

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Débora Elienai de Oliveira Miranda

EFEITO DO HOMOGENEIZADO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Migonemyia*
migonei NA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM CAMUNDONGOS

BALB/C

Recife

2021

DÉBORA ELIENAI DE OLIVEIRA MIRANDA

EFEITO DO HOMOGENEIZADO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Migonemyia migonei* NA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/C

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Filipe Dantas Torres

Coorientadora: Dra. Luciana Aguiar Figueredo

Recife

2021

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

M672e Miranda, Débora Elienai de Oliveira.

Efeito do homogeneizado das glândulas salivares de *Migonemyia migonei* na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos Balb/C/ Débora Elienai de Oliveira Miranda– Recife: [s. n.], 2021.

93 p.: il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

Orientador: Filipe Dantas Torres; coorientadora: Luciana Aguiar Figueredo.

1. Leishmaniose cutânea. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Camundongos. 4. Saliva. I. Torres, Filipe Dantas. II. Figueredo, Aguiar Figueredo. III. Título.

CDU 616.993.161

DÉBORA ELIENAI DE OLIVEIRA MIRANDA

EFEITO DO HOMOGENEIZADO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Migonemyia migonei* NA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/C

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciências.

Aprovado em: 17 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Vlúdia Maria Assis Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Karine de Araújo Soares
Fundação Altino Ventura

Dr. Filipe Dantas Torres
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

A quem nunca me permitiu desistir.
Fonte de minha energia.
A minha mãe, Maria Salete.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre agiu a favor dos meus sonhos, guiando meus passos com muita luz, amor e sabedoria.

Ao meu pai (*in memorian*) pela saudade e pelos momentos que vivemos juntos. À minha Mãe, minha flor mais linda, por ser luz e compaixão, pelas noites trabalhadas para garantir meus estudos, pela ausência que sentiu sem reclamar, pelo amor incondicional, incentivo e por ser resiliente. Sua força será sempre meu maior orgulho! Nossa simbiose é para além da vida. *Amo!*

À minha família, pelo apoio sem o qual eu nada faria, pela saudade que superou distâncias, em especial aos meus irmãos e meus sobrinhos e ao mais novo amor da minha vida, minha sobrinha Duda, por ter chegado inesperadamente e ter me ensinado o verdadeiro sentido da palavra resiliência. *Amo vocês!* À família Lins e agregados (minha família pernambucana) por todo carinho, confiança, apoio, torcida e acolhimento.

Ao meu amor, Henrique Araújo, pela paciência, amor e incentivo. Foi meu ombro amigo como força e estímulo para continuar, por nunca me negar sorrisos nos meus momentos de incertezas. *Te amo, Xinho!*

À minha eterna amiga Bárbara Ribeiro (*in memorian*)..... É inenarrável o meu amor e minha gratidão! Um dia nos encontraremos...

Ao Dr. Filipe Dantas Torres, meu orientador pelos conselhos, confiança e valiosos ensinamentos. Por ter confiado no meu potencial e no meu trabalho, me dando oportunidades que me transformaram na profissional que sou hoje. A minha eterna gratidão e o meu muitíssimo obrigada!

Agradeço à Dra. Luciana Figueiredo, minha co-orientadora, por todo carinho, ensinamentos e contribuição com esse trabalho.

Ao Dr. Sinval Pinto Brandão Filho por ter me apresentado o perfeito mundo dos flebotômíneos, pela simplicidade e confiança com que me recebeu na FIOCRUZ. Seu apoio tornou o meu sonho possível e isso jamais esquecerei. OBRIGADA!

À Dra. Virgínia Lorena, por ter aceitado contribuir com esta pesquisa e ter abraçado essa responsabilidade. Obrigada por ser luz, por toda empatia e pela sua disposição sem limites. Pela amizade, pelos abraços e por ser compreensão para mim e tantos outros estudantes da Fiocruz-PE.

À Diego por todo carinho e amor! Sem dúvidas você foi e será luz no meu caminho, jamais esquecerei o apoio incondicional, as palavras de conforto e incentivo, além claro das risadas e boas conversas. Gratidão! A Neide Xavier pela amizade e carinho. Yury Yzabella pela torcida nos momentos decisivos. À Roberto Werkhauser por toda sapiência, humildade e longas conversas. À Marcela por todo carinho, torcida e positividade.

A Fernando e Pietra, queridos amigos-irmãos! A gratidão pelo aprendizado na identificação de flebotômíneos e coletas, na verdade, tal gratidão não tem como ser expressa em um simples texto. Agradeço imensamente pelo companheirismo e pelas valiosas trocas de experiências. O campo não seria o mesmo sem a presença de vocês.

Aos meus queridos amigos que me ensinaram muito mais que livros: meus amores baianos! Lo, Ise, Livinha, Jéssica, Keu e Grênivel por se fazerem presentes mesmo com 809 km de distância.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa “VBDs One Health”: Jo, por todo carinho e por ser minha dupla desde o início dessa jornada; Rafa minha pequena guerreira pela disciplina e por todo incentivo; Kamis por toda disponibilidade e ajuda em todas as etapas; Suênia e Lucas pelas discussões científicas nas reuniões. Meu muito obrigada por todo aprendizado (não somente científico, aprendizado para vida).

À Dr^a Sheilla por todo carinho a mim dedicado, pelos conselhos de mãe, ensinamentos, por todo apoio no biotério e por sempre acreditar em mim. A pernambucana mais baiana que conheci. Te amo muito!

A todos os profissionais do biotério pela dedicação e por todo apoio com os animais.

À turma de Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, 2017.1, do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE). Em especial a Aline (a gaúcha que me ensinou que posso além do que imagino) e Jo, por se fazerem presentes em todas as etapas, foi um prazer compartilhar essa experiência com vocês. *Amo!*

Às comissões da VII e VIII SBBS por todo o aprendizado e momentos maravilhosos. Lembrarei sem dúvidas das melhores edições do evento, pois compartilhamos ciência de qualidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP) por todo apoio e carinho em todos os momentos. Em especial a Érica, Andrea e Amandinha por toda ajuda nos experimentos.

Agradeço ao universo por permitir e me ensinar a viver nessa etapa com mais leveza, fluidez e resiliência mesmo que tenha sido nos momentos finais. E pela certeza de que tudo vem a mim com facilidade, alegria e glória!

“O que eu penso não muda nada além do meu pensamento, o que eu faço a partir disso, muda tudo!”

(KARNAL, 2017)

MIRANDA, Débora Elienai de Oliveira. **Efeito do homogeneizado das glândulas salivares de *Migonemyia migonei* na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c**. 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

A leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a forma clínica de leishmaniose mais difundida nas Américas. *Migonemyia migonei* é uma espécie de flebotomíneo amplamente distribuída no Brasil e tem sido implicada como vetor de *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, investigamos os efeitos do homogeneizado de glândula salivar (SGH) de *Mg. migonei* no curso da infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c. Os camundongos foram separados em quatro grupos (seis por grupo): CTRL (camundongos não infectados); SGH (camundongos inoculados com SGH de *Mg. migonei*); SGH+LEISH (camundongos inoculados com SGH de *Mg. migonei* mais promastigotas de *L. (V.) braziliensis*); LEISH (camundongos inoculados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*). Os camundongos foram acompanhados por 8 semanas e a resposta imune foi avaliada por citometria de fluxo no final do experimento. A análise da produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5, SGH 0,25 de *Mg. migonei* ou estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (LSA) demonstrou que após estímulo com SGH 0,25, a produção de IL-17A e TNF não foi sustentada no grupo SGH, que apresentou níveis decrescentes destas citocinas após 5 dias em comparação com 3 dias de incubação. Analisando a produção de citocinas após a estímulo com LSA, observamos níveis mais baixos de IL-17A no grupo SGH após 5 dias em comparação com 3 dias. O mesmo foi observado para IFN- γ no grupo SGH. No entanto, os níveis de TNF foram significativamente mais elevados no grupo LEISH após 5 dias em comparação com 3 dias. Entre os camundongos do grupo SGH+LEISH e LEISH, três animais em cada grupo desenvolveram lesões cutâneas na cauda, o tamanho médio da lesão foi significativamente maior no grupo LEISH. Nossos achados sugerem que SGH de *Mg. migonei* pode modular a resposta imune em BALB/c sob estímulo do antígeno de *L. (V.) braziliensis*, refletido pela baixa produção ou diminuição precoce de citocinas pró-inflamatórias em culturas de células esplênicas. Nossos dados também sugerem que a saliva de *Mg. migonei* pode reduzir o tamanho da lesão em camundongos BALB/c, mas pesquisas adicionais com um tamanho de amostra maior são necessárias para confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea; camundongos; saliva; *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

MIRANDA, Débora Elienai de Oliveira. **Efeito do homogeneizado das glândulas salivares de *Migonemyia migonei* na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c.** 2021. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most widespread clinical form of leishmaniasis in the Americas. *Migonemyia migonei* is a widely distributed phlebotomine sand fly species in Brazil and has been implicated as a vector for *L. (V.) braziliensis*. In the present study, we investigated the effects of salivary gland homogenates (SGH) of *Mg. migonei* on the course of *L. (V.) braziliensis* infection in BALB/c mice. Mice were separated into four groups (six mice per group): CTRL (uninfected mice); SGH (mice inoculated with *Mg. migonei* SGH); SGH+LEISH (mice inoculated with *Mg. migonei* SGH plus *L. (V.) braziliensis* promastigotes); LEISH (mice inoculated with *L. (V.) braziliensis* promastigotes). Mice were followed up for 8 weeks and the cellular immune response was evaluated by flow cytometry at the end of the experiment. Analysis of cytokine production by splenic cells stimulated with 0.5 SGH, 0.25 SGH of *Mg. migonei* or *L. (V.) braziliensis* soluble antigen stimulation (LSA) demonstrated that upon stimulation with SGH 0.25, the production of IL-17A and TNF was not sustained in the SGH group, with decreasing levels of these cytokines after 5 days compared to 3 days of incubation. Analyzing the production of cytokines after LSA stimulation, we observed lower levels of IL-17A in the SGH group after 5 days compared to 3 days. The same was observed for IFN- γ in the SGH group. Yet, the levels of TNF were significantly higher in the LEISH group after 5 days compared to 3 days. Among SGH+LEISH and LEISH mice, three animals in each group developed skin lesions on the tail, the mean lesion size was significantly higher in the LEISH group. Our study suggests that *Mg. migonei* SGH may modulate BALB/c immune response, as reflected by the low production or early decrease of pro-inflammatory cytokines in splenic cell cultures following stimulation with *L. (V.) braziliensis* antigen. Our data also suggest that *Mg. migonei* saliva may reduce the lesion size in BALB/c mice, but further research with a larger sample size is needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; mice; salivary; *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Comparação de glândulas morfológicamente heterogêneas e homogêneas..	31
Figura 2-	Microscopia eletrônica de varredura de glândula salivar de <i>Mi. migonei</i>	32
Figura 3-	Modelo hipotético representando a resposta imune em hospedeiros expostos a picadas de flebotomíneos.....	35
Figura 4-	Inoculação de camundongos BALB/c com <i>L. (V.) braziliensis</i> , SGH ou ambos.....	44
Figura 5-	Medição da espessura da pata com auxílio de um paquímetro.....	45
Figura 6-	Desenho experimental para medição de citocinas utilizando o baço de BALB/c.....	46
Figura 7-	Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	48
Figura 8-	Camundongo com caquexia e lesões leves não ulcerativas.....	49
Figura 9-	Lesões na cauda do camundongo.....	49
Figura 10-	Eletroforese em gel de agarose.....	51
Figura 11-	Avaliação dos níveis de citocinas detectados no sobrenadante de cultura após 3 dias entre os grupos experimentais após estimulação <i>in vitro</i>	53
Figura 12-	Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SHG 0,5 após 3 dias.....	54
Figura 13-	Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5 após 5 dias.....	55
Figura 14-	Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura (5 dias) nos grupos estudados após estímulo <i>in vitro</i>	56
Figura 15-	Produção de citocinas em cultura de células esplênicas ao longo do tempo após estímulo com SGH 0,5.....	58
Figura 16-	Comparação de citocinas no sobrenadante de cultura (3 dias e 5 dias) após o estímulo.....	59
Gráfico 1-	Tamanho das lesões nos grupos SGH+LEISH e LEISH.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO	Adenosina
AgST	Frações antigênicas solúvel
AMP	Adenosina monofosfato
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BALB/c	Linhagem de camundongo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
ConA	Concanavalina A
C3H/HeJ	Linhagem de camundongo
C57BL/6	Linhagem de camundongo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gp63	glicoproteína 63
HIV/AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDMR	Intradermoreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
NO	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SGH	Homogeneizado de glândula salivar
SGS	Sonicato de glândula salivar
ROS	Espécies reativas de oxigênio

TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Linfócitos T auxiliares
Tregs	Células T regulatórias
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Leishmanioses	19
2.1.1 Aspectos gerais e impactos na saúde pública.....	19
2.2 Leishmaniose visceral	20
2.3 Leishmaniose tegumentar americana	21
2.3.1 Etiologia e vetores.....	21
2.3.2 Distribuição e epidemiologia.....	22
2.4 Resposta imune celular na LTA	23
2.5 Modelos murinos	26
2.5.1 O modelo de infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	26
2.5.2 O modelo de infecção por <i>L. (L.) major</i>	27
2.5.3 O modelo de infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	29
2.6 Composição e importância da saliva	30
2.7 Efeito da saliva de flebotomíneos na infecção por <i>Leishmania</i>	34
3 JUSTIFICATIVA	38
4 PERGUNTA CONDUTORA	39
5 HIPÓTESE	40
6 OBJETIVOS	41
6.1 Geral.....	41
6.2 Específicos.....	41
7 METODOLOGIA	42
7.1 Aspectos éticos.....	42
7.2 <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	42
7.3 Preparação de antígeno solúvel	42
7.4 Produção do homogeneizado de glândulas salivares	43
7.5 Inoculação de camundongos BALB/c com <i>L. (V.) braziliensis</i> , SGH ou ambos.....	43
7.6 Avaliação macroscópica da infecção.....	44

7.7 Cultura de células para dosagem de citocinas.....	45
7.8 Extração de DNA.....	46
7.9 Diagnóstico Molecular.....	46
7.10 Detecção dos níveis de citocinas Th1/Th2/Th17 em sobrenadante de cultura através da técnica de <i>Cytometric Beads Array</i> (CBA).....	47
7.11 Análise estatística.....	47
8 RESULTADOS.....	48
8.1 Perfil eletroforético de antígenos solúveis de <i>Leishmania</i> (LSA).....	48
8.2 Avaliação macroscópicas da infecção.....	49
8.3 Detecção de DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i> em camundongos infectados.....	51
8.4 Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5, SGH 0,25 e LSA após 3 dias.....	51
8.5 Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5, SGH 0,25 e LSA após 5 dias.....	54
8.6 Produção de citocinas em cultura de células esplênicas ao longo do tempo.....	57
8.7 Correlação entre a produção de IL-10, TNF e IFN-γ após diferentes estímulos.....	60
9 DISCUSSÃO.....	62
10 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA TROPICA ...	81
ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por várias espécies de *Leishmania*, transmitidas pela picada de flebotomíneos vetores (ALVAR *et al.*, 2012). A doença tem um amplo espectro clínico, variando de úlceras cutâneas localizadas com autocura até lesões mucocutâneas mutilantes graves ou doença visceral com risco de vida. A progressão da doença está relacionada a diversos fatores, incluindo a genética do hospedeiro, tipo de cepa, resposta imune do hospedeiro e linhagens de camundongos em estudos envolvendo animais (LUZ *et al.*, 2018; ZIJLSTRA, 2016).

Neste sentido, fatores relacionados aos vetores também podem influenciar o curso das infecções por *Leishmania* spp. (LESTINOVA *et al.*, 2017; TIRADO *et al.*, 2020). No momento da transmissão das promastigotas metacíclicas de *Leishmania*, o flebotomíneo também inocula sua saliva no hospedeiro. A saliva possui propriedades farmacológicas que favorecem a sobrevivência do parasita no organismo do hospedeiro (TITUS; RIBEIRO, 1988). De fato, por interferir na homeostasia local (respostas inflamatórias e imunológicas), a saliva do flebotomíneo provoca importantes alterações fisiológicas e imunológicas locais que favorecem a transmissão e o estabelecimento de *Leishmania* spp. (ANDRADE *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2008; ROHOUSOVÁ; VOLF, 2006).

Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar americana (LTA) têm sido usados para investigar os efeitos do homogeneizado de glândula salivar de flebotomíneos (SGH) no curso da infecção por diferentes *Leishmania* spp. Por exemplo, diferentes estudos investigaram os efeitos do SGH em camundongos co-inoculados com *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* em camundongos BALB/c, que é o agente causador da LTA mais difundido nas Américas. No início da década de 1990, Samuelson *et al.* (1991) demonstraram que a SGH de *Lutzomyia longipalpis* co-inoculada com *L. (V.) braziliensis* induziu o aumento do tamanho e a duração das lesões. No entanto, *Lu. longipalpis* não é um vetor natural de *L. (V.) braziliensis* e várias outras espécies de flebotomíneos são conhecidas por transmitirem esse parasita nas Américas (BRASIL *et al.*, 2015). Assim, a questão se SGH de diferentes espécies de flebotomíneos poderia exercer diferentes efeitos sobre *L. (V.) braziliensis* permaneceu.

