfócitos T CD8⁺ também desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune e são tidos como essenciais na imunidade frente à reinfecção de camundongos por *L. (L.) major* (Müller *et al.*, 1993) Os linfócitos T CD8⁺ são subdivididos em linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1) e T citotóxicos 2 (Tc2). As células Tc1 são capazes de destruir células infectadas por meio de perforinas e/ou de mecanismos associados à expressão de Fas/CD95L e uma forte produção de IFN- γ e TNF- α ; enquanto que as Tc2 destroem microorganismos intracelulares pela via das perforinas e granzimas, sendo capazes de produzir principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (Dobrzanski *et al.*, 2004).

As células T CD8⁺ estão relacionadas com a eliminação do parasito e com o estabelecimento e manutenção da imunidade contra a infecção por *L. (L.) major* além de participar diretamente na produção de IFN- γ e na regulação da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (Müller *et al.*, 1991; Herath *et al.*, 2003). De Moura *et al.* (2005) utilizando inóculo de baixa concentração de *L. (V.) braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c demonstraram que a população de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no linfonodo de drenagem aumenta com o tempo de infecção, enquanto que a população destas células produtoras IL-4 e IL-10 permanecem inalteradas durante o curso da infecção. Similarmente, linfócitos de pacientes diagnosticados com leishmaniose que apresentaram cura clínica, quando cultivados *in vitro* na presença de antígeno de *L. (V.) braziliensis*, mostraram uma maior proliferação

de linfócitos T CD8⁺ e aumento de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas (Da-Cruz *et al.*, 1994) o que indica o importante papel dos linfócitos T CD8⁺ na resolução da infecção por espécies do gênero *Leishmania*.

1.4 Papel da saliva do vetor na infecção por *Leishmania*

Os vetores hematófagos possuem em sua saliva componentes farmacologicamente ativos que facilitam o repasto sanguíneo, auxiliam a localização dos vasos sanguíneos além de romper processos homeostáticos do hospedeiro (Ribeiro, 1987; Titus e Ribeiro, 1990; Ribeiro, 1995), reduzindo tanto a imunidade inata quanto a adquirida e auxiliando no estabelecimento do patógeno infectante (Ribeiro, 1987; Ribeiro, 1989; Champagne, 1994; Wikel, 1999 a; Wikel, 1999b).

O primeiro relato sobre o efeito da saliva do inseto vetor na infecção por *Leishmania* data de 1988, quando Titus e Ribeiro mostraram que a inoculação de *L. major* na presença de lisado de glândula salivar (LGS) de *L. longipalpis* promovia lesões cutâneas muito maiores nos camundongos e com um número muito superior de parasitos quando comparadas aos animais controle. Os mesmos pesquisadores observaram logo após que a infecção nestas condições podia também ser estabelecida de forma eficaz com um número muito reduzido de leishmânias em oposição ao inóculo contendo apenas o parasito (Titus & Ribeiro 1990).

Outros trabalhos se seguiram corroborando o efeito de LGS de *L. longipalpis* no aumento da gravidade de infecções de camundongos causadas

por *L. major* (Morris *et al.*, 2001), assim como por outras espécies do parasito. *L. (V.) braziliensis*, que produz lesões que regredem espontaneamente mesmo em camundongos BALB/c altamente sensíveis a outras espécies do protozoário, determinava lesões maiores, de longa duração e intenso parasitismo quando co-injetada com LGS de *L. longipalpis* (Samuelson *et al.*, 1991; Lima & Titus, 1996; Donnelly *et al.*, 1998). A gravidade da lesão e o número de parasitos aumentavam também em infecções causadas por *L. mexicana amazonensis* (Theodos *et al.*, 1991) e *L. (L.) amazonensis* (Norsworthy *et al.*, 2004; Thiakaki *et al.*, 2005).

A saliva exerce um papel fundamental no estabelecimento do parasito através de suas propriedades vasodilatadora e antiplaquetária que minimizam os processos hemostáticos do hospedeiro (Ribeiro, 1989; Ribeiro *et al.*, 1999). Além disso, Charlab e colaboradores (1993, 1995) demonstraram que a saliva do vetor exerce ação direta sobre o parasito, influenciando sua diferenciação e virulência.

Os macrófagos do hospedeiro têm como mecanismo de defesa a produção de óxido nítrico (NO) e outros metabólitos derivados do oxigênio além do papel de apresentação de antígenos para os linfócitos T. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que este papel foi comprometido em macrófagos de camundongos na presença de LGS de *L. longipalpis*. Tais macrófagos tornaram-se incapazes de apresentar antígenos, prejudicando a indução da proliferação de linfócitos T específicos ao parasito, ficaram refratários à ativação por IFN- γ , citocina que ativa os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, e reduziram drasticamente a produção de peróxido de hidrogênio

e óxido nítrico, principais moléculas leishmanicidas (Titus & Ribeiro, 1990; Theodos & Titus, 1993; Hall & Titus, 1995). Dados similares também foram observados com LGS de vetores do Velho Mundo, uma vez que células mononucleares humanas quando expostas ao LGS de *Phlebotomus papatasi* produziram menores níveis de IFN- γ e maiores de IL-6 (Rogers & Titus, 2003). Já o LGS de *Phlebotomus duboscqi*, vetor de *L. major* no Quênia, é quimiotático para macrófagos e esta atração pode fazer parte dos mecanismos pelos quais a saliva do vetor garante o sucesso do parasitismo destas células no hospedeiro susceptível ao protozoário (Anjili *et al.*, 1995).

Os efeitos *in vivo* do LGS de *L. longipalpis* ou de *P. papatasi* na resposta imune em infecções experimentais de camundongos mostram já um quadro bem mais complexo e heterogêneo de resultados, que dependem da espécie do parasito inoculado e a linhagem experimental do animal. A resistência de camundongos C57BL/6, CBA e Belkaid *et al.*, 1998; Mbow *et al.*, 1998). O LGS de *L. longipalpis*, no entanto C3H a infecção por *L. major* decorre da produção de citocinas associadas à resposta Th1, principalmente IFN- γ e TNF- α , enquanto as associadas à Th2, em especial IL-4, causam a progressão da doença em camundongos BALB/c. A presença de LGS de *P. papatasi* no inóculo promove aumento dos níveis de IL-4, mas não de IL-10 e TGF- β , e uma diminuição de IFN- γ , IL-12 e óxido nítrico sintetase, padrão este associado ao aumento expressivo das lesões cutâneas induzido pela saliva (Belkaid *et al.*, 1998; Mbow *et al.*, 1998). O LGS de *L. longipalpis*, no entanto, aumenta a produção de IL-10 em camundongos BALB/c inoculados com *L. major* (Monteiro *et al.*, 2007).

O controle da infecção causada por *L. (V.) braziliensis*, por sua vez, é dependente da geração de IFN- γ , IL-12 e da baixa produção de IL-4 (DeKrey *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2007). O LGS de *L. longipalpis* determina um aumento em torno de três vezes nos níveis de IL-4 em camundongos BALB/c quando co-inoculado com *L. (V.) braziliensis*, promovendo lesões duradouras e maiores em relação aos animais controles (Lima & Titus, 1996).

Por outro lado, a infecção causada por *L. (L.) amazonensis* produz lesões cutâneas progressivas na maioria das linhagens isogênicas de camundongos e não há evidência de uma resposta Th1/Th2 polarizada como a vista na infecção por *L. major* (Ji *et al.*, 2002). Entre outros fatores, a IL-10 tem um papel importante no comprometimento da resposta imune do hospedeiro (Ji *et al.*, 2003). A introdução de LGS de *L. longipalpis* ao inóculo promove elevação significativa dos níveis de IL-10, fato associado ao aumento da infectividade do parasito e aumento das lesões (Norsworthy *et al.*, 2004).

A grande maioria dos experimentos que mostram o efeito exacerbador da saliva do flebotomíneo vetor na infecção de parasitos do gênero *Leishmania* foram desenvolvidos empregando-se LGS de vetor colonizado em laboratório. Estudos recentes mostram que a infecção de *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 na presença de LGS de *L. longipalpis* capturado em campo não exacerba a lesão tanto quanto o LGS de *L. longipalpis* colonizado em laboratório (Laurenti *et al.*, 2009a). Os animais co-inoculados com LGS de vetor capturado no campo induziam uma lesão menor, processo inflamatório mais discreto com menor parasitismo e produção de baixos níveis de citocinas

associadas à resposta de suscetibilidade, quando comparada a infecção com LGS de vetor colonizado em laboratório (Laurenti *et al.*, 2009b).

Além disso, praticamente todos os trabalhos realizados com LGS não levam em conta o efeito da saliva no binômio natural vetor/parasito. Tal efeito foi estudado por Paranhos-Silva em 2003, empregando-se LGS de *L. longipalpis* em infecções causadas por *L. chagasi*. Surpreendentemente, a adição de LGS ao inóculo não alterou o curso da infecção em cães, não levou à detecção mais precoce de amastigotas no baço e não aumentou a carga parasitária neste órgão em relação aos animais controle. Em outro modelo de especificidade vetor/parasito, LGS de *L. whitmani* promoveu aumento de lesões cutâneas em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Bezerra & Teixeira, 2001). No entanto, experimentos *in vitro* mostraram que o pré-tratamento de monócitos humanos com LGS de *L. intermedia* não alterava a carga parasitária das células, vista pelo número de monócitos infectados por *L. (V.) braziliensis* ou pelo número de amastigotas por célula infectada, em relação às células não expostas ao LGS (Menezes *et al.*, 2008). Ressalta-se, no entanto, que a exacerbação das lesões cutâneas e o aumento do parasitismo têm sido constantemente encontrados nas infecções por *L. major*, colonizada em laboratório, na presença de LGS de *P. papatasi*, vetor natural do parasito no Velho Mundo (Theodos *et al.*, 1991, Belkaid *et al.*, 1998).

Considerando os escassos e controversos estudos em relação ao papel da saliva do vetor na infecção por *Leishmania* no binômio natural parasito/vetor, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a

especificidade da saliva do inseto vetor na evolução da infecção experimental por parasitos do Novo Mundo, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* na ausência e na presença de lisado de glândula salivar de *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexus*,

1. Avaliar a evolução do tamanho da lesão cutânea na pata;
2. Avaliar a densidade de parasitos no ponto de inoculação dérmico;
3. Caracterizar as alterações histopatológicas na pele;
4. Determinar a população de células CD4⁺ e CD8⁺ em linfonodo poplíteo de drenagem;
5. Determinar as concentrações de IL-4, IL-10 e IL-12 no sobrenadante de cultura de células de linfonodo poplíteo de drenagem.

MÉTODOS

3. Métodos

3.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, de ambos os sexos, com seis a oito semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da Comissão para análise de projetos de pesquisas do HC-FMUSP (CAPPesq), sob o número de protocolo 120/11 e mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em ambiente com ventilação, ração e água à vontade.

3.2 Parasitos

Leishmania (Leishmania) amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269) isolada de paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa no município de Belém (PA) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280) isolada de paciente com leishmaniose mucosa no município de Paragominas (PA) foram utilizadas neste estudo. Ambas as espécies foram identificadas por anticorpos monoclonais (Shaw *et al.*, 1989) e isoenzimas (Miles *et al.*, 1980) no Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram obtidas pelo isolamento de formas amastigotas presentes em pata traseira de camundongos BALB/c e as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas pelo isolamento de formas amastigotas presentes na pata traseira de hamsters. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram isoladas e expandidas em meio RPMI 1640 (Gibco) enquanto que os

promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em meio Schneider (Sigma), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco), 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina. Todos os experimentos foram realizados com parasitos entre a quinta e sexta passagem em cultura e em fase estacionária de crescimento.

3.3 Obtenção da glândula salivar

Fêmeas de flebotomíneos de vida livre das espécies *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* foram coletadas respectivamente nos municípios de Tracateua e Cametá, ambas localizadas no estado do Pará, Brasil. As glândulas salivares de ambas as espécies foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), através da colaboração com o Dr. Fernando T. Silveira. As fêmeas dos flebotomíneos capturadas em campo foram imobilizadas em freezer a -20°C por dois minutos. As glândulas salivares foram obtidas por dissecação com o auxílio de uma lupa, um par de estiletes comuns e um outro par de estiletes confeccionados com agulhas para servirem de coletores. As fêmeas foram colocadas em lâmina com uma gota de PBS pH 7,2, sendo a região do tórax levemente pressionada por um estilete e outro pressionando levemente os olhos, somente para dar apoio. Os corpos gordurosos, quando presentes, foram retirados com o auxílio dos estiletes. Após a dissecação, as glândulas foram retiradas e acondicionadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e mantidas em freezer -80°C até o momento do uso. O material foi encaminhado

para o Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FMUSP em garrafa de criopreservação.

3.4 Preparo do lisado de glândula salivar - LGS

O lisado de glândula salivar (LGS) foi preparado através de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em temperatura ambiente por três vezes consecutivas e, posteriormente, passada em um agitador de tubos (vortex) para homogeneização do lisado. O extrato de glândula salivar foi adicionado à suspensão de parasitos no momento da inoculação.

3.5 Produção de antígeno total de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* para análise da resposta imune celular

Formas promastigotas, em fase estacionária foram lavadas por três vezes com PBS estéril, centrifugando-se a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e adicionados ao *pellet* cerca de 300 µL de tampão de lise, constituído por Tris-HCl 20 mM, NaCl 40 mM e EDTA 10 mM (pH 7,3). Em seguida os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford utilizando kit comercial (BioRad). A concentração de proteínas foi

calculada utilizando curva padrão feita com albumina bovina na faixa de concentração de 50 a 500 µg/mL.

3.6 Infecção experimental

Para a infecção *in vivo*, formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*, em fase estacionária de crescimento foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes com PBS estéril a 3000 rpm, por 10 minutos, 4°C, e sua concentração ajustada para 2×10^7 promastigotas/mL.

Foram montados seis grupos experimentais, sendo cada um formado por 10 animais/tempo de infecção. Estes animais foram anestesiados com solução de tiopental à concentração de 1 mg em 200 µL de solução de PBS administrada intraperitonealmente. Em seguida os animais foram inoculados com 50 µL da suspensão de parasitos (1×10^6 parasitos/pata) no coxim plantar traseiro de ambas as patas com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na ausência e na presença do lisado de glândula salivar de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* (0,5 par de glândula salivar/pata). Como controle, um grupo de 10 de animais foi inoculado com o mesmo volume de PBS estéril.

3.7 Evolução da infecção

A evolução da infecção foi avaliada semanalmente até a 8ª semana pós-infecção (PI), com o auxílio de um paquímetro, sendo que o tamanho da lesão

foi calculado a partir da medida da espessura da pata do grupo infectado subtraída da medida da espessura da pata do grupo controle (inoculado com PBS).