Estudos subsequentes usando outras espécies de flebotomíneos, incluindo vetores naturais, confirmaram que o SGH desses flebotomíneos pode aumentar a infectividade de *L. (V.) braziliensis* e o tamanho das lesões (BEZERRA; TEIXEIRA, 2001; DONNELLY *et al.*, 1998). Por outro lado, Moura *et al.* (2007) demonstraram que o SGH de *Nyssomyia*

intermedia não promoveu proteção contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*, mas o desenvolvimento da lesão foi retardado. Além disso, um plasmídeo que expressa uma proteína salivar (Linb-11) isolada da saliva de *Ny. intermedia* foi capaz de proteger contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* (MOURA *et al.*, 2013). Em conjunto, os estudos mencionados acima sugerem que SGH de diferentes vetores de flebotomíneos podem ter efeitos diferentes no curso da infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos, aumentando a infectividade e o tamanho das lesões ou promovendo proteção ao hospedeiro.

Migonemyia migonei é uma espécie amplamente distribuída na América Latina. No Brasil pode ser encontrada em domicílios e abrigos de animais com capacidade de adaptação a ambientes modificados (GUIMARÃES *et al.*, 2012; RANGEL; LAINSON, 2009). Além disso, é uma espécie antropofílica e alimenta-se em cães, galinhas, equinos e em animais silvestres. *Migonemyia migonei* é vetor comprovado de *Leishmania (V.) braziliensis*, principal agente etiológico da LTA (NIEVES; PIMENTA, 2000). No estado de Pernambuco, *Mg. migonei* é relatada em áreas rurais, inclusive no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte (GUIMARÃES *et al.*, 2012) e onde há registro da taxa de infecção natural de 4% por *L. (Leishmania) infantum* (CARVALHO *et al.*, 2010). Nessa perspectiva, investigamos os efeitos clínicos e imunológicos do SGH de *Migonemyia migonei* no curso da infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c. Escolhemos esta espécie de flebotomíneo como modelo considerando seu papel proeminente como vetor de *L. (V.) braziliensis* (ALEXANDRE *et al.*, 2020; NIEVES; PIMENTA, 2000; SALES *et al.*, 2020).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

Nessa seção são descritas as características das leishmanioses.

2.1.1 Aspectos gerais e impactos na saúde pública

As leishmanioses são doenças tropicais com apresentações clínicas distintas. A apresentação clínica está relacionada com a complexa interação entre a resposta imune celular do hospedeiro e as diferentes espécies de protozoários e vetores (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As manifestações clínicas das leishmanioses podem variar de assintomática a letal. Isso está relacionado com a espécie infectante, a imunidade do hospedeiro, o vetor, o local e a dose de inoculação entre outros fatores (AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006).

De acordo com Vries, Reedijk e Schallig (2015) dependendo da espécie envolvida, observa-se três formas clínicas distintas. A leishmaniose cutânea (LC) que se manifesta pela presença de úlceras na pele, linfangites nodulares ou lesões satélites: a leishmaniose mucocutânea (LMC), com envolvimento da mucosa, e a leishmaniose visceral (LV), com envolvimento de órgãos internos (baço, fígado e medula óssea). São formas graves, sendo a LV potencialmente fatal quando não tratada precocemente e de forma adequada. A LV é caracterizada por induzir linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, apresentando taxas de letalidade que variam de 10 a 20%, permanece como um importante problema de saúde pública (ALVAR *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2012).

As leishmanioses estão distribuídas por 98 países, incluindo países das Américas, África, Ásia, Oriente Médio e Europa, sendo consideradas como algumas das principais doenças tropicais negligenciadas nessas regiões (CHAPPUIS *et al.*, 2007; MAROLI *et al.*, 2013). Um número considerável de casos não é registrado, uma vez que a notificação é obrigatória em somente 32 países. Apesar disso, estima-se que a prevalência da doença seja de aproximadamente 12 milhões de indivíduos e que, a cada ano, 1,2 milhões desenvolvem a forma cutânea e 400 mil desenvolvem a forma visceral da doença (ALVAR *et al.*, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Os dez países com maiores estimativas de casos de LC são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos representam cerca de 70% a 75% da incidência global da doença com 0,7 a 1,2 milhões de novos casos por ano (ALVAR *et al.*, 2012).

No contexto da saúde pública mundial, a LV é uma das doenças mais alarmantes, pois 90% dos casos acontecem somente em seis países: Bangladesh, Brasil, Sudão, Sudão do Sul, Índia e Etiópia, com estimativa de 200.000 a 400.000 novos casos por ano (ALVAR *et al.*, 2012). O aumento na distribuição da doença está relacionado também com às co-infecções, com a desnutrição, HIV/AIDS e fatores genéticos (ALVAR *et al.*, 2008, 2012; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; READY, 2014).

Por muito tempo, as leishmanioses constituíram endemias predominantemente rurais e silvestres (DEANE; DEANE, 1955; LAINSON, 1988; SHAW, 2007). As inúmeras mudanças no ambiente, à migração, e o processo de urbanização mudaram o habitual padrão epidemiológico (DESJEUX, 2004; PAVLI; MALTEZOU, 2010). Tais particularidades, relacionadas a fatores como as condições inapropriadas de vida, têm aumentado o número de casos em áreas urbanas (ARAÚJO *et al.*, 2013; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a), ressaltando a conexão entre a doença e as condições socioeconômicas da população (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; CLEM, 2010; DESJEUX, 2004).

2.2 Leishmaniose visceral

Nas Américas, *Leishmania (Leishmania) infantum* é a espécie que está relacionada com a ocorrência de casos de LV em cães e humanos. De acordo com Lazari *et al.* (2016) cães domésticos parasitados desempenham um papel importante na epidemiologia da doença.

A LV pode causar alta morbidade podendo ser fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos ocorrem a nível mundial a cada ano (OMS, 2018). Em 2013, mais de 90% dos casos notificados ocorreram em sete países (Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão) (MAROLI *et al.*, 2013). No Brasil a sua ocorrência está em constante expansão, o maior número de casos se concentra na região Nordeste, apesar de nos últimos anos o total de casos confirmados ter reduzido de 83% para 58% (BRASIL, 2018). A sintomatologia clássica é febre recorrente, fadiga e perda de peso; a invasão das células sanguíneas e do sistema retículo-endotelial acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2006; REY, 2014)

2.3 Leishmaniose tegumentar americana

No continente americano, a LC é amplamente conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA), tendo registro desde o extremo sul dos Estados Unidos, até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. Devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, causa também envolvimento psicológico, com reflexos sociais e econômicos, sendo considerada uma doença ocupacional. Nesse sentido a LTA torna-se uma das afecções dermatológicas que merece atenção no que se refere às ações de saúde pública (BRASIL, 2007).

O agente etiológico de maior importância nas Américas é a *L. (V.) braziliensis* sendo a espécie mais prevalente. No Brasil é a única espécie que ocorre em todas as unidades federadas (BRASIL, 2007) e em Pernambuco há evidências que essa é a única espécie envolvida na transmissão da LTA com diversas variantes circulando (BRITO *et al.*, 2009; 2012).

2.3.1 Etiologia e vetores

São conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo 20 patogênicas ao homem (PAVLI *et al.*, 2010). As espécies que causam a LC no Velho Mundo pertencem ao complexo *Leishmania tropica* [*Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica*], sendo a maioria zoonótica com exceção da *L. (L.) tropica* que é antroponótica. Cepas de *L. (L.) infantum* na região Mediterrânea podem ser causadoras de LC, porém não comprometem órgãos internos (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; MASMOUDÍ *et al.*, 2013).

As espécies que causam a LTA no Novo Mundo pertencem ao complexo *Leishmania braziliensis* [*L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) peruviana*] e ao complexo *Leishmania mexicana* [*Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmani (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi*], sendo todas zoonóticas (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012).

Nas Américas, são elencadas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* implicadas na etiologia da LTA, no entanto, apenas sete espécies foram identificadas no Brasil, sendo uma

do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*. A maior diversidade etiológica ocorre nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (BRASIL, 2010).

A espécie encontrada em todas as regiões endêmicas do país é *L. (V.) braziliensis*. Além disso, é a mais prevalente em humanos e é transmitida por várias espécies de flebotomíneos (e.g. *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia* e *Psychodopygus wellcomei*) (RANGEL; LAINSON, 2009). Outras espécies também têm sido relatadas: a) *L. (V.) guyanensis*, ocorre às margens do Rio Amazonas, transmitida principalmente por *Ny. umbratilis*, *Nyssomyia anduzei* e *Ny. whitmani*; b) *Leishmania (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* também na região da Amazônia, transmitidas por *Trichophoromyia ubiquitalis* e *Bi. flaviscutellata*, respectivamente; c) *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi*, ocorrendo no Amazonas e Pará, e tem como principais vetores *Psychodopygus squamiventris*, *Psychodopygus paraensis*, *Psychodopygus ayrozai* e *Ny. whitmani* (SHAW; LAINSON, 1975).

2.3.2 Distribuição e epidemiologia

Provavelmente, os dados mais antigos sobre as leishmanioses nas Américas são do Peru, do período dos Incas. Descobertas arqueológicas dessa época já demonstravam deformações nos lábios e nariz em humanos, semelhantes àsquelas observadas na LTA. Assim, a LTA é considerada autóctone do continente americano (AZULAY, 1952; PESSOA; BARRETO, 1948).

Segundo um relatório da Organização Pan-Americana da Saúde, 51.098 casos de LTA foram registrados em 2014 nas Américas, com uma taxa de incidência de aproximadamente 20 casos por 100 mil habitantes. Os países com maior incidência foram o Brasil com 75% desses casos, seguido da Colômbia e Peru (Organização Pan-Americana da Saúde, 2016).

Diversas espécies estão relacionadas à etiologia dos casos de LTA sendo as prevalências associadas à *L. (V.) braziliensis* amplamente distribuída em países da América Central e do Sul; *L. (L.) amazonensis*, ocorrendo no Brasil, Colômbia, Bolívia, Guiana Francesa e Paraguai; *L. (V.) guyanensis* com distribuição no Brasil (Amazônia), Peru, Guiana Francesa, Colômbia e Suriname; e *L. (V.) panamensis* com distribuição na América Central e no norte da América do Sul (GOTO; LINDOSO, 2010; LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, a LTA é uma doença zoonótica que apresenta padrões de transmissão: silvestre, ocupacional, rural e periurbano. O padrão silvestre ocorre

em áreas de vegetação primária, onde acomete animais, podendo o homem ser infectado quando entra em contato com este ambiente. O padrão ocupacional está relacionado com a exploração desordenada da floresta, desmatamento, construção de estradas e atividades de ecoturismo. Os processos migratórios, a ocupação de encostas, aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais correspondem ao padrão rural e periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2007; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Vale ressaltar que o perfil periurbano de transmissão, está relacionado basicamente com a falta de saneamento básico, a situação econômica precária, a migração da população para as cidades, a construção de estradas e ao convívio com animais que servem de novos reservatórios da doença.

Além disso, a epidemiologia da LTA é bastante complexa, com várias espécies de *Leishmania* circulantes numa mesma área geográfica, vários hospedeiros reservatórios, muitos vetores, manifestações clínicas e resposta terapêuticas variáveis (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Adicionalmente, surtos de LTA no Brasil são frequentes entre homens em idade produtiva, que invadem a floresta por razões diversas, como para treinamento militar (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017a).

2.4 Resposta imune celular na LTA

A LTA apresenta um grupo de doenças com características imunológicas e clínicas distintas, cujo desenvolvimento e a exacerbação dos sintomas estão ligados a fatores diversos (e.g. a resposta imune do hospedeiro e a espécie de parasita). Durante a resposta imune do hospedeiro humano na LTA, há uma expansão de tipos celulares, caracterizados por linfócitos T CD4+, apresentando um perfil de citocinas T helper do tipo Th1 ou Th2 (HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006; REIS *et al.* 2006).

Na resposta do tipo Th1, as citocinas IFN- γ e TNF- α serão produzidas, ativando macrófagos e, por conseguinte levando a destruição dos parasitas. Já numa resposta do tipo Th2, as citocinas IL-4 e IL-10 irão inibir a ativação de macrófagos, desta maneira, favorecendo a multiplicação dos parasitas e o surgimento de lesões variadas (REIS *et al.*, 2006). A *Leishmania* é capaz de modular a resposta imune celular para uma resposta do tipo Th2, promovendo a persistência da infecção (REIS *et al.*, 2006).

A resposta imune adaptativa do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania* é regulada por vias bastante complexas. Pesquisas relacionadas à resposta imune mediada por células (respostas profiláticas dos linfócitos *in vitro* e diagnóstico pela intradermoreação de Montenegro – IDMR), em locais endêmicos, evidenciaram que um grupo de indivíduos infectados com *Leishmania* evoluiu para o desenvolvimento de sintomas clínicos da doença (DAVIES *et al.*, 1995). De acordo com inquéritos epidemiológicos aplicados em áreas onde a LTA é endêmica, somente cerca de 3% dos indivíduos infectados por parasitos do subgênero *Viannia* desenvolveram lesões dérmicas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Desta maneira, frente à infecção por esses parasitas, há indivíduos resistentes (assintomáticos) e outros com graus variados de susceptibilidade (sintomáticos) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Os macrófagos atuam através da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e intermediários tais como o óxido nítrico (NO), que provocam a morte dos parasitas (SOONG; HENARD; MELBY, 2012). Dessa forma, é a partir da ativação de macrófagos via IFN- γ secretada por células Th1 que ocorre a morte do parasita. Essa citocina é fundamental no estabelecimento e manutenção de uma resposta imune protetora (CASTELLANO *et al.*, 2009).

Ao longo da sua evolução, as leishmânias desenvolveram mecanismos para manipular o sistema de defesa do hospedeiro (NEVES, 2012). Dentre esses, está a produção de dois importantes glicoconjugados de superfície: glicoproteína 63 (gp63) e o lipofosfoglicano. A gp63 auxilia na ligação do parasito aos receptores dos macrófagos e o lipofosfoglicano auxilia na ativação do sistema complemento com o propósito de induzir a fagocitose e proteger os parasitos incluídos nos fagolisossomos, inibindo as enzimas lisossomais (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ROBINS; COTRAN, 2005).

No cenário que envolve a imunidade adaptativa, os linfócitos T CD4⁺ apresentam um papel dicotômico na resposta do hospedeiro à LTA, sendo capaz de promover uma resposta protetora com perfil do tipo Th1 ou acarretando na persistência da doença e sua patologia por produzir um perfil do tipo Th2. Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é bem caracterizada como a resposta em camundongos, devido a sua complexidade (REIS *et al.*, 2006). Na LTA humana, a diferenciação de células T CD4⁺ para o tipo Th1 é mediada por IL-12 que é produzida por macrófagos. A resposta imune do tipo Th1 com produção de (IFN- γ e TNF- α) vem sendo relacionada ao controle da infecção por ativação dos macrófagos, e

consequentemente morte do parasita (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012; AMEEN, 2010; KEDZIERSKI, 2010).

A atuação da citocina IFN- γ em cooperação com TNF- α ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de macrófagos a produzir NO, resultante da morte intracelular do parasito e do controle da doença. Em contrapartida, citocinas como TGF- β , IL-4 e IL-10 favorecem o aumento dos parasitos através da diminuição na produção de IFN- γ e bloqueio da ativação de macrófagos, reduzindo assim o NO (GOMES-SILVA *et al.*, 2007, NYLÉN; GAUTAM, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

De acordo com Alexander e Brombacker (2012), a caracterização recente de populações celulares importantes como as células do tipo Th9 e as células T regulatórias (Tregs) assim como a análise das interações parasito-hospedeiro nas infecções por diferentes espécies de *Leishmania* tem levantado à questão do paradigma Th1/Th2 como um padrão simples de susceptibilidade e resistência. As Tregs estão ligadas a manutenção da homeostase imune através da deleção de células T auto-reativas e secreção de mediadores anti-inflamatórios como é o caso da IL-10. Além disso, a função das Tregs durante a infecção por *Leishmania* é multifacetada, e a proteção da doença ou promoção dependerá do modelo experimental estudado.

Assim sendo, o paradigma da resposta Th1/Th2 em humanos foi aceito até 2005, quando uma população celular foi identificada e tornou-se conhecida como Th17. A interleucina IL-17, principal citocina secretada por este perfil celular, pode desempenhar um papel patogênico em um amplo espectro de doenças humanas, particularmente em condições inflamatórias crônicas quando a inflamação, muitas vezes desencadeada por agentes desconhecidos, não pode ser adequadamente atenuada pelo sistema imunológico (COSMI *et al.*, 2014).

Diante deste espectro de atividades, a IL-17 tem sido alvo de estudos nas infecções por *Leishmania* spp. Entretanto, apesar dos estudos realizados pela academia nos últimos anos, resultados controversos têm sido encontrados e a atuação da IL-17 como fator de resistência ou susceptibilidade na LTA ainda não é bem compreendida (BACELLAR *et al.*, 2009; NOVOA *et al.*, 2011).

Porém, um estudo recente realizado por Gonçalves-de-Albuquerque *et al.* (2017), concluiu que as células Th17 são um modulador crucial da imunidade adaptativa contra *Leishmania* spp., atuando principalmente no recrutamento de neutrófilos e desempenhando um duplo papel no local da infecção. Até o momento, informações obtidas através de

avaliações de pacientes e modelos experimentais sugerem que a influência da IL-17 e neutrófilos ao longo das infecções por *Leishmania* é totalmente dependente do tecido (pele ou fígado/baço) e espécies parasitárias. O tempo em que os neutrófilos são recrutados e a persistência da IL-17 no microambiente da infecção também podem ser significativos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Tais mecanismos imunológicos promovem a persistência do parasita após a cura clínica da doença. A confirmação da persistência em indivíduos curados clinicamente levanta várias questões a respeito da epidemiologia, da evolução clínica e das estratégias de controle das leishmanioses (MENDONÇA *et al.*, 2004).

2.5 Modelos murinos

Para melhor entender os mecanismos imunológicos, genéticos e as infecções humanas por *Leishmania* spp., modelos de infecções experimentais com diferentes linhagens de camundongos têm sido utilizados.