3.8 Análise Histopatológica

Na 4ª e 8ª semana PI, os animais dos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, biópsias do ponto de inoculação foram coletadas para a avaliação histopatológica das lesões. As biópsias foram acondicionadas em formol tamponado 10% e processadas pelas técnicas usuais de histologia. Cortes histológicos de 6 µm foram corados pela hematoxilina e eosina e observados à microscopia de luz para a caracterização das alterações teciduais. Para o estudo histopatológico, foi realizada uma análise semiquantitativa das características da resposta inflamatória tecidual nos cortes corados com HE, e de acordo com a intensidade dos diferentes processos foram dados escores que variaram de: negativo (-), muito discreto (+/2), discreto (+), moderado (++) , intenso (+++) e muito intenso (++++).

3.9 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na ausência e na presença de extrato de glândula salivar de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* foi analisada pelo ensaio de diluição limitante (Passero *et al.*, 2010). Os animais de cada grupo experimental foram

eutanasiados através do deslocamento cervical, em seguida foram coletadas e pesadas biópsias de pele. Em seguida, estes fragmentos foram pesados, macerados e diluídos conforme a Tabela 1 em meio Schneider (Sigma), suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. Após a realização da diluição prévia (Tabela 1), 200 µL foram adicionados em poços de placas de 96 poços estéreis em quadruplicata. Em seguida foram realizadas diluições seriadas (1:4) desta suspensão celular em dodeplicata nas próprias placas. Estas placas foram vedadas para evitar a evaporação e incubadas a 25°C, por 10 dias, para que os amastigotas viáveis se diferenciassem em promastigotas e se multiplicassem. Após este período cada placa foi observada em microscópio invertido e a maior diluição em que foi possível observar formas promastigotas foi anotada. A concentração de formas promastigotas/mg de tecido foi estimada seguindo a fórmula matemática:

$$\text{Carga Parasitária} = \frac{\text{recíproco do maior título positivo} \times \text{diluição do material} \times (\text{vol. homogenizado} / \text{vol. 1}^{\circ} \text{poço} \times \text{diluição})}{\text{peso do órgão}}$$

Tabela 1: Pré-diluição utilizada para a realização do ensaio de diluição limitante

	PELE	
	4ª Semana PI	8ª Semana PI
<i>L. (L.) amazonensis</i>		
<i>L. (L.) amazonensis</i> + LGS <i>L. flaviscutellata</i>	1:50	1:100
<i>L. (L.) amazonensis</i> + LGS <i>L. (P.) complexus</i>		
<i>L. (V.) braziliensis</i>		
<i>L. (V.) braziliensis</i> + LGS <i>L. flaviscutellata</i>	1:10	1:4
<i>L. (V.) braziliensis</i> + LGS <i>L. (P.) complexus</i>		

3.10 Avaliação da imunidade celular

3.10.1 Caracterização da população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ através da citometria de fluxo

Camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na ausência e na presença de extrato de glândula salivar de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* foram eutanasiados e seus linfonodos de drenagem foram retirados de forma estéril e macerados. As células foram quantificadas com o auxílio de azul de Trypan e as concentrações de células viáveis foram ajustadas para 10⁷ células/mL. Em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão de células, em triplicata, em placa de 96 poços, fundo em formato V e lavadas com tampão de lavagem (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) para marcação com os anticorpos de superfície. A marcação foi realizada em volume final de 50 µL de tampão de lavagem com os anticorpos indicados na Tabela 2. A placa foi incubada por 30 minutos, a 4°C na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e ressuspensas em 100 µL de paraformaldeído 1% (PFA 1%) para posterior aquisição no citômetro.

Tabela 2: Descrição de anticorpos monoclonais utilizados para análise da população de linfócitos CD3, CD4 e CD8.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Tipo de marcação
CD3	FITC	145-2C11	Superfície
CD4	PerCP Cy 5.5	RM4-5	Superfície
CD8a	Alexa Fluor 700	53-6.7	Superfície

As amostras foram adquiridas em um citômetro FACSFortessa utilizando o software FACSDiva (BD Bioscience – EUA). Para cada amostra, 50.000 eventos foram adquiridos. Para ajuste das voltagens, *beads* foram monomarcadas com cada um dos anticorpos utilizados. Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo (TreeStar – EUA). A estratégia de definição de janela para análise utilizada está ilustrada na figura 3.

Figura 3: Estratégia de definição de janelas (gate) para análise da população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Inicialmente foi feita uma janela de aquisição na região das células que passam apenas uma vez em frente ao laser, denominados de *singlets*, determinado o tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A), foi feita uma janela de aquisição na população de células vivas denominada "LiveDead". Em seguida foi feita uma janela de aquisição na região dos linfócitos totais, posteriormente foi feita janela de aquisição na região das células CD3⁺. Seguindo-se, foi feita uma janela de aquisição na região das células CD4⁺ e CD8⁺.

3.11 Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo por ELISA

Os linfonodos poplíteos dos diferentes grupos experimentais foram macerados e lavados em meio RPMI suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. Em seguida as células foram contadas com o auxílio de azul de Trypan e as concentrações de células viáveis ajustadas para 10^5 células/poço e distribuídas em placas de 96 poços. Estas células foram então estimuladas com antígeno total de formas promastigotas (100 µg/mL), mitógeno inespecífico (Concanavalina A 2,5 µg/mL) como controle positivo e sem estímulo como controle negativo do experimento. As placas contendo as células com ou sem estímulos foram acondicionadas em incubadora umidificada a 37°C, 5% CO₂ por 48 horas, quando então, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos a 4°C para a coleta do sobrenadante e dosagem de citocinas.

As citocinas foram dosadas de acordo com o método descrito pelo fabricante (B&D). Anticorpos monoclonais de captura anti-IL-4 (1:250) anti-IL-10 (1:250) e anti-IL12 (1:250) foram adsorvidos em placas de ELISA por dezoito horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS acrescida de 0,05% de Tween 20 (PBST) e após este passo foi adicionada uma solução de bloqueio das ligações inespecíficas, constituído por PBS contendo 10% de soro fetal bovino, incubando-se uma hora à temperatura ambiente (TA). Após este período três lavagens com PBST foram realizadas, seguida da adição do sobrenadante de cultura de células estimuladas ou não, sendo este material incubado por duas horas à TA. Em

seguida foram realizadas três lavagens com PBST e então adicionados os anticorpos de detecção biotinilados, anti-IL-4 (1:250), anti-IL-10 (1:250) e anti-IL-12 (1:250) por uma hora à TA. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBST, seguidas da incubação com estreptoavidina-peroxidase por uma hora à TA. Após seis lavagens adicionou-se o TMB (B&D). A reação foi desenvolvida por aproximadamente quinze minutos em câmara escura, adicionando-se em seguida 50 µL de H₂SO₄ 2N para a finalização da reação. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Labsystems). A concentração de cada citocina foi estimada com base em uma curva padrão construída com citocinas recombinantes.

3.12 Análise Estatística

O software GraphPad Prism, foi utilizado para a análise estatística dos dados. Para a análise estatística foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias (grupo e tempo), seguido de pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, quando necessário. O nível de significância utilizado para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Evolução da Infecção

4.1.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Na infecção causada por *L. (L.) amazonensis* a lesão cutânea evoluiu de forma progressiva ao longo do período estudado tanto no grupo controle, inoculado somente com o parasito, quanto nos grupos inoculados com LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*. No entanto, a lesão cutânea do grupo controle mostrou-se maior ($p < 0,05$) que a do grupo inoculado com LGS de *P. complexus* a partir da 3ª semana PI. Já o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou maior lesão em relação ao controle na 3ª semana e manteve maiores tamanhos de lesão em relação ao controle a partir da 6ª semana PI (Figura 4).

Figura 4: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica que o tamanho da lesão no grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle (sem LGS); § indica que o tamanho da lesão no grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle (sem LGS); ♦ indica que o tamanho da lesão dos camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) da infecção de *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus*.