Modelos experimentais de infecção são instrumentos importantes para estudos sobre as leishmanioses, tanto no que se refere ao desenvolvimento da doença quanto na resposta imune subsequente. Tais modelos permitem avaliar o papel dos diferentes componentes da resposta imune e os resultados de pesquisas têm permitido a visualização de estratégias terapêuticas e de desenvolvimento de vacinas.

Determinadas linhagens de camundongos são resistentes à infecção ao passo que outras são suscetíveis, possibilitando estudar os mecanismos imunes que regulam a resposta ao parasito. Alguns modelos são usados no estudo das leishmanioses causadas por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*.

2.5.1 O modelo de infecção por *L. (V.) braziliensis*

Os camundongos BALB/c foram considerados os mais suscetíveis à infecção, muito embora a *L. (V.) braziliensis* não cause, nessa linhagem, lesões severas e duradouras (CHILDS *et al.*, 1984). Há uma dificuldade para se alcançar uma boa relação entre a resposta à infecção por *L. (V.) braziliensis* no animal e no homem, dificultando assim o estudo em laboratório. No caso do BALB/c que notoriamente polariza a uma resposta de susceptibilidade em *L. (L.) major*, observa-se um perfil de resposta imune variado, possivelmente devido a

variantes de *L. (V.) braziliensis* em circulação no continente americano (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998).

Nas lesões provocadas por *L. (V.) braziliensis*, um fator interessante são as fortes características da resposta celular do tipo Th1 induzida por alta produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17), ainda que a carga parasitária nas lesões apresentem níveis baixos (GOMES *et al.* 2014). Tal fator parece diferenciar a resposta à *L. (V.) braziliensis* da resposta frente às outras espécies relacionadas às formas clínicas da LV e da leishmaniose difusa (DANTAS *et al.*, 2014; GAZE *et al.*, 2006).

Trabalhos desenvolvidos por Moura *et al.* (2005), mostraram que camundongos BALB/c infectados com 10^5 parasitos na derme da orelha desenvolveram uma lesão cutânea no local da inoculação e tal lesão foi semelhante às observadas em pacientes com LC.

A infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos isogênicos normalmente resulta em um fenótipo de resistência de acordo com Rocha *et al.* (2007). Estudos realizados por Pereira *et al.* (2009) utilizando camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com isolados de *L. (V.) braziliensis* e com uma cepa de referência de *Leishmania* do complexo *L. (V.) braziliensis* observaram lesão na pata infectada sem ulcerações nas duas linhagens de camundongos. Rocha *et al.* (2007) tiveram resultados similares, no qual as mesmas linhagens infectadas também com cepa de *L. (V.) braziliensis* apresentaram uma pequena lesão, sem ulcerações e com posterior cura espontânea da lesão.

Um estudo realizado com BALB/c sugere que diferentes populações de células dendríticas poderiam induzir respostas específicas às várias espécies de *Leishmania*. No entanto, as células dendríticas dermais auxiliam no desenvolvimento de um perfil Th1 predominando linfócitos T na infecção por *L. (V.) braziliensis*, ao passo que as células de Langherans auxiliariam impedindo a expressão de Th1 em *L. (L.) amazonensis* (CARVALHO *et al.*, 2016).

2.5.2 O modelo de infecção por *L. (L.) major*

Trabalhos com camundongos isogênicos infectados por *L. (L.) major* contribuem para o conhecimento no que se refere à resposta imunológica na LC (PEREIRA *et al.*, 2009; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2009). Em tais modelos, podem ocorrer dois tipos de respostas pelos camundongos frente à infecção: a resposta Th1 e a Th2

correlacionadas aos fenótipos de resistência e susceptibilidade, respectivamente (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Logo após a infecção com as formas promastigotas de *L. (L.) major*, ocorre uma resposta inflamatória local intensa, seguida de um recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da infecção (MOUGNEAU; BIH; GLAICHENHAUS, 2011).

O modelo de infecção por *L. (L.) major* é demonstrado nos camundongos BALB/c (modelo de suscetibilidade) e pelos camundongos C57BL/6 (modelo de resistência). A infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c acarreta em uma resposta com perfil de linfócitos TCD4⁺ do tipo Th2, já que se desenvolve em locais com níveis altos de IL-4 e baixos de IFN- γ o que caracteriza esse modelo (BALB/c) como suscetível à infecção (LOKE *et al.*, 2007).

A relação oposta da expressão gênica de IFN- γ e IL-4 nos modelos organiza as bases para a composição das respostas humoral e celular, diferentes às infecções pelo mesmo parasito nos tipos de camundongos (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000). Em humanos, níveis altos de IL-4 em pacientes com leishmaniose cutânea difusa não são encontrados, indicando que a resposta Th2 pode ter menos relevância para a gravidade da doença em humanos do que em camundongos (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000).

Em um sistema livre da resposta Th1 ou Th2, a citocina IL-10 impossibilita a formação de NO por macrófagos infectados. No momento em que os macrófagos fagocitam parasitos opsonizados por IgG do hospedeiro, estes são impulsionados a fabricarem grandes quantidades de IL-10, favorecendo assim a proliferação do parasita (KANE; MOSSER, 2001; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2003). Assim, existem outros mecanismos além da polarização (Th1/Th2) que beneficiem os perfis de resistência e susceptibilidade a infecção por *L. (L.) major*.

Watanabe *et al.* (2004) afirmam que a linhagem de camundongos (C57BL/6) produzem baixos níveis de IL-4 quando infectados por vários parasitas. Na escassez de IL-4, os animais conseguem responder naturalmente à lesão cutânea ocasionada durante os procedimentos experimentais por *L. (L.) major*, o que está associado com a presença de linfócitos TCD4⁺ polarizados para um perfil do tipo Th1 com níveis elevados de IFN- γ . Tal polarização acontece nos linfonodos drenantes do sítio inflamatório em consequência dos níveis altos de IL-12 produzida pelas células dendríticas no local da infecção.

A agregação de IFN- γ e TNF- α acarreta na ativação de uma população de macrófagos com função microbicida. O macrófago quando infectado e ativado fornece ânions superóxido

e radicais de nitrogênio e oxigênio. Ocorre a produção de NO, por meio do metabolismo do aminoácido L-arginina pela enzima iNOS e isso elimina o parasito intracelular (TRACEY *et al.*, 2008).

2.5.3 O modelo de infecção por *L. (L.) amazonensis*

A polarização Th1/Th2 e o papel no desenvolvimento de modelos de suscetibilidade e resistência apontados na infecção por *L. (L.) major*, servem de padrão para estudos sobre a relação entre resposta imunológica do hospedeiro e os parasitos do gênero *Leishmania* (MCMAHON-PRATT e ALEXANDER, 2004). No entanto, o papel protetor e estimulador de suscetibilidade não se aplica a todos os hospedeiros e espécies de parasitos (JI; SUN; SOONG, 2003; MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). A maioria das linhagens de camundongos são susceptíveis à *L. (L.) amazonensis* (exceto C3H/HeJ), inclusive a linhagem C57BL/6 que é resistente frente à infecção por *L. (L.) major*. Os hospedeiros apresentam lesões crescentes com formação de vacúolo parasitóforo nas células infectadas, com alta carga parasitária (QI; POPOV; SOONG, 2001).

Tais modelos de susceptibilidade não estão necessariamente, associados a uma resposta do tipo Th2 e/ou a uma elevada produção de IL-4, mas a níveis baixos de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-17), sendo que esta situação inicial pode ser importante para a sobrevivência do parasito e manutenção da carga parasitária (JI; SUN; SOONG, 2003).

Hermida *et al.* (2014) relataram que a infecção por *L. (L.) amazonensis* impede a migração de células dendríticas do sítio de infecção aos linfonodos drenantes, ocorrendo acúmulo de células de Langherans. Pode ocorrer níveis baixos na produção de IL-12 e comprometimento na expressão da cadeia $\beta 2$ de seu receptor, favorecendo assim a susceptibilidade para este organismo, uma vez que o receptor da IL-12 é um ponto de controle para a resposta imune à leishmaniose (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000).

Na infecção por *L. (L.) amazonensis* os neutrófilos apresentam um papel de proteção. Camundongos (BALB/c) quando infectados tornam-se mais susceptíveis quando ocorre redução de neutrófilos, num mecanismo que pode ser dependente de IL-10 e IL-17 (SOUSA *et al.*, 2014). Além disso, na infecção por *L. (L.) amazonensis* a citocina IFN- γ , apresenta um papel bem importante. Em baixas doses, esta citocina, pode beneficiar a proliferação das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos infectados *in vitro*, mesmo propiciando a morte das formas promastigotas (QI *et al.*, 2004).

Geraldo *et al.* (2016), mostraram também que além dos macrófagos, a *L. (L.) amazonensis* é internalizada pelas células fagocíticas derivadas de B-1, e essas células apresentaram uma grande quantidade de parasitas internalizados quando comparadas com culturas de macrófagos peritoneais e derivados de medula. Durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*, as células Tregs parecem ter função protetora também, mas essa ação não está associada à produção de TGF- β e IL-10 (JI *et al.*, 2005).

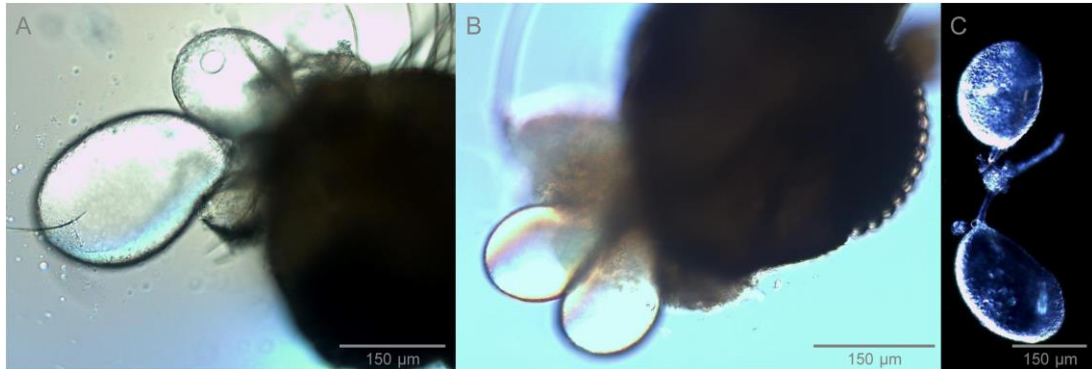
A compreensão de tais modelos é de grande relevância para entender as funções dos componentes da resposta imune no processo de infecção por *Leishmania*, tanto na exacerbação quanto no resultado da inflamação.

2.6 Composição e importância da saliva

A saliva apresenta um papel importante durante o repasto sanguíneo do vetor, modulando a resposta imune do hospedeiro e muitas vezes favorecendo a transmissão de patógenos. Devido a tal relevância, a caracterização dos componentes da saliva que são responsáveis por essas atividades é fundamental para entender os mecanismos de ação e o desenvolvimento de estratégias para interromper a transmissão do patógeno (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

O aparelho salivar dos flebotomíneos é composto por glândula salivar, dutos salivares, bomba salivar e um canal salivar (LESTINOVA *et al.*, 2017). As glândulas salivares são emparelhadas por uma camada única de epitélio (ADLER; THEODOR, 1926; ABDELBADEI *et al.*, 2012), podendo ser homogêneas (tamanho e forma) ou heterogêneas de acordo com a espécie de flebotomíneos (e.g. a glândula maior e totalmente inflada de *P. papatasi* pode atingir 180 x 140 μm) (Figura 1). A composição da saliva desses dípteros difere não somente entre espécies diferentes, mas também entre populações originárias de áreas geográficas distintas (LESTINOVA *et al.*, 2017; RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2015; ROHOUSOVÁ *et al.*, 2012; VOLF; TESAROVA; NOHYNKOVA, 2000; VOLF; ROHOUSOVÁ, 2001).

Figura 1 - Comparação de glândulas morfologicamente heterogêneas e homogêneas.



Fonte: Lestínova *et al.* (2017).

Legenda: (A) Par de glândulas heterogêneas de *Phlebotomus duboscqi* (269 x 178µm e 187 x 138µm) totalmente infladas; (B) Par de glândulas homogêneas de *Lu. longipalpis* totalmente infladas (166 x 106µm e 168 x 104µm).

Um estudo recente realizado por Nacif-Pimenta *et al.* (2020) mostraram que as glândulas apresentam aspectos morfológicos conservados e distintos de acordo com as diferentes espécies de flebotomíneos. Cada glândula salivar tem um único lobo arredondado constituído de 100-120 células secretoras. As células secretoras, de acordo com sua ultraestrutura e ligação à lectina, foram classificadas em cinco subpopulações diferentes, que podem diferir nas vias secretoras.

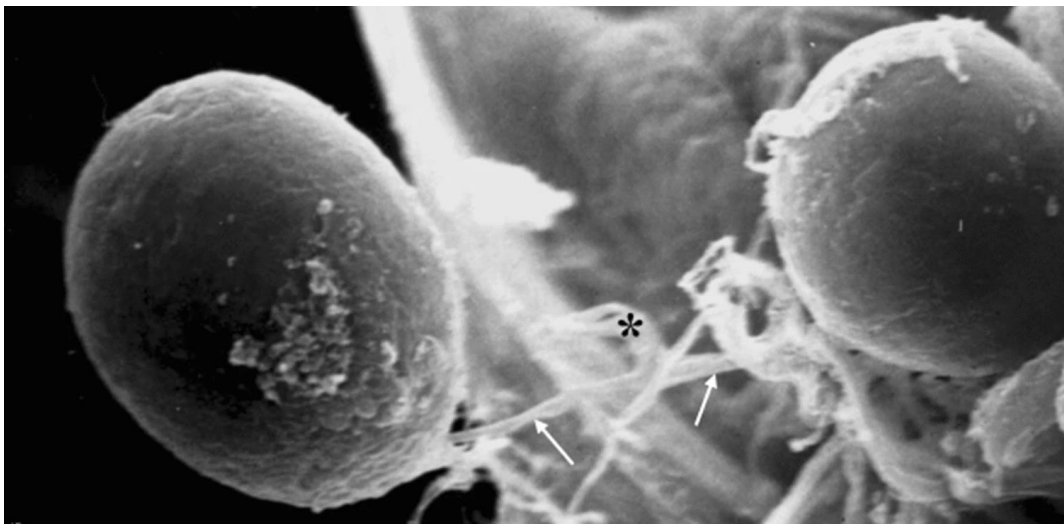
Estes morfológicos tipos de células secretoras estavam presentes com dissimilaridade entre as espécies estudadas. Dois tipos de células secretoras foram encontrados em *Lu. longipalpis* (tipo I e II), três em *P. duboscqi* (tipo I, II e III) e todos os cinco tipos de células foram encontrados em *Mi. migonei* (Figura 2). A glândula salivar de *Mi. migonei* apresentou a maior variedade de secreção celular com todos os cinco tipos diferentes. É provável que alguns tipos celulares estejam em desenvolvimento (células imaturas), entretanto, essa variedade de tipos de células secretoras diferenciadas (poucas organelas e muitas vesículas secretoras), sugerem que são, de fato, subpopulações de células secretoras maduras distintas.

A glândula salivar é um órgão composto de um pequeno número de células secretoras com poucos tipos de células, embora várias substâncias sejam produzidas e secretadas para formar a saliva. Abordagens proteômicas identificaram de 20-40 proteínas pertencentes a 13 famílias de espécies distintas destes insetos (ANDERSON *et al.*, 2006; VALENZUELA *et al.*, 2001; 2004; VLKOVA *et al.*, 2014). Assim, cada tipo de célula secretora pode estar envolvido na produção e secreção de diferentes componentes salivares. A morfologia evidenciou que em alguma glândulas o epitélio está em linha reta enquanto em outros grupos de células secretoras podem ser são projetados e parecem ser liberados no reservatório da

saliva. De acordo com o aspecto ultraestrutural da secreção da saliva, os tipos de células I e V são células merócrinas, células II e III são células exócrinas e as do tipo IV são células holócrinas (NACIF-PIMENTA *et al.*, 2020).

Durante o processo de secreção, toda a célula é liberada do epitélio com todo o seu conteúdo e posterior morte celular. O processo holócrino é uma morte celular programada, um mecanismo de apoptose (LIMAN; ALAN, 2013), demonstrando que a glândula desses vetores é uma glândula exócrina multifacetada, que apresenta uma variedade de tipos celulares, que executam um processo secretor distinto da saliva.

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de glândula salivar de *Mi. migonei*.



Fonte: Nacif-Pimenta *et al.* (2020).

Nota: Pequenos dutos (setas brancas) ligando os lóbulos da glândula ao ducto salivar comum (asterisco preto).

Os flebotomíneos apresentam peças bucais endurecidas e bastante curtas. Assim, durante o processo de alimentação sanguínea, estes insetos necessitam dilacerar a pele do hospedeiro com as mandíbulas presentes em sua probóscide até atingir às camadas superficiais da derme, onde rompem tecidos e dilaceram capilares formando um poço sanguíneo contendo também restos de tecido (ANDRADE *et al.*, 2007). Então, o hospedeiro reage por meio de três sistemas que incluem hemostasia, inflamação e imunidade que dificultam a alimentação (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014; FRANCISCHETTI, 2010). A saliva de flebotomíneos é composta por elementos farmacologicamente ativos denominados sialogeninas (do grego *sialo*, saliva) com propriedades capazes de contornar este ambiente inóspito, respondendo as dificuldades impostas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro e posteriormente finalizando a refeição sanguínea.