4.1.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

A infecção por *L. (V.) braziliensis* evoluiu discretamente, com leve aumento da lesão e posterior regressão em todos os grupos. O grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus*, apresentou um menor tamanho de lesão ($p < 0,05$) que o grupo controle a partir da 3ª semana PI até o fim do período estudado. Já o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata*

apresentou menor tamanho de lesão ($p < 0,05$) na 2^a, 4^a, 5^a, 7^a e 8^a semana PI, em relação ao grupo controle.

Figura 5: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica que o tamanho da lesão no grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle (sem LGS); § indica que o tamanho da lesão no grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle (sem LGS); ♦ indica que o tamanho da lesão dos camundongos BALB/c infectados por *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) da infecção de *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus*.

4.2 Análise Histopatológica das Lesões

4.2.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Os animais infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência ou presença do LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* apresentaram o mesmo tipo de lesão histopatológica, porém de grau e intensidade

discretamente diferentes de acordo com o tempo de evolução da infecção (Tabela 3). Na 4ª semana PI, observamos a presença de um infiltrado inflamatório intenso de difuso na derme, caracterizado pela presença de leucócitos polimorfonucleares em grau moderado, abundantes macrófagos parasitados e discreto número de linfócitos. (Figura 6A, C e E). Na 8ª semana PI foi observado uma intensificação do processo inflamatório caracterizando por abundância de macrófagos e parasitos e participação bastante discreta de outros tipos celulares como leucócitos polimorfonucleares e linfócitos. Áreas de necrose tecidual estavam presentes em todos os grupos estudados na 8ª semana PI (Figura 6B, D e F).

Tabela 3: Análise histopatológica semi-quantitativa das lesões cutâneas desencadeadas pela infecção de *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus* em camundongos BALB/c.

Tempo Infecção em dias	Grupo Experimental	Infiltrado Inflamatório Dérmico							Parasito	Necrose
		Intenso	Discreto	Difuso	Focal	PMN	MO	Linfócito		
30	<i>L. (L.) a</i>	+	-	+	-	++	+++	+	++	-
	<i>L. (L.) a + L. flaviscutellata</i>	+	-	+	-	++	+++	+	+++	-
	<i>L. (L.) a + L.(P.)complexus</i>	+	-	+	-	++	+++	+	+++	+
60	<i>L. (L.) a</i>	+	-	+	-	++	++++	+/2	++++	+
	<i>L. (L.) a + L. flaviscutellata</i>	+	-	+	-	+	++++	+/2	++++	+
	<i>L. (L.) a + L.(P.)complexus</i>	+	-	+	-	+	+++	-	+++	+

Figura 6: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c. A - infecção com *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI; B- infecção com *L. (L.) amazonensis* na 8ª semana PI; C- infecção com *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* na 4ª semana PI; D - infecção com *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* na 8ª semana PI; E - infecção com *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus* na 4ª semana PI e F - infecção com *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus* na 8ª semana PI. (Coloração HE).

4.2.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

Os animais infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência ou presença do LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus* também apresentaram o mesmo tipo de lesão histopatológica de grau e intensidade discretamente diferentes de acordo com o tempo de evolução da infecção e as características do grupo experimental (Tabela 4). Na 4ª semana PI, os animais controle apresentavam um infiltrado inflamatório intenso e focal caracterizado pela presença discreta de PMN e moderada de macrófagos com moderado parasitismo e áreas focais de necrose. Enquanto que os animais inoculados com o parasito na presença do LGS de *L. flaviscutellata* mostravam um infiltrado intenso e difuso com participação de leucócitos mono e polimorfonucleares em grau moderado, discreto parasitismo e focos de necrose; e os animais inoculados com o parasito na presença de LGS de *L. (P.) complexus* mostravam um infiltrado bastante discreto e focal com a participação de um número pequeno de células mononucleares (Figura 7A, C e E). Na 8ª semana PI o processo inflamatório regrediu em todos estes grupos experimentais, os animais inoculados somente com o parasito e com o parasito na presença de LSG de *L. flaviscutellata* apresentavam infiltrado inflamatório discreto formado basicamente por células mononucleares com raras formas amastigotas; enquanto que o grupo inoculado com o parasito na presença do LGS de *L. (P.) complexus* mostrava total regressão do processo inflamatório e ausência de parasitismo tecidual. (Figura 7B, D e F).

Figura 7: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c. A - infecção com *L. (V.) braziliensis* na 4ª semana PI; B- infecção com *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI; C- infecção com *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* na 4ª semana PI; D - infecção com *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. flaviscutellata* na 8ª semana PI; E - infecção com *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus* na 4ª semana PI e F - infecção com *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS de *L. (P.) complexus* na 8ª semana PI. (Coloração HE).

4.3 Análise da carga parasitária

4.3.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Na 4ª semana PI, a carga parasitária do grupo infectado com *L. (L.) amazonensis*, na presença de LGS de *L. (P.) complexus*, foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que o grupo controle. Já na 8ª semana PI, o grupo controle apresentou carga parasitária maior ($p < 0,05$) que os dois grupos inoculados com LGS. O grupo controle apresentou aumento ($p < 0,05$) da carga parasitária da 4ª para a 8ª semana, já nos dois grupos inoculados com LGS, não foi observada diferença ($p > 0,05$) ao longo da evolução da infecção (Figura 8).

Figura 8: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção.

4.3.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

Os animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram uma carga parasitária bem mais reduzida que os animais inoculados com *L. (L.) amazonensis*, na ausência e na presença do LGS de ambos os vetores. O grupo controle apresentou, na 4ª semana PI, carga parasitária maior ($p < 0,05$) que os grupos inoculados com LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. Já na 8ª semana PI, a carga parasitária de todos os grupos não apresentou diferença significativa. O grupo controle apresentou diminuição ($p < 0,05$) na carga parasitária da 4ª para a 8ª semana, no entanto, os dois grupos inoculados com LGS, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) no parasitismo ao longo da evolução da infecção (Figura 9).

Figura 9: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção.

4.4 Quantificação da população de Linfócitos T em linfonodo de drenagem

4.4.1 Linfócitos CD4⁺

4.4.1.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

A porcentagem dos linfócitos CD4⁺, nos camundongos infectados apenas com *L. (L.) amazonensis*, na 4ª semana PI, foi maior ($p < 0,05$) que nos camundongos infectados com LGS de *L. (P.) complexus*. Já na 8ª semana, o

grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou porcentagem de linfócitos CD4⁺ maior ($p < 0,05$) que no grupo controle (sem LGS). O grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* não diferiu significativamente do grupo controle tanto na 4^a quanto na 8^a semana PI e apresentou maior porcentagem deste tipo celular que o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* na 4^a semana PI.

Tanto o grupo controle quanto o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou diminuição ($p < 0,05$) na porcentagem de linfócitos CD4⁺ ao longo do curso da infecção, enquanto que o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* não diferiu significativamente da 4^a para a 8^a semana PI.

O grupo saudável apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD4⁺ do que todos os outros grupos estudados, tanto na 4^a quanto na 8^a semana PI (Figura 10).

Figura 10: Porcentagem de Linfócitos CD4⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção; ¥ indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo saudável.

4.4.1.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

A porcentagem dos linfócitos CD4⁺, nos camundongos infectados apenas com *L. (V.) braziliensis*, na 4ª semana PI, foi maior ($p < 0,05$) que nos camundongos infectados com LGS de *L. (P.) complexus*. Já na 8ª semana, não houve diferença significativa entre os grupos controle (sem LGS) e inoculado

com LGS de *L. (P.) complexus*. O grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* não diferiu significativamente do grupo controle tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI e apresentou maior porcentagem que o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* na 4ª semana PI.