Além disso, apresenta um papel importante na transmissão de *Leishmania*. Sendo um aglomerado de substâncias com funções farmacológicas, tais como vasodilatadoras, anti-agregadoras de plaquetas, anti-hemostáticas, imunossupressoras, exacerbadoras da infecção e indutoras de infecciosidade de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado (ABDELADHIM *et al.*, 2014; FRANCISCHETTI, 2010; SOARES; TURCO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A homeostasia é controlada por componentes anti-agregação plaquetária, anti-coagulantes e vasodilatadores da saliva (RIBEIRO, 1995). Moléculas como a hialuronidase (que auxilia na difusão de outros componentes); apirase, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaciclina (inibem a agregação plaquetária e possibilitam a dilatação sanguínea). O maxadilan (substância vasodilatadora), presente na saliva de *Lu. longipalpis* é considerado um forte vasodilatador, também foi descrito na mesma espécie um anticoagulante chamado lufaxin que é um forte inibidor do fator Xa, que desempenha um importante papel na cascata de coagulação transportando à produção de trombina e formando os coágulos de fibrina (COLLIN *et al.*, 2012; LERNER *et al.*, 1991). Tais moléculas tem como finalidade a formação do “poço sanguíneo” para a alimentação dos flebotomíneos (RIBEIRO *et al.*, 1995).

O maxadilan possui além do papel vasodilatador, atividade imunomoduladora que induz a produção de citocinas do perfil Th2, (e.g. IL-10 e TGF- β) e inibindo a produção de citocinas do perfil Th1 (e.g. IL-12 e TNF- α), além de inibir a produção de NO, favorecendo dessa forma a sobrevivência do parasito no hospedeiro (BRODIE *et al.*, 2007).

Além de apresentar propriedades anti-hemostáticas, a saliva é também quimiotática para diferentes células do sistema imunológico, atuando na modificação de processos inflamatórios no local da alimentação. Saliva de *Lu. longipalpis*, *P. papatasi* e *P. duboscqi* aumentaram significativamente a quimiotaxia positiva para macrófagos, apressando desta maneira a entrada de parasitos nestas células (ANJILI *et al.*, 1995; ZER *et al.*, 2001).

Proteínas presentes na glândula salivar desses dípteros apresentam atividade farmacológica e muitas delas ainda não possuem sua atividade conhecida. Diversos trabalhos têm evidenciado os componentes salivares de *Lu. longipalpis* e, dentre as atividades temos: a inibição de fatores de coagulação e agregação de plaquetas, ligação às aminas biogênicas, degradação de componentes da matriz extracelular, hidrólise de adenosina (ADO) e adenosina monofosfato (AMP), vasodilatadores e nucleotidasas (KAMHAWI; ASLAN; VALENZUELA, 2014).

O homogeneizado de glândula salivar de fêmeas adultas de *Lu. longipalpis* demonstrou atividade de 5' nucleotidase, que converte AMP liberado durante o processo

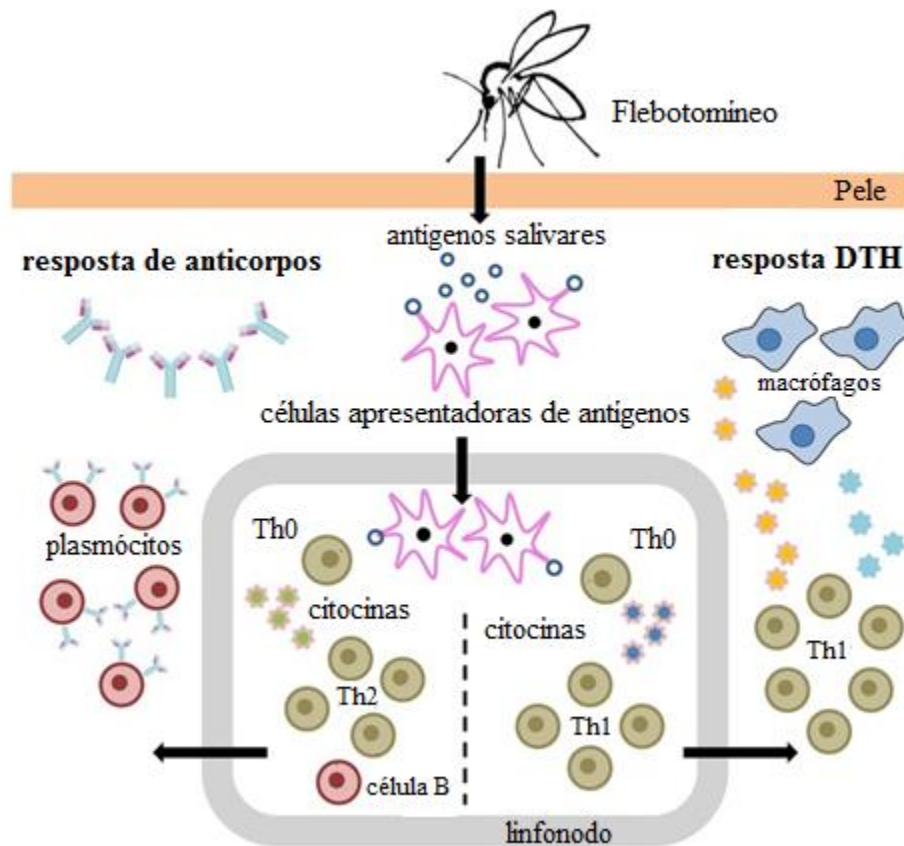
inflamatório em ADO com importante atividade antiplaquetária e vasodilatadora (RIBEIRO; ROWTON; CHARLAB, 2000).

2.7 Efeito da saliva de flebotomíneos na infecção por *Leishmania*

Camundongos repetidamente expostos a homogeneizados de glândulas salivares ou a picadas de flebotomíneos não infectadas foram protegidos contra a infecção por *Leishmania* (KAMHAWI *et al.*, 2000). Muitos componentes dessa saliva são capazes de induzir imunidade específica - celular e humoral (Figura 3).

Pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de entender os mecanismos associados à presença de componentes salivares que favorecem proteção ou contribuem para a exacerbação da doença. Podemos evidenciar, dentre os efeitos imunomodulatórios da saliva sobre o hospedeiro: infiltração de células inflamatórias e do perfil de citocinas no local da picada, produção de anticorpos, efeitos sobre células apresentadoras de antígenos (APCs), inibição do sistema complemento, modulação na produção de eicosanóides, diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através dos neutrófilos e indução de apoptose dessas células (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2014; CARREGARO *et al.*, 2015; MENDES-SOUZA *et al.*, 2013; PRATES *et al.*, 2011; VLKOVA *et al.*, 2011; WHEAT *et al.*, 2008).

Figura 3. Modelo hipotético representando a resposta imune em hospedeiros expostos a picadas de flebotomíneos.



Fonte: Adaptado de Andrade e Teixeira (2012) e Gomes e Oliveira (2012).

Os elementos salivares induzem o processo inflamatório no hospedeiro, pois promovem o recrutamento de células inflamatórias até o local da picada (SILVA *et al.*, 2005). A saliva desses insetos tanto isoladas quanto em combinação com parasitas de *Leishmania* foi caracterizada como um estímulo para o aglomerado de neutrófilos no local de inoculação em modelos murinos e em hamster (MONTEIRO *et al.*, 2007; PETERS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2014). O sonicato de glândula salivar (SGS) de *Lu. longipalpis*, por exemplo, aumenta a morte de neutrófilos e aumenta a sobrevivência de *Leishmania* no interior das células (PRATES *et al.*, 2011). Simultaneamente, os neutrófilos incubados com *L. (L.) infantum* e SGS produziram quantidades significativamente maiores de MCP-1 (CCL2), uma quimiocina que atrai macrófagos para a eliminação desses neutrófilos infectados (LESTINOVA *et al.*, 2017; RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

Moura *et al.* (2007), demonstraram que a pré-exposição de camundongos (BALB/c) à saliva de *Ny. intermedia* foi capaz de induzir resposta inflamatória nesses animais. No

entanto, tal resposta não foi suficiente para assegurar proteção contra a doença, quando o parasita foi inoculado junto com a saliva do vetor. Os camundongos tiveram lesões persistentes e maiores em relação ao grupo controle, além de apresentarem níveis menores de IFN- γ comparado à IL-4.

A inoculação de *L. (L.) major*, associada com o lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* pode favorecer o estabelecimento da *Leishmania*. Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, quando submetidos a tal associação resultou em reação inflamatória caracterizada por infiltrado leucocitário formado por neutrófilos, eosinófilos e células T CD45+. Houve também um aumento nos níveis de IL-10 em relação à IFN- γ , sugerindo que o lisado de glândula salivar induz uma resposta do tipo Th2 (MONTEIRO *et al.*, 2007). Além disso, a saliva desta espécie também facilita a transmissão de *L. (L.) amazonensis* pela indução da produção de IL-10 e IL-4 e diminuição de NO em camundongos da linhagem BALB/c (NORSWORTHY *et al.*, 2004).

Apesar de possuir atividade imunomodulatória, uma parte dos componentes da saliva são proteínas e possuem potencial imunogênico. Populações residentes em áreas endêmicas são frequentemente expostas à picada de flebotomíneos (infectados ou não). Essa população pode apresentar manifestações leves e crônicas da doença, à medida que visitantes, não sendo anteriormente expostos, possuem um risco maior de desenvolver a doença grave. Deste modo, a exposição frequente a picadas de flebotomíneos leva à produção de anticorpos que neutralizam as proteínas salivares e adicionalmente ativam mecanismos celulares que podem ter efeito adverso no estabelecimento da infecção (ANDRADE; TEIXEIRA, 2012; GOMES; OLIVEIRA, 2012).

A imunização do hospedeiro com moléculas salivares individuais pode ter diversos efeitos sobre a infecção por *Leishmania*, ao contrário da saliva total (LESTINOVA *et al.*, 2017). Embora a imunização de camundongos com SGH de *P. papatasi* protegesse camundongos da infecção por *L. (L.) major* (BELKAID *et al.*, 1998), a imunização com a proteína salivar PpSP44 dessa espécie aumentou a infecção causada pelo mesmo parasita. O resultado protetor da infecção causada pela exposição à SGH e o resultado contrastante causado pela PpSP44 foram associados com uma resposta imune Th1 e Th2 anti-*Leishmania*, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). No modelo murino BALB/c usando saliva de *Ny. intermedia* e *L. (V.) braziliensis*, o plasmídeo que codifica para uma proteína Linb-11 foi demonstrado como um potente indutor de uma resposta imune celular conferindo assim

proteção contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*, ao contrário do efeito exacerbador da saliva total (MOURA *et al.*, 2007).

A resposta imunológica dirigida contra a saliva do inseto contribui na construção de uma resposta anti-*Leishmania*. Indivíduos residentes em locais endêmicos para leishmaniose apresentam anticorpos contra antígenos salivares e a presença desses anticorpos apresenta uma relação positiva com uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio contra antígenos do parasito (AQUINO *et al.*, 2010; BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002; MARZOUKI *et al.*, 2011).

Os efeitos protetores de determinados componentes salivares podem ser modificados na presença do parasita. Camundongos BALB/c pré-imunizados e submetidos com o SGH de *Ny. intermedia*, apresentaram alta expressão de IFN- γ , ao mesmo tempo que a expressão desses genes em animais desafiados expostos a SGH em associação com *L. (V.) braziliensis*, não foi observada. Isso sugere que, o parasito também é capaz de modular o ambiente para seu estabelecimento. Presença de genes indutores de IFN- γ também foi analisada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de humanos não infectados de uma área endêmica para *L. (V.) braziliensis* e que poderiam estar expostos à picada de *Ny. intermedia*. A expressão desses genes também foi regulada positivamente pelo SGH dessa espécie de flebotomíneo nas CMSP desses indivíduos (WEINKOPFF *et al.*, 2014).

A exposição prévia a saliva é capaz de induzir resposta imune protetora no indivíduo através da produção de anticorpos e do desenvolvimento do perfil de imunidade celular do tipo Th1, podendo impedir a instalação da infecção pelo parasito.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre os efeitos da saliva de flebotomíneos na infecção por *Leishmania* spp. indicam que as proteínas salivares do vetor têm capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro. Por exemplo, um estudo recente mostrou que homogeneizados de glândulas salivares de *Bi. flaviscutellata* e *Ps. complexus* tiveram um efeito inibitório na infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em BALB/c (FRANCESQUINI *et al.*, 2014). O conhecimento sobre o efeito da saliva de flebotomíneos no curso da infecção por diferentes espécies de *Leishmania* poderá ajudar no desenvolvimento de ferramentas para avaliar a exposição a picadas de flebotomíneos em áreas endêmicas e até mesmo no desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos salivares.

Leishmania (V.) braziliensis é o principal agente causador da LTA nas Américas e diferentes espécies de flebotomíneos têm sido implicadas na transmissão desse importante parasita, incluindo *Mg. migonei*. A falta de pesquisas científicas sobre o efeito da saliva de *Mg. migonei* no curso da infecção por *L. (V.) braziliensis* encorajou o desenvolvimento do presente estudo.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o papel da glândula salivar de *Mg. migonei* na infecção por *L. (V.) braziliensis*?

5 HIPOTESE

As proteínas salivares de *Mg. migonei* na infecção por *L. (V.) braziliensis* têm capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro, inibindo o surgimento da lesão cutânea.

6 OBJETIVOS

A seguir são descritos os objetivos geral e específicos do presente trabalho de tese de doutorado.

6.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da saliva de *Mg. migonei* na infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*.

6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o curso da infecção em roedores infectados com *L. (V.) braziliensis* na presença ou ausência de saliva de *Mg. migonei*;
- b) Analisar a resposta imune de roedores infectados por *L. (V.) braziliensis* na presença ou ausência de saliva de *Mg. migonei*;
- c) Avaliar a carga parasitária de *L. (V.) braziliensis* em roedores infectados através da técnica de PCR convencional.

7 METODOLOGIA

Nessa seção são descritos os processos metodológicos realizados no presente estudo.

7.1 Aspectos éticos

Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, número: 114/2017) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Pernambuco, Brasil (ANEXO B). O protocolo para o uso dos animais foi elaborado para minimizar a dor ou desconforto aos camundongos, os quais foram mantidos em ambientes com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$). Além disso, os animais ficaram no ambiente em condições de renovação contínua de ar. Os camundongos foram alojados em um ciclo de 12h luz/12h escuro e com livre acesso a comida (Nuvilab, Curitiba, Paraná, Brasil) e água.

7.2 *Leishmania (V.) braziliensis*

Uma cepa de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) previamente isolada de um paciente na Serra dos Carajás, estado do Pará, norte do Brasil, foi utilizada neste estudo. Os parasitas foram cultivados em meio Schneider (pH 7,4), contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (10 U/ml de penicilina) e 10 µg/ml de estreptomicina (meio Schneider completo), mantidos a 26 °C. As formas promastigotas foram passadas *in vitro* semanalmente. No sexto dia de cultura, promastigotas em fase estacionária (1×10^6 células do parasita/ml) foram obtidas, centrifugadas ($1.620 \times g$ por 10 min) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4) e, posteriormente, utilizadas para infecção dos camundongos.

7.3 Preparação de antígeno solúvel

As formas promastigotas foram mantidas conforme descrito no item 7.2 e alíquotas contendo 10^9 células/ml foram submetidas a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2). Extratos de antígeno solúvel de *Leishmania* (LSA) foram preparados utilizando um protocolo descrito por Chamakh-Ayari *et al.* (2014) e usado em cultura de células. Culturas de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram lavadas em $1 \times$ PBS, centrifugadas a $800 \times g$ por

15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram removidos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1mL de tampão de lise (Tris 50 mM, EDTA 5 mM) 1×10^9 parasitas/ml contendo inibidor de protease metil-fenil-fluoreto (Cytiva, USA). A solução do parasita foi submetida a três ciclos rápidos de congelamento-descongelamento seguidos por seis pulsos 40W/20 segundos em um sonicador. As frações antigênicas solúvel (AgST) foram separadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados. O sobrenadante correspondente ao AgST de *L. (V.) braziliensis* foi submetido a dosagem protéica utilizando o Kit comercial 2G Quant kit (Cytiva, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para verificar a integridade do LSA, uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970) nas concentrações de 20 µg/ml e 40 µg/ml, as quais foram coradas com azul de Coomassie blue. Após esses procedimentos, as frações do antígeno foram armazenadas a – 20 °C até o uso em ensaios de cultura de células (Brito *et al.*, 2000).

7.4 Produção do homogeneizado de glândulas salivares

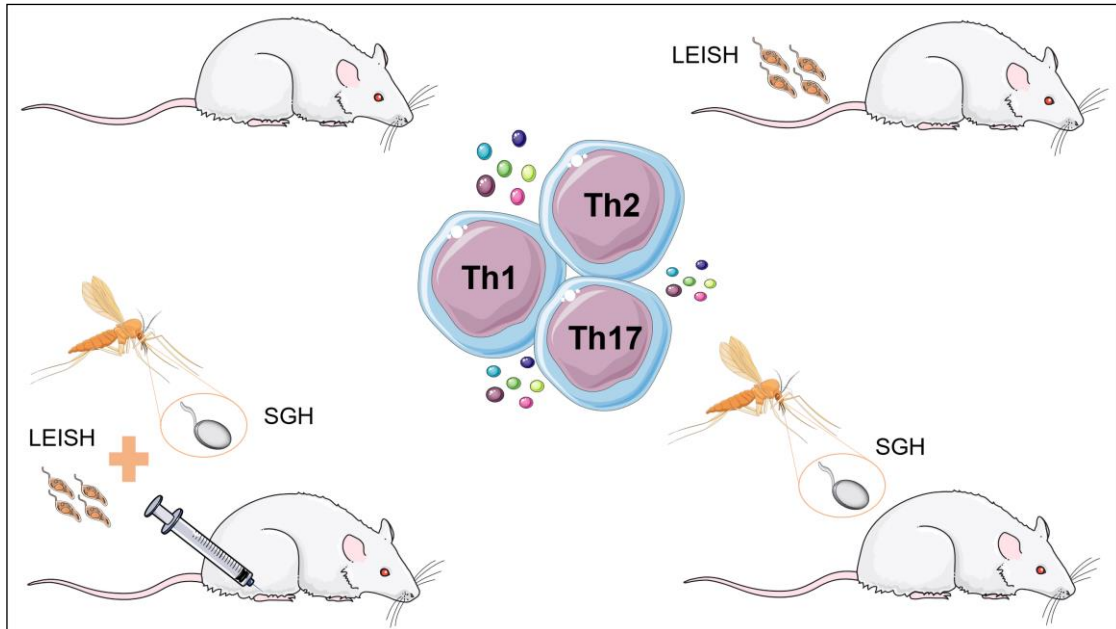
O homogeneizado de glândulas salivares (SGH) foi obtido a partir de fêmeas de *Mg. migonei* de uma colônia mantida na Charles University, Praga, República Tcheca. A colônia foi estabelecida a partir de espécimes capturadas no município de Baturité, estado do Ceará, nordeste do Brasil, e mantida em condições padrão conforme descrito por Volf e Volfova (2011). As glândulas salivares foram dissecadas em tampão Tris (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) e liofilizadas para envio ao Brasil em temperatura ambiente. Uma hora antes do uso, a preparação foi reconstituída em água destilada na proporção de uma glândula salivar por 1 µl de água destilada. O equivalente a uma única glândula salivar foi utilizado para cada ponto de inoculação nos camundongos.

7.5 Inoculação de camundongos BALB/c com *L. (V.) braziliensis*, SGH ou ambos

Vinte e quatro camundongos BALB/c com 8 semanas de idade foram separados em quatro grupos (Figura 4), como se segue: Grupo controle (CTRL) (seis camundongos não infectados inoculados com PBS); Grupo SGH (seis camundongos, cada um inoculado com o equivalente a uma única glândula salivar de *Mg. migonei*); grupo SGH+LEISH (seis camundongos, cada um inoculado por via subcutânea na pata traseira com 10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* em 50 µl de PBS mais o equivalente a uma única glândula salivar de *Mg. migonei*; grupo LEISH (seis camundongos, cada um

inoculado com 10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* em 50 μ l de PBS).

Figura 4. Inoculação de *L. (V.) braziliensis*, SGH ou ambos em camundongos BALB/c.



Fonte: A autora.

7.6 Avaliação macroscópica da infecção

A pata traseira dos BALB/c infectados foi monitorada durante 8 semanas através da medição da espessura da pata submetida à inoculação com auxílio de um paquímetro (Figura 5). A espessura da pata inoculada foi comparada com a espessura da pata não submetida à inoculação (FRANCESQUINI *et al.*, 2014). A presença e a espessura de quaisquer lesões cutâneas também foram registradas. Os camundongos foram eutanasiados no final do período de observação.

Figura 5. Medição da espessura da pata com auxílio de um paquímetro.



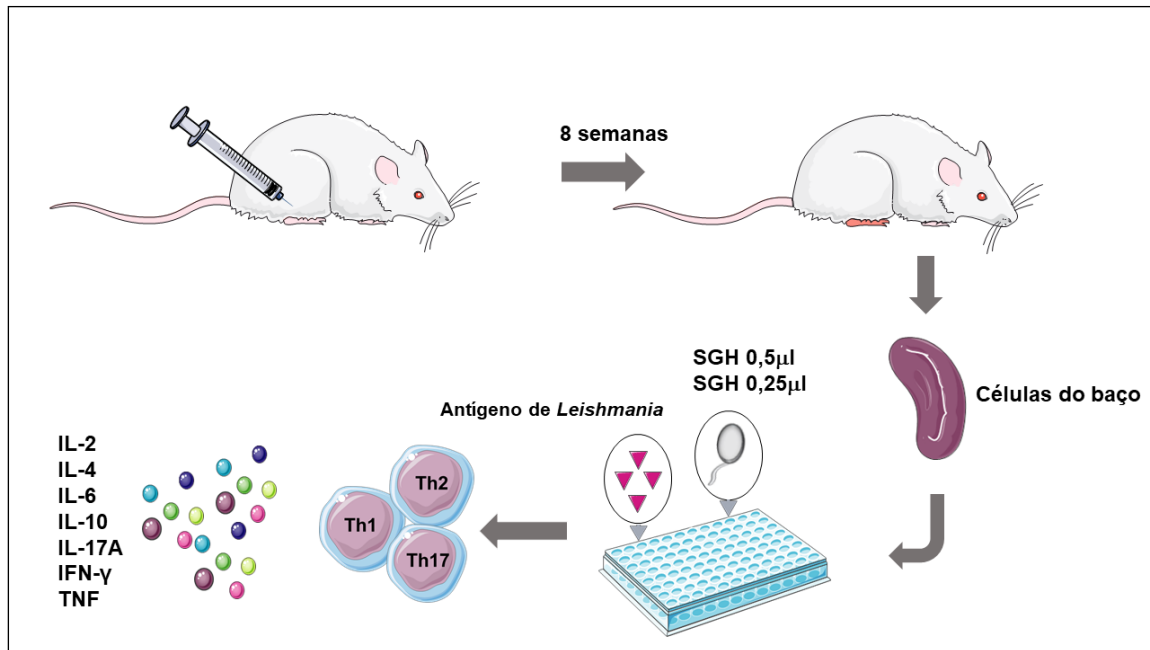
Fonte: A autora.

7.7 Cultura de células para dosagem de citocinas

Oito semanas após a inoculação (PI), o baço de cada camundongo foi removido assepticamente após a eutanásia e utilizado para dosagem de citocinas (Figura 6). Em seguida, suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA). Os baços foram macerados com êmbolo de seringa em tela de malha fina (Falcon®, filtro celular 40 μm). A suspensão celular obtida foi depositada em tubos falcon de 50 ml. Após centrifugação a $200 \times g$ durante 5 min a 4 °C, as hemácias foram lisadas adicionando água estéril ao precipitado durante 20 segundos (1 ml/baço). As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de SBF (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em gelo por 5 min para a deposição dos grumos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, centrifugado novamente a $200 \times g$ por 5 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspensão em meio RPMI suplementado. A contagem de células e o teste de viabilidade foram realizados com azul tripan em câmara de Neubauer (Tennant, 1964). As células ressuspensas foram cultivadas a uma concentração de 10^6 células viáveis/poço em placas de 48 poços (Costar Cambridge, MA, EUA). As células foram então estimuladas com concanavalina (ConA) (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA) (2,5 $\mu\text{g/ml}$), SGH 0,5 (0,5 μl - o equivalente a 1/2 da glândula salivar), SGH 0,25 (0,25 μl - o equivalente a 1/4 de glândula salivar) ou LSA (20 $\mu\text{g/ml}$). Uma cultura sem estímulo foi usada como controle. As placas foram incubadas a 37 °C em uma incubadora de 5% de CO_2 e, após 3 e 5 dias, os

sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise da produção de citocinas. Coletamos cultura de células após 3 e 5 dias para verificar se havia alguma diferença na produção de citocinas ao longo do tempo.

Figura 6. Desenho experimental para medição de citocinas utilizando o baço de BALB/c.



Fonte: A autora.

7.8 Extração de DNA

A extração de DNA genômico do tecido da orelha de camundongos foi realizada com o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram eluídas em $100\text{ }\mu\text{l}$ e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A quantidade e pureza do DNA extraído foram avaliadas usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, EUA).

7.9 Diagnóstico Molecular

As amostras de DNA relatadas no item anterior foram testadas por PCR convencional usando os iniciadores B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), que tem como alvo uma região de 750 pares de bases do minicírculo cinetoplasto de *Leishmania* spp. pertencente ao subgênero *Viannia* (de Bruijn e Barker, 1992). As reações de PCR continham $14\text{ }\mu\text{l}$ de água tipo I, $2,5\text{ }\mu\text{l}$ de dNTP (2 mM), $0,5\text{ }\mu\text{l}$ de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (5 U/ μl), $1,5\text{ }\mu\text{l}$ de MgCl_2 (50 mM), $2,5\text{ }\mu\text{l}$ de $10\times$ PCR buffer, $2,5\text{ }\mu\text{l}$ de cada iniciador (100 pmol/ μl) (Invitrogen) e $2\text{ }\mu\text{l}$ do

DNA da amostra. As condições de amplificação consistiram em 35 ciclos (94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min e 72 °C por 1 min), precedidos por uma etapa inicial de desnaturação de 5 min a 94 °C (Rodrigues *et al.*, 2002) um controle positivo (DNA extraído de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*) e um controle negativo (DNA extraído de flebotomíneos machos) foram incluídos em cada corrida de PCR. Os produtos foram analisados em géis de agarose 1,5%, sendo corados com brometo de etídio (10 µg/ml) e visualizados em transiluminador de UV, utilizando escala de DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, EUA) como marcador de peso molecular.

7.10 Detecção dos níveis de citocinas Th1/Th2/Th17 em sobrenadante de cultura através da técnica de *Cytometric Beads Array* (CBA)

O kit de citocinas BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences) foi usado para medir as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos em 24 horas utilizando o BD FACSCalibur™ (BD Biosciences), considerando o mínimo de 2.100 leituras. A aquisição foi realizada no software CellQuestPro e as análises no software FCAP Array (BD Biosciences) versão 3.0. Os resultados foram expressos como índice de taxa de cultura estimulada/culturas não estimuladas.

7.11 Análise estatística

Os dados quantitativos foram testados para normalidade usando o teste D'Agostino. Kruskal-Wallis (seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn) foi usado para analisar dados não paramétricos, enquanto o teste *t* ou ANOVA foram usados para dados paramétricos (teste de comparação múltipla de Tukey). A correlação entre as citocinas foi realizada usando o teste do coeficiente de correlação de Spearman (*rs*) para dados não distribuídos normalmente e o teste do coeficiente de correlação de Pearson (*r*) para dados distribuídos normalmente. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (representados por um asterisco).

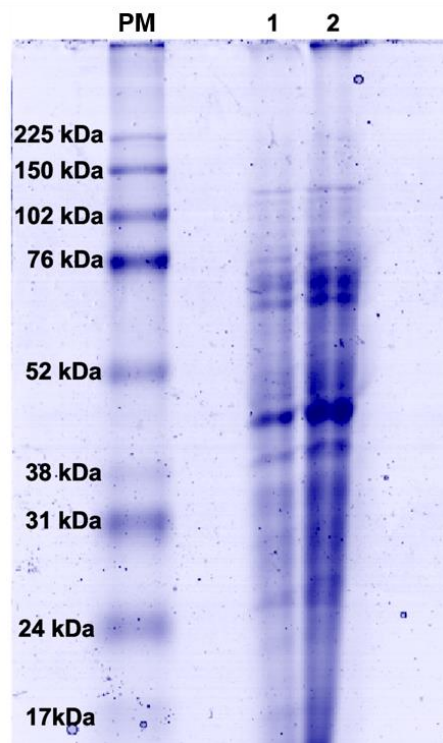
8 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados do presente estudo.

8.1 Perfil eletroforético de antígenos solúveis de *Leishmania* (LSA)

Os antígenos solúveis de *Leishmania* foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentaram proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 225kDa e 17 kDa (Figura 7) quando comparadas ao peso molecular padrão. O perfil encontrado de proteínas foi entre os pesos moleculares de 76kDa ao 24kDa. O antígeno apresentou perfil condizente com antígenos brutos de *L. (V.) braziliensis* e o mesmo não apresentou sinais de degradação, estando de acordo com o que consta na literatura. Desta maneira, os antígenos mostraram-se aptos para serem usados nas etapas imunológicas.

Figura 7. Gel de eletroforese SDS-PAGE.



Fonte: A autora.

Legenda: Padrão de bandeamento da fração protéica solúvel purificada de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (AgST) em concentrações de 20 μ (1) e 40 μ (2).

8.2 Avaliação macroscópica da infecção

A avaliação macroscópica revelou a presença de lesões leves em alguns camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*, isoladamente (grupo LEISH) ou em combinação com SGH de *Mg. migonei* (grupo SGH+LEISH). Esses animais apresentavam caquexia, lesões leves não ulcerativas (Figura 8) e lesões na cauda (Figura 9).

Figura 8. Camundongo com caquexia e lesões leves não ulcerativas.



Fonte: A autora.

Figura 9. Lesões na cauda do camundongo.

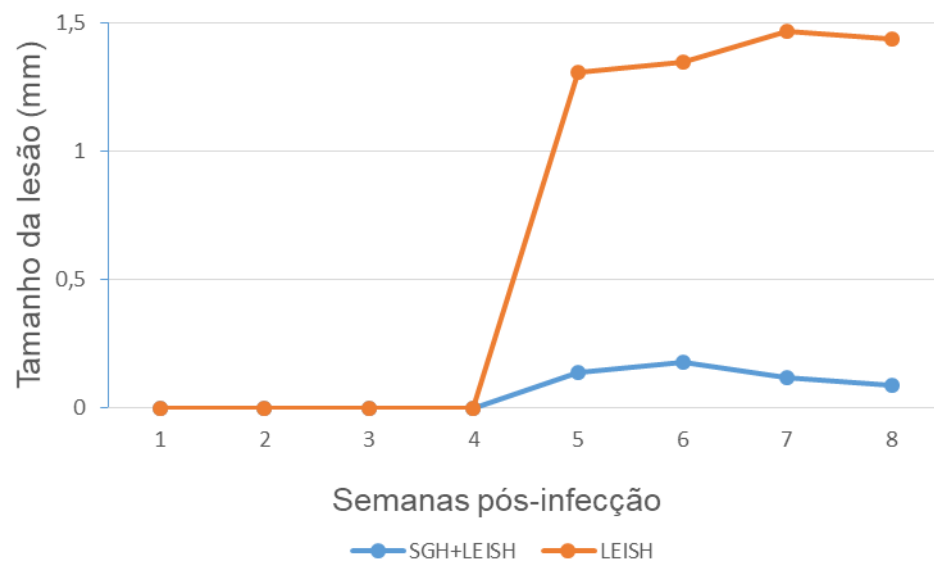


Fonte: A autora.

Os camundongos do grupo LEISH apresentaram lesões leves não ulcerativas a partir da quinta semana PI. As lesões atingiram tamanhos variáveis, aumentando progressivamente até a oitava semana PI (Gráfico 1). Em particular, três camundongos do grupo LEISH apresentaram lesões leves não ulcerativas na cauda a partir da quinta semana PI. As lesões atingiram tamanhos variáveis, aumentando progressivamente até a oitava semana PI. Dois

destes camundongos apresentaram um aumento pequeno na espessura da pata inoculada (isto é, 0,04-0,05 μm) da sexta a oitava semana PI em comparação com a espessura da pata não inoculada. Da mesma forma, dois camundongos do grupo SGH+LEISH também apresentaram lesões leves não ulceradas na cauda a partir da quinta semana PI e um adicional a partir da sexta semana PI. No entanto, essas lesões diminuíram progressivamente até a oitava semana PI. Um camundongo deste grupo mostrou um aumento muito menor na espessura (isto é, 0,03 μm) de sua pata inoculada da terceira a oitava semana PI, enquanto outro camundongo mostrou o mesmo aumento apenas na quarta semana PI. Além disso, eles apresentaram alopecia na quinta semana PI e foram menos ativos em comparação com os camundongos CTRL.

Gráfico 1. Tamanho das lesões nos grupos SGH+LEISH e LEISH.



Fonte: A autora.

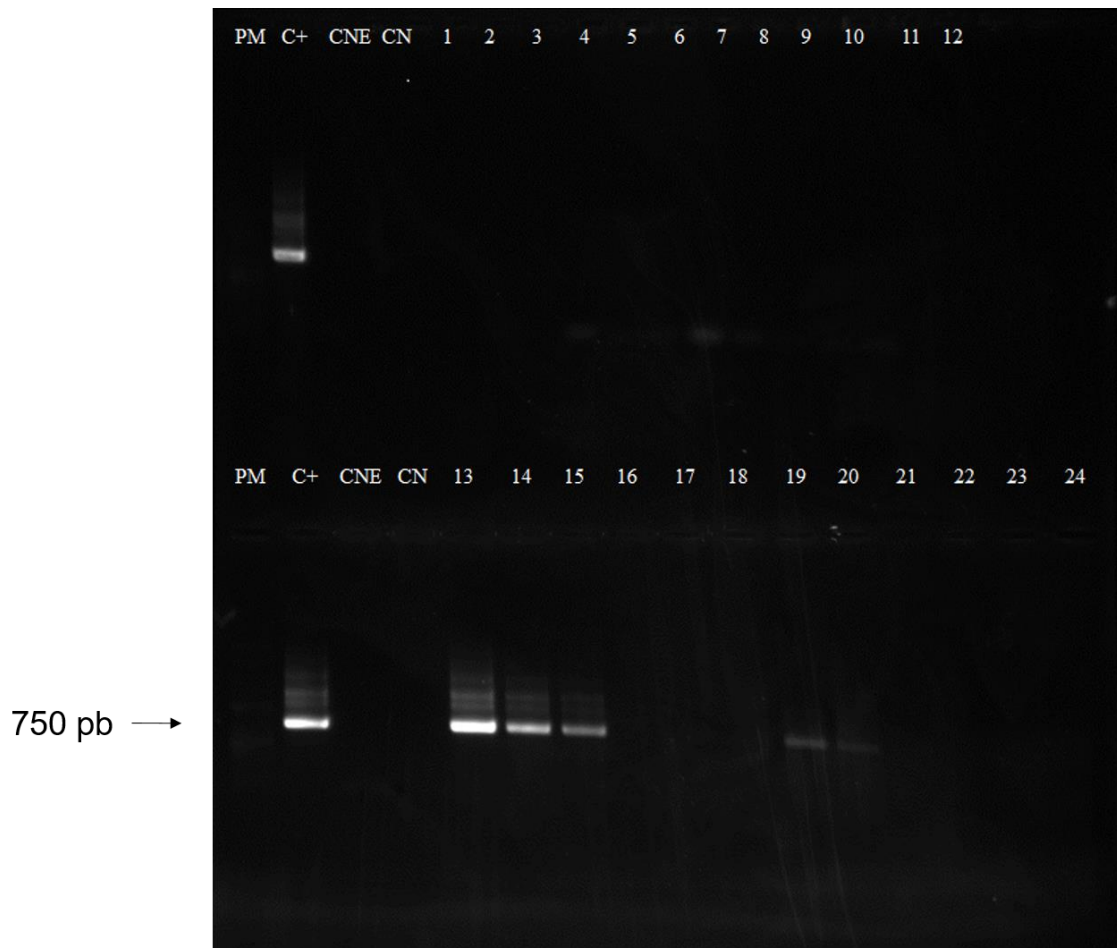
Não houve diferenças significativas no desenvolvimento da lesão ou no tamanho da espessura da pata entre os grupos LEISH e SGH+LEISH. No entanto, considerando os camundongos com lesões na cauda (ou seja, três em cada grupo), encontramos diferenças estatisticamente significativas no tamanho médio da lesão (Gráfico 1) na sexta semana PI (teste t , $t_{(4)} = 3,148$, $P = 0,0346$), sétima semana PI (teste t , $t_{(4)} = 8,097$, $P = 0,0013$) e oitava semana PI (teste t , $t_{(4)} = 8,447$, $P = 0,0011$). Os camundongos do grupo SGH apresentaram a

pata inchada na terceira semana PI. Nenhuma lesão local foi observada nesses animais, assim como nos camundongos do grupo controle.