Tanto o grupo controle quanto o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* não diferiram significativamente ao longo do curso da infecção, enquanto que o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou aumento ($p < 0,05$) na porcentagem de linfócitos CD4⁺ da 4ª para a 8ª semana PI.

O grupo saudável apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD4⁺ do que o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* na 4ª e 8ª semana PI. Já o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD4⁺ na 4ª semana quando comparado ao grupo saudável. O grupo saudável não diferiu significativamente do grupo controle, infectado apenas com *L. (V.) braziliensis*, tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI (Figura 11).

Figura 11: Porcentagem de Linfócitos CD4⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção; ¥ indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo saudável.

4.4.2 Linfócitos CD8⁺

4.4.2.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

A porcentagem dos linfócitos CD8⁺, nos camundongos infectados apenas com *L. (L.) amazonensis*, na 4^a semana PI, foi maior ($p < 0,05$) que nos camundongos infectados com LGS de *L. flaviscutellata* e não diferiu

significativamente do grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus*. Já na 8ª semana, o grupo controle (sem LGS) não diferiu significativamente dos dois grupos inoculados com LGS. O grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD8⁺ em comparação ao grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* na 4ª semana PI enquanto que na 8ª semana PI, esta relação se inverteu, e grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD8⁺ em relação ao grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus*.

Todos os grupos estudados apresentaram aumento ($p < 0,05$) na porcentagem de linfócitos CD8⁺ ao longo do curso da infecção.

O grupo saudável apresentou menor ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD8⁺ do que todos os outros grupos estudados, tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI, com exceção da 4ª semana PI quando o grupo saudável não diferiu significativamente do grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* (Figura 12).

Figura 12: Porcentagem de Linfócitos CD8⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção; ¥ indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo saudável.

4.4.2.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

A porcentagem dos linfócitos CD8⁺, nos camundongos infectados apenas com *L. (V.) braziliensis*, na 4ª semana PI, foi maior ($p < 0,05$) que nos camundongos infectados com LGS de *L. (P.) complexus*. Já na 8ª semana, não houve diferença significativa entre os grupos controle (sem LGS) e inoculado

com LGS de *L. (P.) complexus*. O grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* não diferiu significativamente do grupo controle na 4ª semana PI, no entanto, na 8ª semana PI, o mesmo grupo apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem que o grupo controle. Tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI o grupo com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD8⁺ em relação ao grupo com LGS de *L. (P.) complexus*.

Os dois grupos inoculados com LGS apresentaram aumento ($p < 0,05$) na porcentagem de linfócitos CD8⁺ ao longo do curso da infecção, já o grupo controle não apresentou diferença significativa da 4ª para a 8ª semana PI.

O grupo saudável apresentou menor ($p < 0,05$) porcentagem de linfócitos CD8⁺ do que o grupo controle na 4ª semana PI e que o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* na 8ª semana PI (Figura 13).

Figura 13: Porcentagem de Linfócitos CD8⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção; ¥ indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo saudável.

4.5 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo

4.5.1 Produção de IL-10

4.5.1.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI, não houve diferença estatística na produção de IL-10 em nenhum dos grupos infectados por *L. (L.) amazonensis* na presença ou ausência de LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*. Ao longo da infecção também não foi observada diferença estatística na produção de IL-10 entre os diferentes grupos experimentais. Na 4ª semana PI o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou nível não detectável de produção de IL-10 (Figura 14).

Figura 14: Concentração de IL-10 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. ND indica níveis não detectáveis de citocina.

4.5.1.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

Tanto na 4^a quanto na 8^a semana PI, não houve diferença estatística na produção de IL-10 em nenhum dos grupos infectados por *L. (V.) braziliensis* na presença ou ausência de LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*. Ao longo da infecção também não foi observada diferença estatística na produção de IL-10 em todos os grupos (Figura 15).

Figura 15: Concentração de IL-10 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. ND indica níveis não detectáveis de citocina-

4.5.2 Produção de IL-12

4.5.2.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Na 4ª semana PI, o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou maior ($p < 0,05$) produção de IL-12 em relação ao grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus*. Ao longo da infecção não foi observada diferença estatística na produção de IL-12 em todos os grupos. Na 8ª semana

PI o grupo controle sem LGS apresentou nível não detectável de produção de IL-12 (Figura 16).

Figura 16: Concentração de IL-12 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. ♦ indica que o grupo infectado na presença de LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) da infecção na presença de LGS de *L. (P.) complexus* e ND indica níveis não detectáveis de citocina.

4.5.2.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

Na 4ª semana PI não houve diferença na produção de IL-12 entre os grupos experimentais, inclusive em relação ao animal saudável. Já na 8ª semana PI, o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata*, apresentou maior

($p < 0,05$) produção de IL-12 em relação aos grupos controle (sem LGS) e inoculado com LGS de *L. (P.) complexus*. Ao longo da infecção não foi observada diferença estatística na produção de IL-12 para todos os grupos experimentais (Figura 17).

Figura 17: Concentração de IL-12 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; ♦ indica que o grupo infectado na presença de LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) da infecção na presença de LGS de *L. (P.) complexus*.

4.5.3 Produção de IL-4

4.5.3.1 Infecção por *L. (L.) amazonensis*

Na 4ª semana PI, a produção de IL-4 no grupo controle foi maior ($p < 0,05$) que nos dois grupos inoculados na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*. O grupo com LGS de *L. flaviscutellata* teve maior produção de IL-4 do que o grupo com LGS de *L. (P.) complexus* na 4ª semana PI. Já na 8ª semana PI, o grupo com LGS de *L. flaviscutellata* apresentou maior ($p < 0,05$) produção de IL-4 que o grupo controle (sem LGS) e o saudável. O grupo controle sem saliva mostrou redução na produção de IL-4 ao longo do curso da infecção, já os grupos inoculados com saliva não diferiram significativamente da 4ª para a 8ª semana PI. Na 8ª semana PI o grupo controle sem LGS apresentou nível não detectável de produção de IL-4 (Figura 18).

Figura 18: Concentração de IL-4 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. * indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. flaviscutellata* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) durante a evolução da infecção; ¥ indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo saudável; ♦ indica que o grupo infectado na presença de LGS de *L. flaviscutellata* diferiu ($p < 0,05$) da infecção na presença de LGS de *L. (P.) complexus* e ND indica níveis não detectáveis de citocina.

4.5.3.2 Infecção por *L. (V.) braziliensis*

Na 4ª semana PI não houve diferença na produção de IL-4 entre os diferentes grupos experimentais; enquanto que na 8ª semana PI, o grupo

inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* apresentou maior ($p < 0,05$) produção de IL-4 em relação ao grupo controle sem saliva. Ao longo da infecção não foi observada diferença estatística na produção de IL-4 em todos os grupos. O grupo saudável apresentou níveis não detectáveis de IL-4 (Figura 19).

Figura 19: Concentração de IL-4 determinada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na ausência de LGS e na presença de LGS de *L. flaviscutellata* e de *L. (P.) complexus*. § indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo inoculado com LGS de *L. (P.) complexus* e o grupo controle (sem LGS) no mesmo tempo de infecção e ND indica níveis não detectáveis de citocina.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os flebotomíneos são classicamente aceitos como vetores naturais dos agentes etiológicos das leishmanioses. A relação entre o vetor e a transmissão da leishmaniose não se restringe a deposição dos parasitos na pele do hospedeiro. Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo inocula pequenas quantidades de saliva, que exerce papel fundamental no estabelecimento da doença devido às suas propriedades farmacológicas, tais como ação vasodilatadora, antiplaquetária e anti-hemostáticas (Ribeiro, 1987; Titus e Ribeiro, 1990; Ribeiro, 1995). Além de atividade farmacológica, a saliva do vetor possui atividade imunossupressora e imunogênica que modifica a resposta do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania* (Sacks & Kamhawi, 2001).