8.3 Detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis* em camundongos infectados

Todos os 24 camundongos (BALB/c) pertencentes aos quatro grupos foram analisados com relação a detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis*. Três (50%) dos camundongos do grupo SGH+LEISH e três (50%) do grupo LEISH foram positivos na PCR, enquanto todos os camundongos nos grupos SGH e CTRL foram negativos (Figura 10).

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose.



Fonte: A autora.

Legenda: PM (peso molecular); C+ (controle positivo); CNE (controle de extração); CN (controle negativo); 1 a 6 (grupo CTRL); 7 a 12 (grupo SGH); 13 a 18 (grupo SGH+LEISH); 19 a 24 (grupo LEISH).

8.4 Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5, SGH 0,25 e LSA após 3 dias

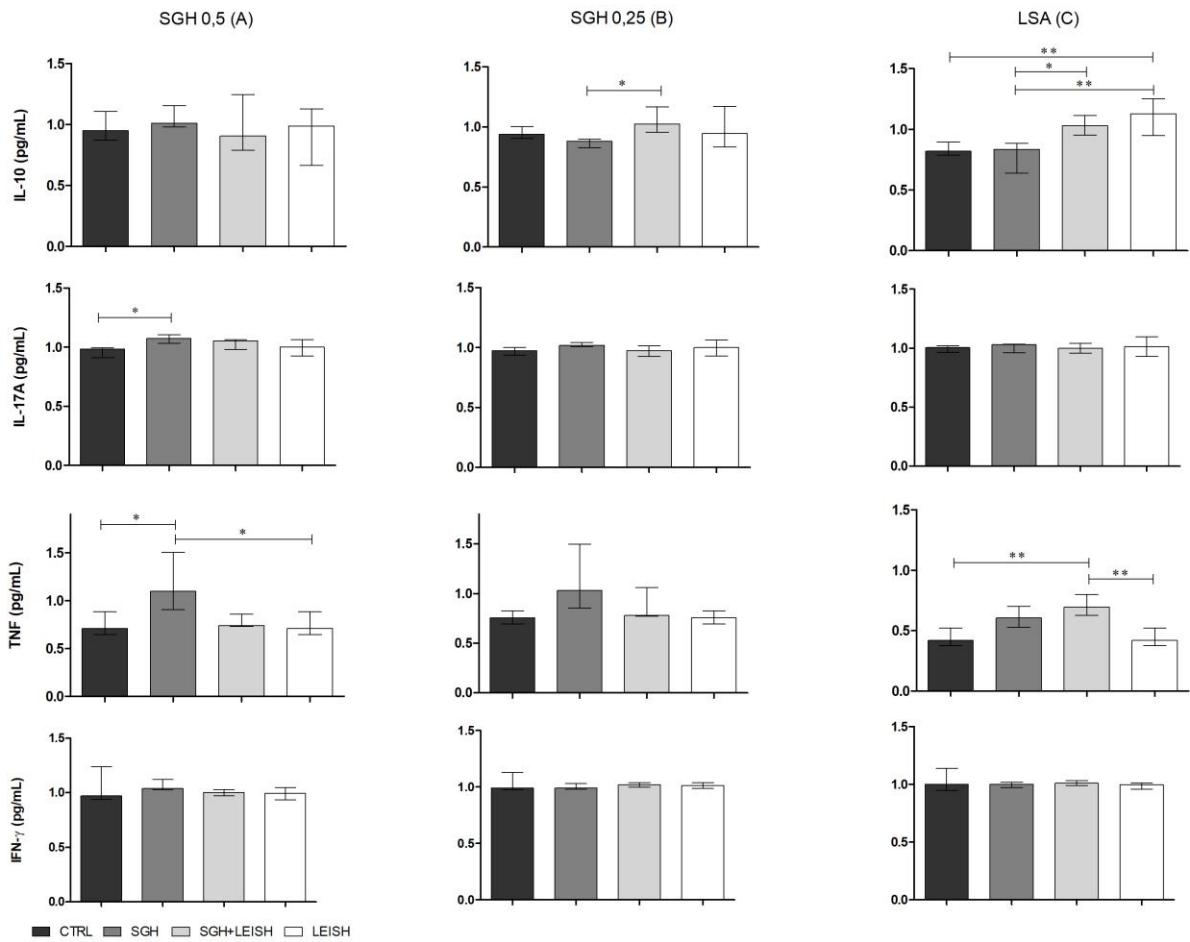
O LSA apresentou proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 17 kDa e 225 kDa. O antígeno apresentou perfil eletroforético consistente com antígenos brutos de *L. (V.) braziliensis* e não mostrou sinais de degradação como mencionado no item 8.1.

Em culturas de células esplênicas estimuladas com SGH 0,5 (Figura 11A), os níveis de IL-17A foram ligeiramente menores no grupo CTRL em comparação com os demais grupos, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos SGH e CTRL (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,023$). A produção de TNF foi maior no grupo SGH quando comparado com os grupos CTRL e LEISH (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,018$). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas em relação à produção de IL-10, IFN- γ (Figura 11A), IL-4, IL-6 e IL-2 (Figura 12).

Culturas de células esplênicas estimuladas com SGH 0,25 (Figura 11B) mostraram níveis significativamente baixos de IL-10 no grupo SGH em comparação com o grupo SGH+LEISH (teste de Dunn, $df = 5$, $P = 0,042$). A produção de TNF foi maior no grupo SGH em comparação com os grupos CTRL e LEISH, embora não tenha diferença estatisticamente significativa. Diferenças estatísticas entre outras citocinas e grupos não foram significativas.

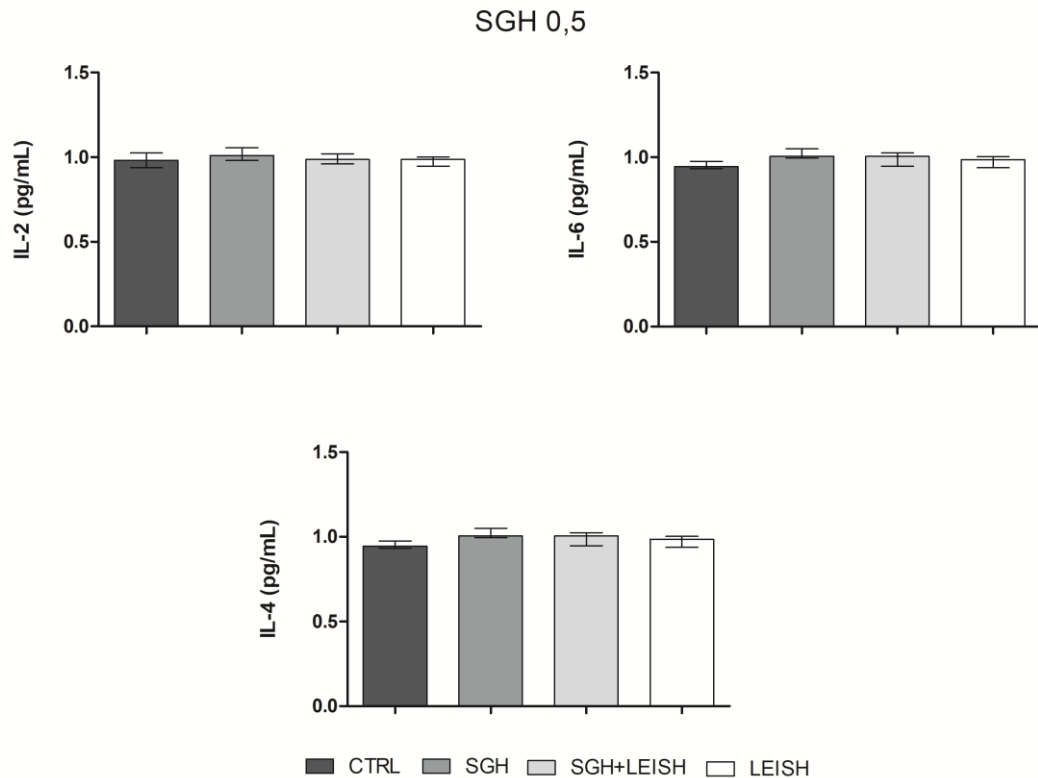
Quanto às culturas de células esplênicas estimuladas por LSA, o grupo LEISH produziu níveis mais elevados de IL-10 em comparação com os grupos CTRL e SGH (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,001$) (Figura 11C). Além disso, o grupo SGH+LEISH produziu níveis mais elevados de IL-10 quando comparado ao grupo SGH (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,001$). Finalmente, os níveis de TNF foram significativamente maiores no grupo SGH+LEISH quando comparados aos grupos CTRL e LEISH (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,001$).

Figura 11. Avaliação dos níveis de citocinas detectados no sobrenadante de cultura após 3 dias entre os grupos experimentais após estímulo *in vitro*.



Legenda: (A) SGH 0,5; (B) SGH 0,25; (C) LSA. As barras horizontais indicam as diferenças estatísticas com o valor de $p < 0,05$; $p < 0,001$ a $0,01$ (**); $p < 0,01$ a $0,05$ (*).

Figura 12. Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SHG 0,5 após 3 dias.

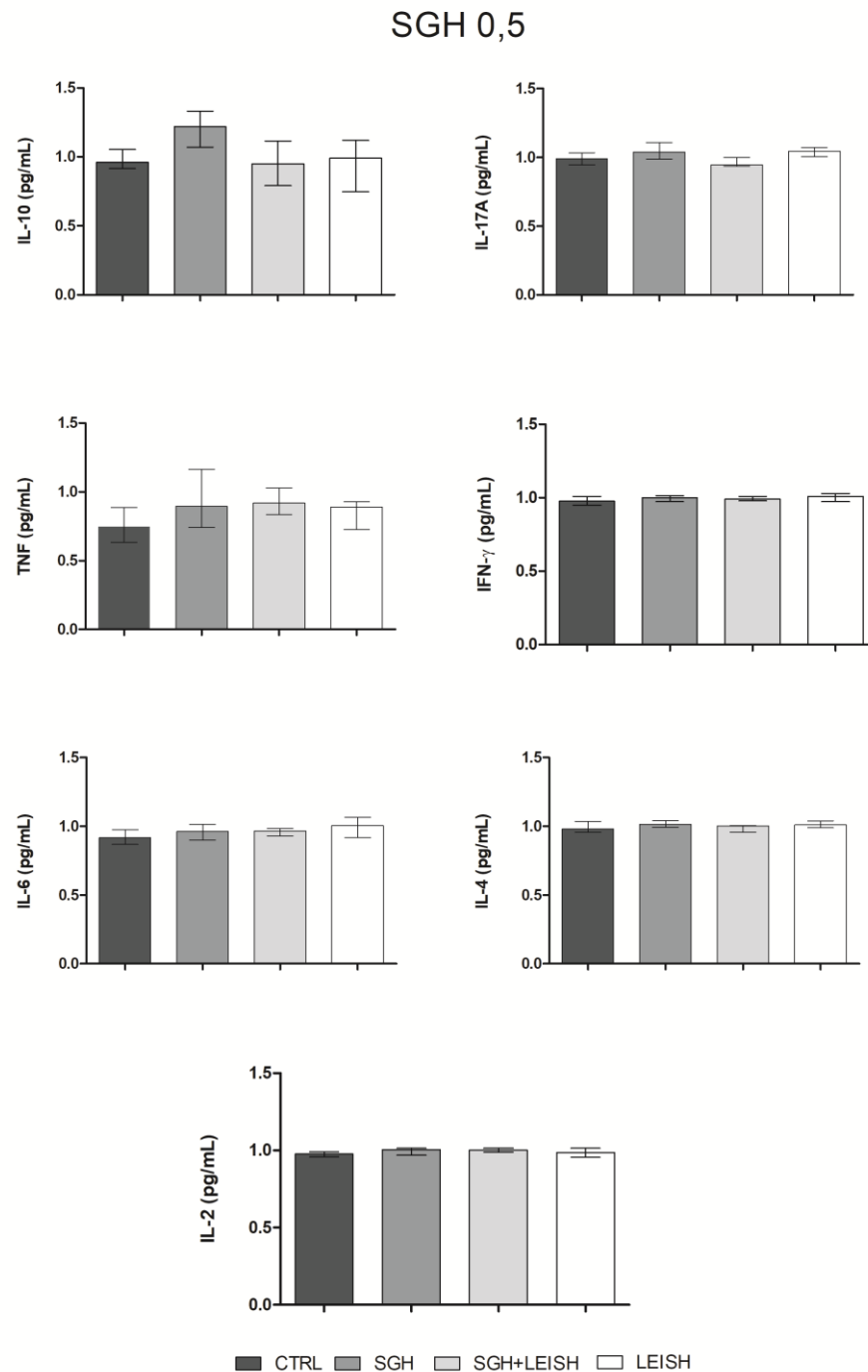


Fonte: A autora.

8.5 Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5, SGH 0,25 e LSA após 5 dias

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à produção de IL-10, TNF, IL-6, IL-17A, IFN- γ , IL-4 e IL-2 quando as células foram estimuladas com SGH 0,5 (Figura 13). Quando estimuladas com SGH 0,25 (Figura 14A), a produção de IL-17A (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,020$) e IFN- γ (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,037$) diminuiu no grupo SGH comparado ao grupo LEISH. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à produção de IL-10, TNF, IL-6, IL-4 e IL-2.

Figura 13. Produção de citocinas por células esplênicas estimuladas com SGH 0,5 após 5 dias.

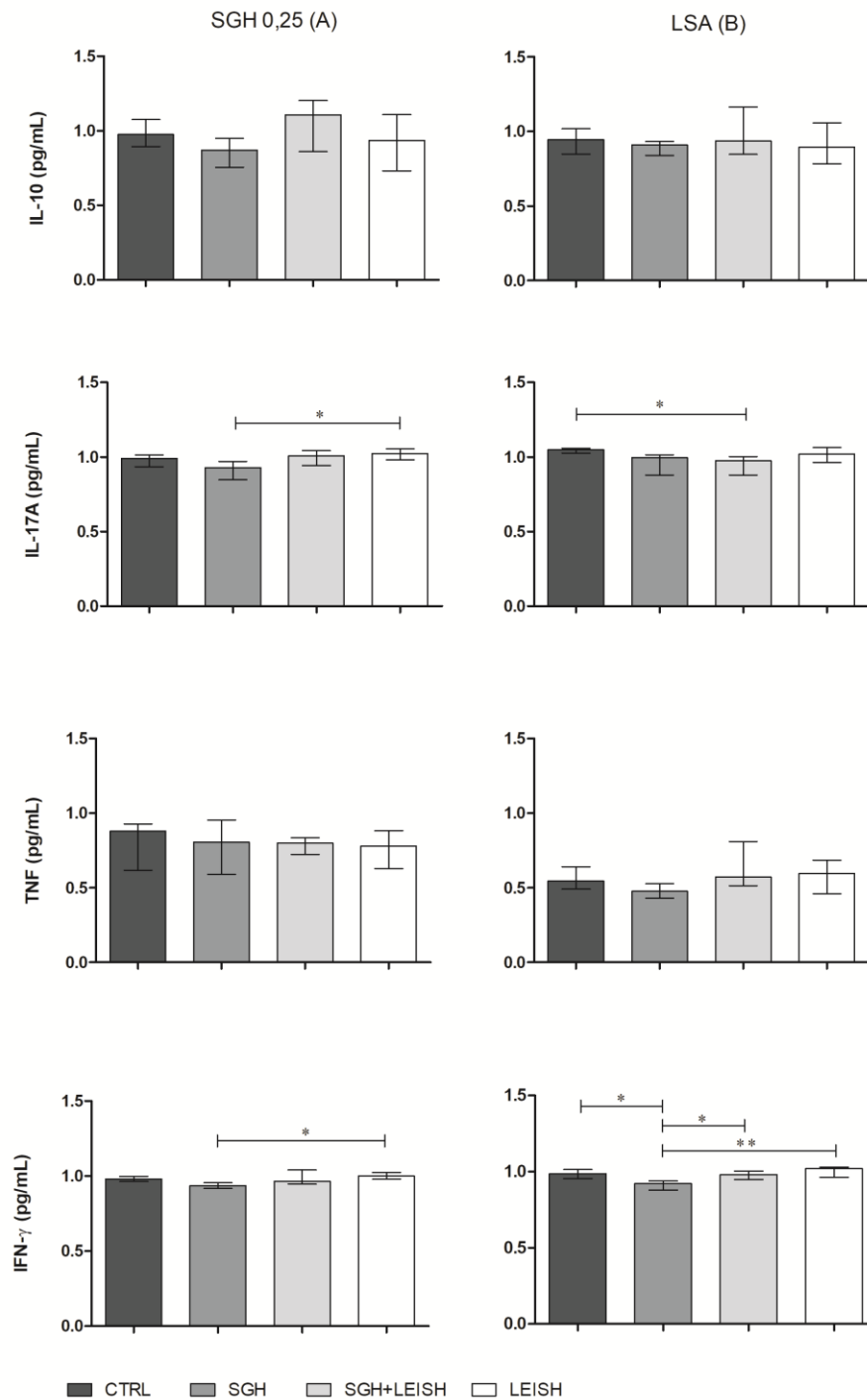


Fonte: A autora.