Para diversas espécies de *Leishmania*, a inoculação de parasitos na presença de LGS de *L. longipalpis* e *P. papatasi* levou a um aumento substancial do tamanho de lesão e/ou carga parasitária comparadas ao grupo controle inoculado somente com os parasitos (Belkaid et al., 1998; Donnely et al., 1998; Lima & Titus, 1996; Mbow et al., 1998; Samuelson et al., 1991; Theodos et al., 1991; Titus & Ribeiro, 1988; Norsworthy et al., 2004). No entanto, a maioria dos trabalhos que demonstram o efeito exacerbador da saliva do vetor na infecção por *Leishmania* foram desenvolvidos em modelos que não consideraram a combinação específica do binômio natural parasita/vetor, além de utilizarem flebotomíneos colonizados em laboratório (Laurenti et al., 2009 a e b).

Embora diversos estudos assumam que insetos oriundos de colônias de laboratório sejam representativos de suas populações naturais, deve ser levado em conta que o processo de colonização frequentemente incorpora apenas uma fração do pool genético da população original (Lorenz et al., 1984). Consequentemente, o processo de colonização pode levar a uma perda da variação genética em flebotomíneos colonizados em laboratório enquanto sua população na natureza está mais suscetível à seleção natural, resultando em polimorfismo das proteínas da glândula salivar e subsequentemente em uma variação antigênica (Lanzaro et al., 1999; Soong et al., 2004).

Dessa forma, é inapropriado esperar uma evolução similar da infecção por *Leishmania* quando são utilizados flebotomíneos colonizados em laboratório ao invés de animais coletados na natureza. Esta diferença entre o efeito de LGS de flebotomíneos foi comprovada no relato de que camundongos pré-imunizados com LGS de fêmeas de *P. papatasi* colonizadas a diversas gerações induziam a uma proteção contra *L. major* co-inoculado com o mesmo tipo de LGS, no entanto, quando camundongos foram pré-imunizados com LGS de fêmeas de *P. papatasi* recentemente colonizadas ou coletadas em campo, não foi observada proteção à infecção por *L. major* (Ben Hadj Ahmed et al., 2010a; Ben Hadj Ahmed et al., 2010b; Ben Hadj Ahmed et al., 2011).

Neste sentido, com o objetivo de aprofundar os conhecimentos em relação ao papel da saliva específica do vetor na infectividade de espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana, no presente estudo camundongos BALB/c foram inoculados com formas promastigotas de *L. (L.)*

amazonensis e *L. (V.) braziliensis* na presença ou ausência de LGS de flebotomíneos *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*, capturados em campo.

A avaliação da evolução clínica dos animais mostrou que o grupo infectado por *L. (L.) amazonensis* na presença de LGS de seu vetor específico, *L. flaviscutellata*, apresentou menor tamanho de lesão e menor carga parasitária em relação ao grupo controle na fase crônica da doença. Já o grupo inoculado com *L. (L.) amazonensis* e com LGS de seu vetor inespecífico, *L. (P.) complexus*, apresentou menor tamanho de lesão e menor carga parasitária, em relação ao grupo controle, ao longo de praticamente todo o curso da infecção. Por sua vez, na infecção por *L. (V.) braziliensis* na presença de LGS do vetor específico, *L. (P.) complexus*, os animais apresentaram menor tamanho de lesão em relação ao grupo controle praticamente ao longo de todo o curso da infecção e carga parasitária menor que o grupo controle na fase crônica da infecção. O mesmo perfil foi observado na combinação não específica de *L. (V.) braziliensis* com LGS de *L. flaviscutellata*, sendo seu tamanho de lesão menor que o do grupo controle ao longo de todo o período estudado, e sua carga parasitária menor que do grupo controle na fase crônica da doença.

Os resultados mostram que de forma geral, os grupos inoculados com *L. (L.) amazonensis* mostraram um perfil de suscetibilidade do hospedeiro com progressão contínua da infecção, enquanto que os grupos inoculados com *L. (V.) braziliensis*, apresentaram um quadro de resistência, com regressão da doença depois de determinado ponto independente da presença ou ausência de LGS de *L. flaviscutellata* ou *L. (P.) complexus*. Esta dicotomia da resposta do hospedeiro frente à infecção por diferentes espécies de *Leishmania* já havia

sido descrita anteriormente (Neal & Hale, 1983; Andrade et al., 1984; Childs et al., 1984; Carvalho et al., 2012). No entanto, a presença de ambas as salivas no inóculo de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* levaram a um quadro de menor suscetibilidade ou maior resistência à infecção, resultando em uma evolução clínica menos expressiva quando comparadas aos grupos inoculados na ausência de LGS.

Corroborando com os resultados acima descritos, na infecção por *L. chagasi* com LGS de *L. longipalpis* (combinação específica vetor-parasito) em cães, não foi observada a alteração do curso da infecção, não foram detectadas precocemente formas amastigotas nas vísceras e não houve aumento da carga parasitária em relação ao grupo controle (Paranhos-Silva, 2003). Resultados semelhantes foram observados na infecção experimental em hamsters (Gomes et al., 2008). Da mesma forma, experimentos *in vitro*, nos quais monócitos humanos foram pré-tratados com LGS de *L. intermedia* e depois infectados com *L. (V.) braziliensis* (binômio natural vetor/parasito), não se observou alteração da carga parasitária destas células (Menezes et al., 2008).

Em contraste, estudos utilizando LGS dos flebotomíneos *L. longipalpis* e *P. papatasi* colonizados em laboratório mostraram evidente exacerbação de lesões e aumento do parasitismo, conforme mencionado anteriormente (Belkaid et al., 1998; Donnelly et al., 1998; Lima & Titus, 1996; Mbow et al., 1998; Samuelson et al., 1991; Theodos et al., 1991; Titus & Ribeiro, 1988; Norsworthy et al., 2004). Cabe ressaltar, que os efeitos da saliva de flebotomíneos colonizados em laboratório e capturados em campo podem

diferir significativamente em sua composição e também na quantidade de proteínas. Tais diferenças podem levar a um quadro completamente distinto na infecção por *Leishmania*, conforme demonstrado em 2009 por Laurenti e colaboradores quando foi relatado que a infecção de camundongos na presença de saliva de *L. longipalpis* colonizado em laboratório exacerbou a infecção, causando lesões duas vezes maiores em comparação ao grupo inoculado com a saliva de flebotomíneos capturados no campo.

As glândulas salivares das fêmeas dos flebotomíneos contêm uma complexa gama de moléculas biologicamente ativas e as duas principais espécies de flebotomíneos mais colonizadas, *L. longipalpis* e *P. papatasi* possuem propriedades imunomodulatórias que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro (Kamhawi, 2000; Andrade et al, 2007; Theodos et al, 1991). A apirase é uma enzima anti-coagulante que hidrolisa ATP e ADP para AMP e fosfato inorgânico (Ribeiro, 1995). Tal molécula foi identificada nas glândulas salivares dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Ribeiro et al., 1986 e Ribeiro et al., 1989). Por sua vez, o Maxadilan é uma molécula com propriedade vasodilatadora presente nas glândulas salivares do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Ribeiro et al., 1986).