Quando estimulado com LSA (Figura 14B), níveis mais baixos de IL-17A foram detectados no grupo SGH+LEISH em comparação com o grupo CTRL (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,024$). Em relação ao IFN- γ , os grupos LEISH e SGH+LEISH apresentaram níveis mais elevados em comparação ao grupo SGH (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,004$). Além disso,

o grupo SGH apresentou níveis mais baixos de IFN- γ em comparação com o grupo CTRL (teste de Tukey, $df = 5$, $P = 0,004$).

Figura 14. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura (5 dias) nos grupos estudados após estímulo *in vitro*.



Legenda: (A) Citocinas no sobrenadante da cultura após estimulação com SGH 0,25; (B) Citocinas no sobrenadante da cultura após estímulo com LSA. As barras horizontais indicam as diferenças estatísticas com o valor de $p < 0,05$; $p < 0,001$ a $0,01$ (**); $p < 0,01$ a $0,05$ (*).

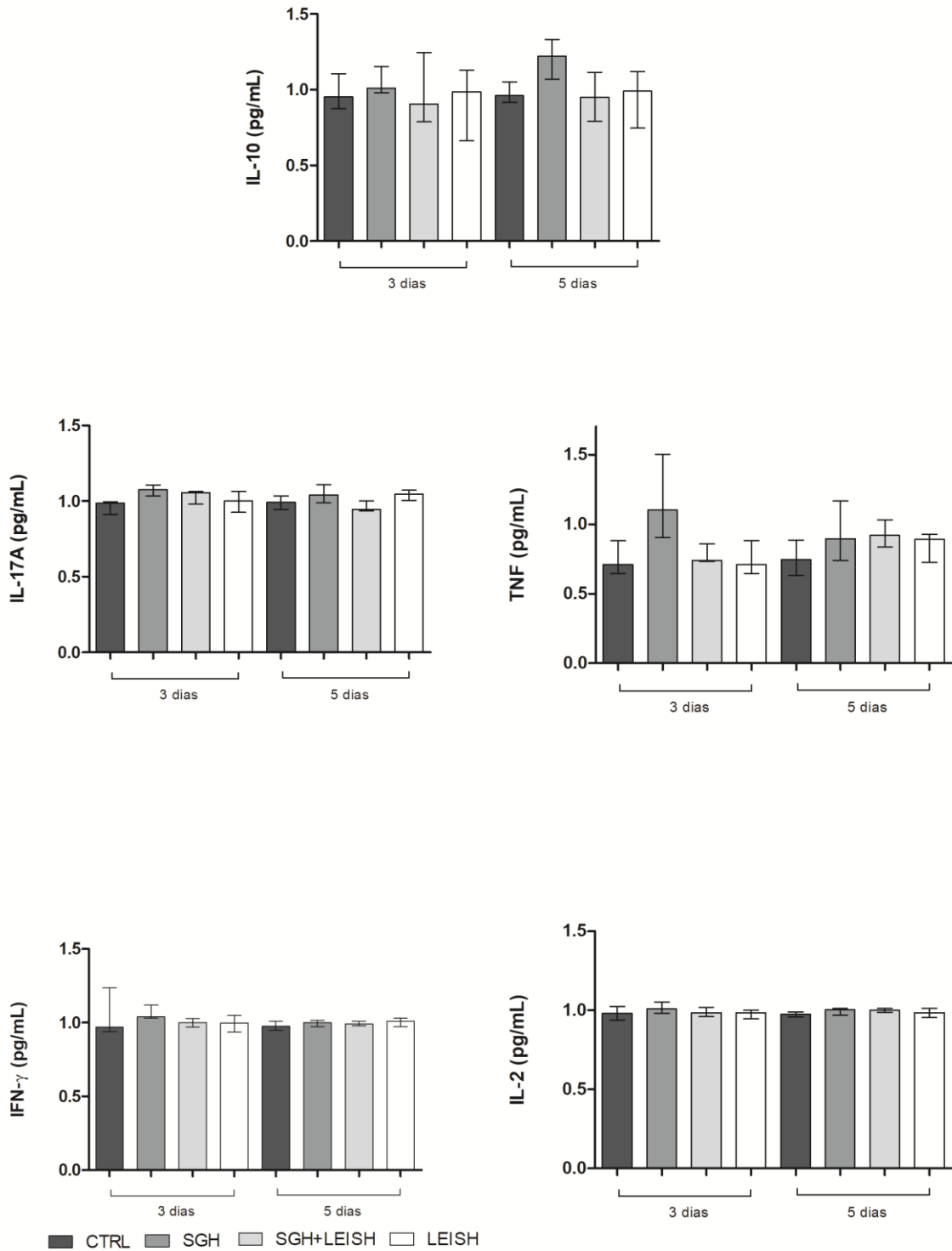
8.6 Produção de citocinas em cultura de células esplênicas ao longo do tempo

Não houve diferenças estatisticamente significativas na produção de IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ e IL-2 após 3 e 5 dias pós-estímulo com SGH 0,5 (Figura 15). Após estímulo com SGH 0,25 (Figura 16A), a produção de IL-17A e TNF não foi sustentada no grupo SGH, com níveis decrescentes após 5 dias em comparação com 3 dias de estímulo *in vitro*. A produção de outras citocinas não foi estatisticamente significativa.

Analisando a produção de citocinas após estímulo com LSA (Figura 16B), observamos níveis mais baixos de IL-17A e IFN- γ no grupo SGH após 5 dias em comparação com 3 dias. Por outro lado, os níveis de TNF foram significativamente maiores após 5 dias comparado a 3 dias no grupo LEISH.

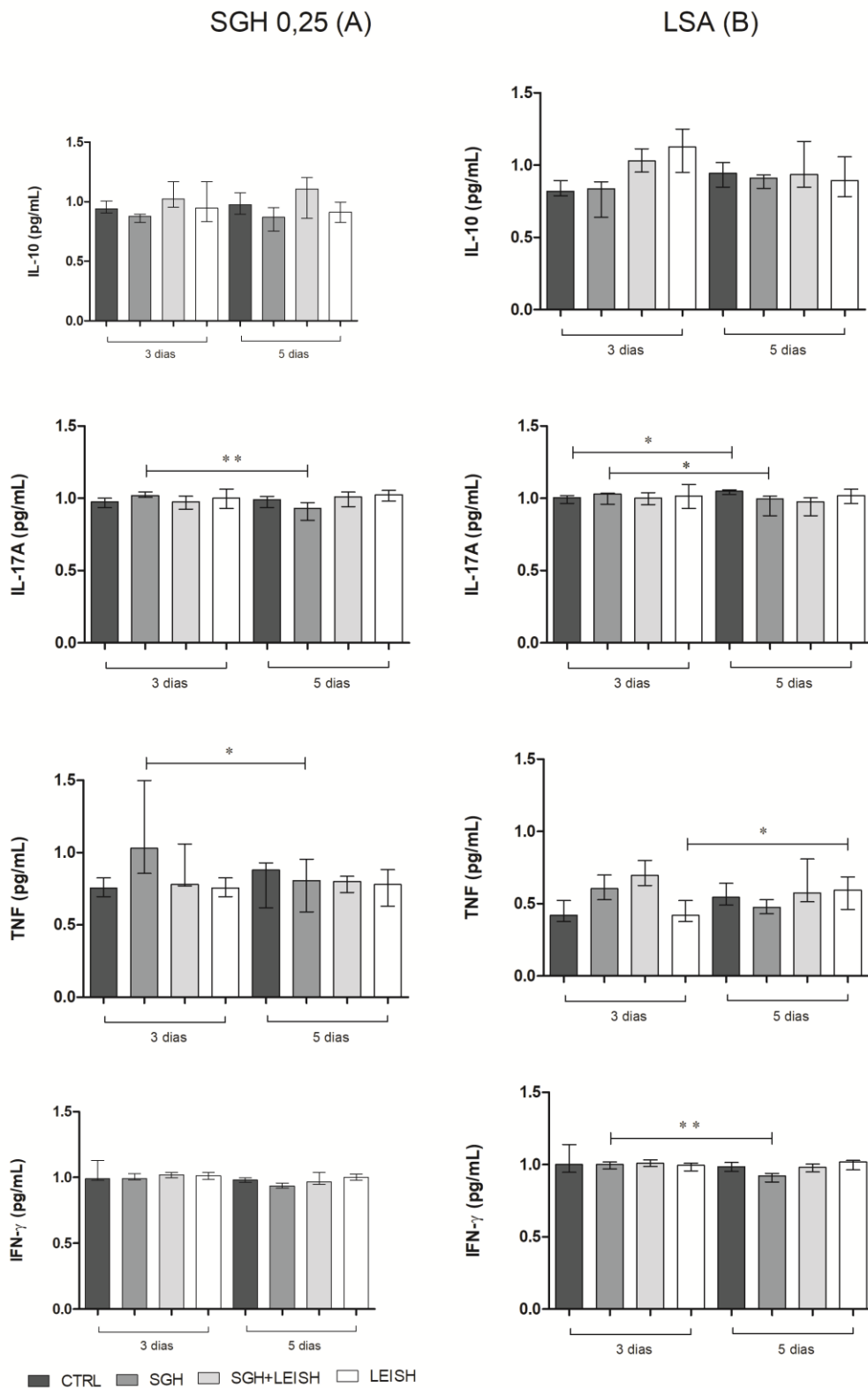
Figura 15. Produção de citocinas em cultura de células esplênicas ao longo do tempo após estímulo com SGH 0,5.

SGH 0,5



Fonte: A autora.

Figura 16. Comparação de citocinas no sobrenadante de cultura (3 dias e 5 dias) após o estímulo.



Legenda: (A) Citocinas no sobrenadante da cultura após estímulo com SGH 0,25; (B) Citocinas no sobrenadante da cultura após estímulo com LSA. As barras horizontais indicam as diferenças estatísticas com o valor de $p < 0,05$; $p < 0,001$ a $0,01$ (**); $p < 0,01$ a $0,05$ (*).

8.7 Correlação entre a produção de IL-10, TNF e IFN- γ após diferentes estímulos

Para avaliar a influência da citocina inibitória IL-10 na ativação de células T em culturas, foi feita a correlação de IL-10 com IFN- γ e TNF. Não houve correlação entre a produção de IL-10, TNF ou IFN- γ 3 dias após a estímulo com SGH 0,5, SGH 0,25 ou LSA (Tabela 1). No entanto, após 5 dias, observamos uma correlação entre IL-10 e TNF no grupo CRTL estimulado com SGH 0,25 ($r_s = 1,00$, $P = 0,002$), bem como no grupo SGH+LEISH após estímulo com SGH 0,25 ($r_{(5)} = 0,89$, $P = 0,016$) ou LSA ($r_{(5)} = 0,90$, $P = 0,013$). Uma correlação entre TNF e IFN- γ também foi encontrada no grupo SGH+LEISH ($r_{(5)} = 0,83$, $P = 0,040$), bem como uma correlação entre IL-10 e IFN- γ no grupo LEISH ($r_{(5)} = 0,85$, $P = 0,029$), após estímulo com SGH 0,25.

Tabela 1 - Correlações entre a produção de citocinas IL-10, TNF e IFN- γ nos diferentes estímulos *in vitro*

Grupos	Coeficiente de correlação ^a					
	3 dias			5 dias		
	IL-10 x TNF	IL-10 x IFN- γ	TNF x IFN- γ	IL-10 x TNF	IL-10 x IFN- γ	TNF x IFN- γ
Grupo CTRL						
SGH 0,5	-0,47	-0,14	-0,25	-0,48	-0,49	0,59
SGH 0,25	0,39	0,61	0,15	1,00** <i>rs</i>	0,17	0,53
LSA	-0,60	0,57	-0,55	0,74	0,37	0,64
Grupo SGH						
SGH 0,5	0,14	0,66	0,47	0,78	0,56	0,53
SGH 0,25	-0,62	-0,48	0,71	0,35	0,25	0,81
LSA	0,57	-0,56	-0,51	0,09	-0,78	0,09
Grupo SGH+LEISH						
SGH 0,5	0,57	0,18	-0,27	0,01	0,43	0,00
SGH 0,25	-0,57	-0,30	-0,56	0,89*	0,65	0,83*
LSA	0,52	-0,40	-0,11	0,90*	0,11	-0,29
Grupo LEISH						
SGH 0,5	0,57	0,22	0,58	0,14	0,47	0,69
SGH 0,25	-0,61	0,13	0,48	-0,03	0,85*	0,00
LSA	-0,03	-0,18	0,09	0,32	-0,08	0,73

Fonte: A autora.

Nota: ^a De outra maneira declarado com letras sobrescritas o coeficiente de correlação de Spearman (*rs*), todos os valores mostrados são coeficientes de correlação de Pearson (*r*). Os resultados estatisticamente significativos são indicados com um ($P < 0,01$ a $0,05$) ou dois asteriscos sobrescritos ($P < 0,001$ a $0,01$).

9 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o curso da infecção e os níveis de citocinas em camundongos BALB/c suscetíveis inoculados apenas com SGH de *Mg. migonei* ou em combinação com *L. (V.) braziliensis*. Ao final do período de observação (8 semanas), todos os camundongos dos grupos SGH e CTRL apresentaram DNA negativo para *L. (V.) braziliensis*, conforme esperado. Metade dos camundongos nos grupos SGH+LEISH e LEISH foram positivos na PCR, mostrando uma baixa infectividade de *L. (V.) braziliensis* em BALB/c, conforme relatado anteriormente (DEKREY *et al.*, 1998; SAMUELSON *et al.*, 1991). Porém, os grupos SGH+LEISH e LEISH negativos também podem estar relacionados a outros fatores, incluindo a quantidade de DNA de *L. (V.) braziliensis* presente nas amostras, que pode estar abaixo do limite de detecção (10 fg) do protocolo de Rodrigues *et al.* (2002) aqui utilizado. Além disso, devemos considerar que camundongos foram inoculados na pata traseira e utilizamos amostras de pele para a PCR. Portanto, esses resultados negativos também podem ser devido à distribuição irregular de *L. (V.) braziliensis* na pele de camundongos BALB/c, conforme demonstrado com outras espécies de *Leishmania* (DOEHL *et al.*, 2017).

Observamos lesões não ulcerativas leves em camundongos dos grupos SGH+LEISH e LEISH. As lesões em camundongos do grupo LEISH aumentaram progressivamente, enquanto as lesões em camundongos do grupo SGH+LEISH diminuíram progressivamente até a oitava semana PI. No entanto, considerando o baixo número de observações (ou seja, três camundongos de cada grupo apresentando lesões cutâneas), sugerimos pesquisas adicionais com um tamanho de amostra maior para confirmar se a saliva de *Mg. migonei* pode reduzir o tamanho da lesão e promover uma recuperação mais rápida, utilizando camundongos BALB/c ou outro modelo animal. Nossos achados concordam com um estudo anterior mostrando que o tamanho da lesão causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foi menor em camundongos BALB/c infectados na presença de SGH de *Bichromomyia flaviscutellata* e *Psychodopygus complexus*, respectivamente, em comparação com camundongos controle (FRANCESQUINI *et al.*, 2014). Em outro estudo com camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* foi observada uma pequena lesão na pata infectada, sem ulcerações (PEREIRA *et al.*, 2009). Resultados semelhantes também foram descritos por Rocha *et al.* (2007), para camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. (V.) braziliensis* que apresentavam pequena lesão nodular, sem alterações na pata

infectada e posterior cicatrização espontânea da lesão. O resultado de autocura ou proteção contra leishmaniose causada por *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* através da resposta imune da saliva de flebotomíneos foi relatada em modelos de roedores (THIAKAKI *et al.*, 2005; GOMES; OLIVEIRA, 2012; LESTINOVA *et al.*, 2017).

Analisando a produção de citocinas em culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c em diferentes grupos, observamos algumas diferenças estatisticamente significativas (ver seção 3. Resultados) que variaram de acordo com o tipo de estímulo e com a quantidade de dias pós-estímulo. Por exemplo, níveis aumentados de TNF e IL-17A foram registrados em culturas de células esplênicas de camundongos do grupo SGH, 3 dias após a estimulação com SGH 0,5; também houve um aumento semelhante após estimulação SGH 0,25, embora não estatisticamente significativo. Níveis diminuídos de IL-10 também foram registrados em culturas de células esplênicas de camundongos do grupo SGH, 3 dias após a estimulação com SGH 0,25. Níveis aumentados de TNF e níveis diminuídos de IL-10 também foram registrados 3 dias após a estimulação com LSA em camundongos dos grupos SGH e SGH + LEISH, respectivamente.