Quanto às alterações imunohistopatológicas, nossos experimentos mostraram que a resposta histológica no ponto de inoculação subcutâneo entre os diferentes grupos experimentais infectados por *L. (L.) amazonensis*, não apresentaram variação significativa entre os grupos nos períodos estudados; porém, ao longo do tempo de infecção, ocorreu uma redução de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos acompanhada de aumento de macrófagos

parasitados. Em relação à população de linfócitos, avaliada por citometria de fluxo, foi observada uma diminuição dos linfócitos CD4⁺ e um aumento na população de linfócitos CD8⁺, principalmente na fase crônica da infecção, em todos os diferentes grupos experimentais inoculados com *L. (L.) amazonensis* quando comparados ao grupo de animais saudáveis. Quanto à participação de citocinas nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* na ausência ou presença do LGS de *L. flaviscutellata* e *L. (P.) complexus*, observamos um aumento nas concentrações de IL-12, IL10 e IL-4 principalmente na 4ª semana PI nos controles, animais inoculados somente com o parasito, e nos animais inoculados com o parasito na presença de LGS de *L. flaviscutellata*. Já os animais co-infectados com o LGS de *L. (P.) complexus* mantiveram o nível de citocinas tanto do tipo Th1 como Th2 semelhantes ao dos animais saudáveis. Na evolução da infecção, foi notado que as concentrações de todas as citocinas estudadas diminuíram ao nível dos animais saudáveis, com exceção de IL-4 que se manteve aumentada nos animais infectados na presença de LGS de *L. flaviscutellata*, sinalizando um possível efeito modulador de componentes da saliva deste vetor na suscetibilidade à infecção. Qi et al., (2001) mostraram que células de linfonodos de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* podem produzir ambos os perfis de citocinas, Th1e Th2, porém a magnitude da resposta Th2, associada a uma maior expressão de IL-4 e IL-10, é responsável pelo sucesso da infecção por *L. (L.) amazonensis* quando baixos níveis de citocinas de Th1 são encontrados.

Já os animais dos diferentes grupos experimentais infectados por *L. (V.) braziliensis* apresentaram uma resposta tecidual bem mais discreta,

caracterizada por um acúmulo moderado de células mononucleares na derme, somado a um parasitismo tecidual discreto; processo este que regrediu com o tempo de infecção tornando-se focal e discreto sem evidência de parasitismo. Importante salientar que nos animais co-infectados com LGS de *L. (P.) complexus* o processo inflamatório que já era discreto na 4ª semana PI, regrediu completamente na 8ª semana PI, sendo que os cortes histológicos mostravam aspecto de pele normal. A resposta imune celular nos linfonodos de drenagem, avaliada pela citometria de fluxo, mostrou uma discreta diminuição na população de linfócitos CD4⁺ nos animais co-infectados com ambos os LGS na 4ª semana PI com recuperação posterior na 8ª semana PI; enquanto que a população de linfócitos CD8⁺ apresentou um aumento em relação ao grupo saudável, principalmente no grupo controle, inoculado somente com o parasito e o grupo co-inoculado com o parasito na presença de LGS de *L. flaviscutellata*. Esta resposta imune celular foi acompanhada por uma fraca produção de citocinas, tanto Th1 como Th2 pelas células do linfonodo de drenagem na 4ª semana PI; e surpreendentemente pelo aumento de IL-4 nos animais co-infectados com LGS de *L. (P.) complexus* e aumento de IL-12 pelos animais co-infectados com *L. flaviscutellata* na evolução da infecção.

É importante ressaltar que a saliva como um todo pode não ser responsável pelos efeitos na modulação da infectividade da *Leishmania*, mas sim moléculas específicas desempenhem este papel. Por exemplo, o principal componente da saliva de *L. longipalpis* é o maxadilan, um potente vasodilatador que modula a produção de citocinas pelos macrófagos humanos

e murinos por aumentar a resposta TH2, (IL-10, IL-6 e TGF- β) e diminuir a resposta TH1 (IL-12 e TNF- α), além da produção de óxido nítrico (Rogers & Titus, 2003, Anjili et. al, 1995). Da mesma forma, na saliva de *P. papatasi*, as moléculas de adenosina e seu precursor 5'-AMP aumentam a produção de citocinas do perfil TH2 (IL-10, IL-6), e reduzem a produção de citocinas do perfil TH1 (IL-2 e IFN- γ) e a síntese de óxido nítrico (Zidek, 1999, Katz et al., 2000). Além do mais, foi demonstrado que a imunização com duas proteínas salivares diferentes de *P. papatasi*, PpSP15 e PpSP44, produziram perfis imunológicos distintos que se correlacionaram com resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania*, respectivamente (Oliveira et al., 2008). Estes relatos enfatizam a necessidade da identificação de moléculas da saliva que podem ser responsáveis por efeitos diversos na infecção por *Leishmania*. Utilizar a saliva como um todo é uma importante ferramenta para entender o papel do vetor no estabelecimento da infecção, no entanto, identificar as moléculas da saliva que levam à tão diferentes perfis, pode fornecer importante conhecimento acerca do seu efeito modulatório na infecção por *Leishmania*.

Concluindo, nossos resultados demonstraram que nenhum dos grupos inoculados com LGS apresentou exacerbação da infecção quando comparados ao controle, infectado na ausência de LGS. Além disso, de forma geral, nos animais infectados na ausência ou na presença de LGS, foi observada uma supressão da população de linfócitos CD4⁺ e um aumento na população de células CD8⁺ em relação aos animais sem infecção, grupo saudável. Cabe ressaltar que ainda que aparentemente um efeito sutil de resistência tenha sido observado, as diferenças nas respostas imunológicas entre os diferentes

grupos experimentais foram muito discretas sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a resposta imunológica dos diferentes grupos experimentais e sobre a composição destas salivas.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Nossos resultados mostraram que a saliva de *Lutzomyia flaviscutellata* e de *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus*, tanto no seu binômio natural vetor/parasito como não, não alterou significativamente o curso da infecção experimental causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c.

ANEXOS

7. Anexos

7.1 Aprovação em Comitê de Ética

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/05/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **120/11** intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO EFEITO DA SALIVA DO FLEBOTOMÍNEO VETOR SOBRE A INFECTIVIDADE DA ESPÉCIE DE LEISHMANIA: INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS E LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS COM A SALIVA DE LUTZOMYIA FLAVISCUTELLATA, PSYCHODOPIGUS WELLCOMEI E LUTZOMYIA LONGIPALPIS EM CAMUNDONGO BALB/C”**, apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti

Pesquisador (a) Executante: Fernanda de Camargo Franceschini

CEP-FMUSP, 12 de Maio de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

REFERÊNCIAS

8. Referências

Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol.* 1984; 114(1): 137-48.

Andrade BB, de Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Rev Scand J Immunol* 2007;66:122–7.

Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW, Githure JI, Olobo JO, Robert LL, et al. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop.* 1995; 60: 97–100.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.* 1998; 10: 1941-1953.

Ben Hadj Ahmed S, Chelbi I, Kaabi B, Cherni S, Derbali M, Zhioua E., Differences in the salivary effects of wild-caught versus colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the development of zoonotic cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *J Med Entomol.* 2010a 47(1):74-9.

Ben Hadj Ahmed S, Kaabi B, Chelbi I, Derbali M, Cherni S, Laouini D, Zhioua E., Lack of protection of pre-immunization with saliva of long-term colonized *Phlebotomus papatasi* against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva of wild-caught *P. papatasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2010b 83(3):512-4.

Ben Hadj Ahmed S, Kaabi B, Chelbi I, Cherni S, Derbali M, Laouini D, Zhioua E., Colonization of *Phlebotomus papatasi* changes the effect of pre-immunization with

saliva from lack of protection towards protection against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva. *Parasit Vectors*. 2011 4:126.

Bezerra HS, Teixeira MJ. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96:349-51

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today*. 1990; 6: 183-7.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol*. 2001; 2:907-16.

Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XVII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. *Trans R Soc Trop Med*. 1986; 80: 145-5.

Brandão-Filho SP, Britto ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (V.) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2003; 97(3): 291-6.

Carvalho AK, Silveira FT, Passero LF, Gomes CM, Corbett CE, Laurenti MD. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunol*. 2012 34(8-9):395-403.

Champagne D. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitol. Today* 1994; **10**: 430–433.

Chang, K. P. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 1981; 30: 334-9.

Charlab R, Ribeiro JM. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 48: 831-838.

Charlab R, Tesh RB, Rowton ED, Ribeiro JM. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp. Parasitol.* 1995; 80: 167–175.

Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1984 Feb; 78(1): 25-34.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(6): 2614-8.

de Souza A, Ishikawa EAY, Braga RR, Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90(2):112-3.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 1998; 66(2):827-9.

de Moura, T. R., F. O. Novais, F. Oliveira, J. Clarencio, A. Noronha, A. Barral, C. Brodskyn, C. I. de Oliveira. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 2005. 73: 5827-5834.

Dobrzanski KJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 2004; 172: 1380-90.

Dominguez M, Toraño A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med*. 1999; 189:25-35.

Donnelly KB, Lima HC Titus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous Leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J. Parasitol.* 1998; 84: 97–103.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An. Bras Dermat.* 1992; 67 (2):55-60.

Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 7845-50.

Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Bioc Parasitol*. 1994; 66:319-28.

Hall LR, Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 1995; 155: 3501–3506.

Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol*. 2003; 25(11-12): 559-67.

Herrer A, Christensen HA. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1976; 25:54-8.

Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(4):338-45.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 2003; 71: 4278–4288.

Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2000;2:1765–73.

Katz O, Waitumbi JN, Zer R, Warburg A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62:145-50.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil. XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75(4): 530-6.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters W, Killick- Kendrick, RD editors. The leishmaniasis in biology and medicine. *London: Academic Press*, 1987. 1:1- 20.

Lainson R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. *Rev. Paranaense de Medicina.* 1997; 11(1): 29-40.

Lanzaro GC, Lopes AHCS, Ribeiro JMC, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M, G Titus RG: Variation in the salivary peptide, maxadilan from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 1999, 8(2):267-275. 24.

Laurenti MD, Corbett CEP, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*. 1996; 77: 15- 24.

Laurenti MD, da Matta VL, Pernichelli T, Secundino NF, Pinto LC, Corbett CE, Pimenta PP. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Scand J Immunol*. 2009b; Oct;70(4):389-95.

Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CE. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(3): 427-34.

Laurenti, M.D., Silveira, V.M.S., Secundino, N.F.C., Corbett, C.E.P., Pimenta, P.F., Saliva Of Laboratory-Reared *Lutzomyia Longipalpis* Exacerbates *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection More Potently That Saliva Of Wild-Caught *Lutzomyia Longipalpis*. *Parasitol Int*, 2009a. 58(3), 220-226.

Lessa MM, Lessa HÁ, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007; 73(6): 843-7.

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

Lorenz L, Beaty BJ, Aitken THG, Wallis GP, Tabachnik WJ. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg*, 1984. 33: 690 – 694.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 1979; 73(2): 123-37.

Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 1998; 161: 5571-7

Menezes MJ, Costa DJ, Clarêncio J, Miranda JC, Barral A, Barral-Netto M, et al. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol.* 2008; 9: 12.

Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(2):243-52.

Mohiuddin A. An investigation into the relationships between the species (parasitic in man) of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Part I. A study of the cultural characters and morphology with a statistical analysis of the relative measurements of the various species. *Indian J Med Res.* 1952; 40:7-23.

Monteiro MC, Lima HC, Souza AA, Titus RG, Romão PR, Cunha FQ. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76: 88-94.

Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de Leishmaniose Cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop.* 1994; 36(5):459-463.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J. Immunol.* 2001; 167: 5226-30.

Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasites lysis and attachment to macrophages. *J Immunol.* 1984; 132:1501-05.

Müller I, Kropf P, Etges RJ & Louis JA. Gamma-interferon response in secondary *Leishmania major* infection. Role of CD8⁺ T cells. *Infect Immun*, 1993; 61: 3730–38.

Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int Immunol.* 1991; 3(6):587-97.

Naderer T, MaCoville MJ. *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008; 10:301-08.

Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun.* 1989; 57:1343-46.

Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology.* 1983; 87(1): 7-13.

Norsworthy NB, Sun J, Elnaïem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect. Immun.* 2004; 72: 1240-1247.

Oliveira F, Lawyer PG., Kamhawi S, Valenzuela JG. 2008. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 2(4): e226.

Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I, et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet. Parasitol*. 2003; 114: 97-111

Passero LF, Marques C, Vale-Gato I, Corbett CE, Laurenti MD, Santos-Gomes G. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol Int*. 2010 Jun; 59(2):159-65.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1981; 127: 1438-43.

Pearson RD, Uydes IL, Campman SW. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *American Journal Tropical Medicine Parasitology*. 1987; 81: 735-739.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008 321(5891):970-4.

Qi H, Popov V, Soong L. *L. Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J Immunol*. 2001 15;167(8):4534-42.

Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2004; 72:988-95.

Rangel EF, de Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of cutaneous leishmaniasis of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984; 79(3) 395-6.

Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 2013; 58:227-250

Rebelo JMC, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1999; 15(3): 623-630.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:151-77.

Ribeiro J.M., Rossignol P.A., Spielman A.. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; 683–686.

Ribeiro JM, Katz O, Pannell LK, Waitumbi J, Warburg A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J. Exp. Biol.* 1999; 202: 1551–1559.

Ribeiro JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* 1995; 4: 143-152.

Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 1987; 32: 463-478.

Ribeiro JM. Vector saliva and its role in parasite transmission. Review. *Exp. Parasitol.* 1989; **69**: 104–106.

Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect. Immun.* 2007; 75: 3823-32.

Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 2003; 25:127-34.

Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, *PLOS Pathogens*. 2009; 5, e1000555.

Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, 2007; 29(12): 671-8.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(3): 353-9.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(11): 845-58.

Sacks, D.L., Kamhawi, S., Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.*, 2001 55, 453-483.

Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R., A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.*, 1991, 173:49–54

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83(6): 783-4.

Silva EM, Bertho AL, Mendonça SC. Effect of in vivo depletion of CD4⁺ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* 1994; 56(1):111-20.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(5): 525-34.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(3): 239-51.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CM de C, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 2009; 31(8): 423-31.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982; 76: 830-32.

Silveira FT. Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da Leishmaniose Cutânea Disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 1997; 158(11): 5374-83.

Soong L, Lanzaro GC: Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 70:278-283.

Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005; 128: 41-5.

Talamá-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol.* 1990; 144: 4817-24.

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

Theodos CM, Titus RG. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Parasite Immunol.* 1993; 15: 481–487.

Thiakaki M, Rohousova I, Volfova V, Volf P, Chang KP, Soteriadou K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect.* 2005; 7: 760-766.

Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988; 239(4845): 1306-8.

Titus RG, Ribeiro JM. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. *Parasitol. Today* 1990; 6: 157-160.

Titus RG, Ribeiro JM.,. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988, 239:1306–8

Van Zandbergen GK M, Mueller A, Dannenberg S, Gerbert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*. 2004; 173: 6521-5.

Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol*. 2011; 79: 674 – 62.

Wikel SK, Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *Bioscience*. 1999a; 49: 311–320.

Wikel SK, Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol*. 1999b; 29: 851–859.

World Health Organization (WHO). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases 2010. Geneva.

Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med*. 1983; 15.

Zidek Z. Adenosine–cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw*. 1999; 10: 319–328.