As propriedades antigênicas e imunogênicas da saliva são conhecidas por diferirem entre as espécies de flebotomíneos (LESTINOVA *et al.*, 2017). Em relação aos modelos murinos, Moura *et al.* (2010) relataram uma regulação positiva da expressão de TNF em camundongos BALB/c pré-sensibilizados três vezes com saliva de *Ny. intermedia*, e posteriormente foram injetadas com sonicato de glândulas salivares deste inseto. Isso corrobora com o presente estudo, no qual também observamos aumento da expressão de TNF em camundongos BALB/c injetados com SGH de *Mg. migonei*. O aumento precoce de TNF e a diminuição da IL-10 em nosso estudo podem estar relacionados ao equilíbrio entre Th1/Th2, conforme afirmado por Moura *et al.* (2007) que analisou a resposta imune contra saliva de *Ny. intermedia* e efeitos da pré-exposição na infecção por *L. (V.) braziliensis*, utilizando um modelo experimental intradérmico (BALB/c).

Estudos com camundongos BALB/c mostraram níveis mais baixos de IFN- γ após o desafio com *L. (V.) braziliensis* e SGH (*Ny. intermedia*) em comparação com camundongos inoculados com PBS e infectados com *L. (V.) braziliensis* (MOURA *et al.*, 2007; WEINKOPFF *et al.*, 2014). Curiosamente, neste estudo, níveis diminuídos de IFN- γ e IL-17A foram detectados em culturas de células esplênicas de camundongos do grupo SGH, 5 dias após estímulo com SGH 0,25 quando comparados ao grupo LEISH. É importante ressaltar

que o mesmo fenômeno ocorre quando o estímulo utilizado foi LSA, onde o IFN- γ também diminuiu significativamente no grupo SGH, 5 dias após a estimulação com LSA. Além disso, o primeiro estudo avaliando o efeito das glândulas salivares do flebotomíneo em células humanas *in vitro*, revelou que a saliva de *Phlebotomus papatasi* inibe a produção de IFN- γ (ROGERS; TITUS, 2003).

Nossos resultados sugerem que a produção de citocinas induzida pelas células esplênicas *in vitro* não se sustentou ao longo do tempo, diminuindo de 3 para 5 dias de cultivo. Por exemplo, níveis baixos de IL-17A e TNF foram detectados em culturas de células esplênicas de camundongos do grupo SGH, 5 dias após a estimulação com SGH 0,25, em comparação com os níveis do dia 3. Da mesma forma, níveis menores de IL-17A e IFN- γ foram detectados em camundongos do grupo SGH 5 dias após a estimulação com LSA, em comparação com 3 dias. Por outro lado, os níveis de TNF foram significativamente maiores após 5 dias do que após 3 dias no grupo LEISH. Antígenos de *Leishmania (V.) braziliensis* são estimuladores naturais de IFN- γ e IL-17A liberados por células Th1, que levam à rápida infecção de macrófagos e neutrófilos, favorecendo a sobrevivência do parasita nos estágios iniciais da infecção (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). A baixa expressão de citocinas regulatórias de células T ativadas é uma característica marcante de *L. (V.) braziliensis* (SOUZA *et al.*, 2013). Estudos com camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (por exemplo, BALB/c knockout para TNF) sugerem que o TNF é uma citocina importante para o controle da infecção, principalmente durante a fase aguda (ROCHA *et al.*, 2007; ROHOUSOVÁ; VOLF, 2006). Isso corrobora com nossos achados, uma vez que a produção de TNF por células esplênicas foi sustentada ao longo do tempo no grupo LEISH. Curiosamente, o soro de pacientes com leishmaniose mucosa apresentou maiores concentrações de TNF do que o soro de pacientes com leishmaniose cutânea (DA-CRUZ *et al.*, 1996; GAZE *et al.*, 2006), sugerindo que esta citocina pode estar envolvida na resposta imune apresentada na fase crônica da doença e destruição dos tecidos. Assim, a redução dos níveis de IL-17A e IFN- γ após 5 dias no grupo SGH pode ser resultado de um papel regulador da saliva de *Mg. migonei*.

Encontramos uma correlação positiva entre IL-10 e TNF no grupo CRTL estimulado *in vitro* com SGH 0,25, bem como no grupo SGH+LEISH após estímulo com SGH 0,25 ou LSA. Da mesma forma, detectamos uma correlação positiva entre TNF e IFN- γ no grupo SGH+LEISH, bem como entre IL-10 e IFN- γ no grupo LEISH, 5 dias após estimuladas com SGH 0,25. Essa sinergia entre TNF e IFN- γ parece ser muito importante na eliminação do

parasita, uma vez que estudos *in vitro* pioneiros demonstraram que essa correlação foi essencial na ativação de macrófagos para a eliminação de *Leishmania* via espécies ROS (BODGAN *et al.*, 1990; GREEN *et al.*, 1990). Em outro estudo, a IL-10 também esteve presente nas lesões, na tentativa de equilibrar o dano e a eliminação do parasita (SCOTT; NOVAIS, 2016). Nossos resultados reforçam a ativação das citocinas por meio de antígenos de *Leishmania*, mas também a imunomodulação pela saliva do inseto.

IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A desempenham um papel importante na resposta imune contra *L. (V.) braziliensis* em diferentes hospedeiros (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LESTINOVA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Por exemplo, a IL-10 é importante na regulação das respostas imunes que estão relacionadas à progressão da lesão em pacientes com leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (V.) braziliensis* e níveis aumentados de IL-10 também foram relatados em infecções por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c (MOURA *et al.*, 2005; KANE; MOSSER, 2001). TNF na infecção por *L. (V.) braziliensis* tem a reputação de estar envolvido no controle do número de parasitas na pele, nódulos linfáticos e baço e no processo de cicatrização de feridas (TRIPATHI *et al.*, 2007). IFN- γ é a principal citocina envolvida na ativação de macrófagos e tanto o IFN- γ quanto o TNF estimulam a síntese de óxido nítrico, causando a morte do parasita (DARRAH *et al.*, 2007). Estudos já relataram uma correlação direta entre a frequência de células TCD4 + expressando IFN- γ e TNF e o tamanho da lesão (ANTONELLI *et al.*, 2005) e pacientes com leishmaniose apresentam alta produção de IFN- γ e TNF (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Da mesma forma, a IL-17A desempenha um papel importante no aumento da imunidade celular pró-inflamatória adaptativa, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Nossos resultados apoiam nossa hipótese original de que a saliva de *Mg. migonei* modula a resposta imune de camundongos BALB/c à infecção por *L. (V.) braziliensis*. O conhecimento adquirido neste trabalho abrirá caminho para novos estudos para melhor compreender a relação entre picadas de flebotomíneos e o risco de desenvolvimento de LC, particularmente em áreas onde *Mg. migonei* está envolvido na transmissão.

10 CONCLUSÕES

Nossos achados sugerem que a saliva de *Mg. migonei* não altera significativamente a expressão clínica da infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c, mas contribui para modular sua resposta imune. Mesmo considerando o aumento de algumas citocinas inflamatórias sob diferentes estímulos e tempos, as células esplênicas do BALB/c previamente sensibilizadas com SGH tiveram aumentos menos expressivos, indicando que a saliva de *Mg. migonei* tem um efeito regulatório na resposta imune adaptativa à infecção por *L. (V.) braziliensis*. Outros estudos funcionais seriam valiosos para comparar as propriedades imunogênicas da saliva de diferentes espécies de flebotomíneos e para verificar se a saliva de *Mg. migonei* pode desempenhar um papel significativo na resolução de lesões de *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 28, p. 691-703, 2014.
- ABDEL-BADEI, N. M. *et al.* Morphometrics and protein profiles of the salivary glands of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* sand flies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 106, n. 4, p. 235-242, 2012.
- ADLER, S.; THEODOR, O. The mouthparts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Jerusalém, v. 20, p. 109-142, 1926.
- AKILOV, O.E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN. T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 132-42, 2007.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper 1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-13, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342373/>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- ALEXANDRE, J. *et al.* Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 3566, 2020.
- ALVAR, J. *et al.* The Relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>. Acesso em: 19 out. 2018.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 665-693, 2005.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 6, n.3, p.122-127, 2007.
- ANDRADE, B. B.; TEIXEIRA, C. R. Biomarkers for exposure to sand flies bites as

- tools to aid control of leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-7, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00121/full>. Acesso em: 20 set. 2018.
- ANJILI, C.O. *et al.* The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera, Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 97-100, 1995.
- ANTONELLI, L.R. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, Netherlands, v. 101, p. 226-230, 2005.
- AQUINO, D.M. *et al.* Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 83, n. 4, p.825-827, 2010.
- ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 269-281, 2000.
- ARAÚJO, A. P. O. *et al.* Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, p. 543-545, 2012.
- ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.* Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, n. 1, p.601-608, 2014.
- ARAÚJO, V. E. M. *et al.* Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban area. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e2540, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820760/>. Acesso em: 20 set. 2018.
- AZULAY, R. D. **Leishmaniose tegumentar**. 1952. Tese (de Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Médicas do Distrito Federal, Brasília, 1952.
- BACELLAR, O. *et al.* Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, n. 2, p.75-78, 2009.
- BARRAL, A. *et al.* Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 6, p. 740-745, 2000.
- BELKAID, Y. *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. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 188, n. 10, 1941-1953, 1998.
- BEZERRA, H.S.; TEIXEIRA, M.J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 349-345, 2001.

BOGDAN, C. *et al.* Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **European journal of immunology**, Germany, v. 20, p.1131-1135, 1990.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2010.

BRAZIL, R.P.; RODRIGUES, A.A.F.; FILHO, J.D.A. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, Sunnyvale, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/sand-fly-vectors-of-leishmania-in-the-americas--a-mini-review-2161-0983-1000144.php?aid=48365>. Acesso em 05 jan. 2019.

BRITO, M. E. F. *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BRITO, M.E. *et al.* Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical medicine and international health**, Oxford, v.14, n.1, p.1278-1286, 2009.

BRITO, M. E. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, p. 425-429, 2012.

BRODIE, T.M. *et al.* Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 75, n. 5, p. 2359-2365, 2007.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 392, n.10151, p. 951-970, 2018.

CARVALHO, A.K. *et al.* Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Mediators of inflammation**, Oxford, v.1, p. e7068287, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/7068287/>. Acesso em: 18 set. 2018.

CARREGARO, V. *et al.* Nucleosides present on phlebotomine saliva induce immunosuppression and promote the infection establishment. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e0003600, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003600>. Acesso em: 15 dez. 2018.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, New York, v. 70, p. 383-390, 2009.

CHAMAKH-AYARI, R. *et al.* *In Vitro* Evaluation of a Soluble *Leishmania* Promastigote Surface Antigen as a Potential Vaccine Candidate against Human Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v.9, p.e92708, 2014.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHILDS, G.E. *et al.* Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, Abingdon, v. 78, n. 1, p.25-34, 1984.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Tampa, v. 2, n. 2, p. 124-126, 2010.

COLLIN, N. *et al.* Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Baltimore, v. 32, n. 9, p. 2185-2198, 2012.

COSMI, L. *et al.* Th17 plasticity: pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v.17, p. 12-16, 2014.

DA-CRUZ, A.M. *et al.* Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91 n. 2, p. 225–229, 1996.

DANTAS-TORRES F.; BRANDÃO-FILHO S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006b.

DANTAS, M.L. *et al.* Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n.2, p. 202-209, 2014.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and cellular probes**, London, v. 31, p. 65-69, 2017b.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, p. e0005406, 2017a. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005406>. Acesso em: 17 dez. 2018.

DARRAH, P.A. *et al.* Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. **Nature medicine**, United States, v. 13, n. 7, p. 843-850, 2007.

DAVIES, C. R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. **Epidemiology of Infection**, England, v. 114, p. 297-318, 1995.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 61-76, 1955.

DE BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, Netherlands, v. 52, p. 45–58, 1992.

DEKREY, G.K.; LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 2, p.827-829, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DOEHL, J. S. P. *et al.* Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. **Nature communications**, London, v. 8, n.1, p. 1-57, 2017.

DONNELLY, K.B.; LIMA, C.L.; TITUS, R.G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sandfly vector salivary gland lysate. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 84, p. 97-103, 1998.

FRANCESQUINI, F. C. *et al.* Salivary gland homogenates from wild-caught sand flies *Lutzomyia flaviscutellata* and *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* showed inhibitory effects on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 95, p. 418-426, 2014.

FRANCISCHETTI, I.M. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 1130-1144, 2010.

GAZE, S.T. *et al.* Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scandinavian journal of immunology**, Oxford, v. 63, n.1, p. 70-88, 2006.

- GERALDO, M.M. *et al.* In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite immunology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 365-376, 2016.
- GOMES, C.M. *et al.* *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1beta, IL-6, IL-10 and TGF-beta by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 225-231, 2014.
- GOMES-SILVA, A. *et al.* Can interferon-g and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford. v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.
- GOMES, R.B. *et al.* Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 186, n. 10, p. 1530-1534, 2002.
- GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-8, 2012.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. *et al.* The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1437, 2017.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GREEN, S.J. *et al.* *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of immunology**, Baltimore, v. 145, n. 12, 4290-4297, 1990.
- HERMIDA, M.D. *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC infectious diseases**, London, v. 14, p. 1-8, 2014. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-450>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. 19-32, 2006.
- Jl, J. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 174, n. 11, p. 7147-7153, 2005.

- JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.
- JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of immunology**, Bethesda, v. 165, n. 1, p. 364-372, 2000.
- KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of immunology**, Bethesda, v.166, n. 1, p. 1141-1147, 2001.
- KAMHAWI, S.; ASLAN, H.; VALENZUELA, J.G. Vector saliva in vaccines for visceral leishmaniasis: a brief encounter of high consequence?. **Frontiers in public health**, Lausanne, v. 2, n. 99, p. 1-6, 2014.
- KAMHAWI, S. *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, New York, v. 290, p.1351-1354, 2000.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are we Today? **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 177-185, 2010.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections. **Dermatologic clinics**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.
- KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, p. 1443-1474, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniases. **Philosophical Transactions of Royal Society of London**, London, v. 321, p. 380-404, 1988.
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniases. In. FEG Cox, D Wakelin, SH Gillespie, DD Despommier (eds), Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, **Parasitology**, 10th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005.
- LAZARI, P. *et al.* *Leishmania chagasi* in dogs from the city of Jaciara, Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 2, p. 315-317, 2016.
- LERNER, E.A. *et al.* Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 17, p. 11234-11236, 1991.
- LESTINOVA, T. *et al.* Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS neglected tropical diseases**,

San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0005600, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005600>. Acesso em: 14 nov. 2020.

LESTINOVA, T. *et al.* *Phlebotomus papatasi* exposure cross-protects mice against *Leishmania major* co-inoculated with *Phlebotomus duboscqi* salivary gland homogenate. **Acta tropica**, Amsterdam, v.144, p. 9-18, 2015.

LOKE, P. *et al.* Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 176, n. 6, p. 3926-3936, 2007.

LORENA, V. M. B. *et al.* Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Immunology**, Oxford, v. 72, n. 6, p. 529-39, 2010.

Luz, N.F. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* Saliva Induces Heme Oxygenase-1 Expression at Bite Sites. **Frontiers in immunology**, Switzerland, v. 28, n. 9, p. 2779, 2018.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MASMOUDÍ, A. *et al.* Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Warsaw, v. 2, p. 31-41, 2013.

MARZOUKI, S. *et al.* Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 84, n. 5, p.653-661, 2011.

MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological reviews**, Oxford, v. 201, p. 206-224, 2004.

MENDES-SOUSA, A. F. *et al.* Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e79787, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079787>. Acesso em: 23 set. 2018.

MENDONÇA, M.G. *et al.* Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

MENEZES, M.J. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BioMed Central immunology**, London, v. 9, n. 12, 2008.

MONTEIRO, M.C. *et al.* Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Northbrook, v. 76, n. 1, p. 88-94, 2007.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews Immunology**, London, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MOUGNEAU, F.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell Biology and Immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 240, p. 286-296, 2011.

MOURA, T. R. *et al.* Functional transcriptomics of wild-Caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: Identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v.7, n.5, e2242, 2013.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662654/>. Acesso em: 10 set. 2020.

MOURA, T. R. *et al.* Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco. V. 6, e712, 2010. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662654/>. Acesso em: 12 set. 2021.

MOURA, T. R. *et al.* Towards a novel experimental model of infection to study American Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

MOURA, T. R. *et al.* Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 1, n. 2, p. e84, 2007.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2100374/>. Acesso em: 22 set. 2018.

NACIF-PIMENTA, R. *et al.* Conserved and distinct morphological aspects of the salivary glands of sand fly vectors of leishmaniasis: an anatomical and ultrastructural study. **Parasites and Vectors**, London, v.13, n.1, p. 441, 2020.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

NIEVES, E., PIMENTA, P.F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, England, v. 37, n. 1, 134-40, 2000.

NOBEN-TRAUTH, N. *et al.* The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **Journal of immunology**, Bethesda, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, 2003.

NORSWORTHY, N.B. *et al.* Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulation interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1240-1247, 2004.

NOVOA, R. *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. (V.) braziliensis* Infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 132-136, 2011.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.

OLIVEIRA, F. *et al.* Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 2, n. 4, p. e226, 2008. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000226>. Acesso em: 24 abril 2018.

OLIVEIRA, F. *et al.* Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio. **Frontiers in immunology**, Switzerland, v. 4, p. 375, 2013.

OLIVEIRA, N. *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 09 jan. 2018.

PAHO. Pan-American Health organization. **Leishmaniasis. Epidemiological Reports in the Americas**. Leishmaniasis Report #4. July 2016.

PAVLI, A.; MALTEZOU H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, p. 1032-1039, 2010.

PEREIRA, C. G. *et al.* Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 231-240, 2009.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. **Leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional: Ministério da Educação e Saúde, 1948. v. 1.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, Washington, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PRATES, D. B. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, Hoboken, v. 90, n. 3, p. 575-582, 2011.

QI, H. *et al.* Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 167, n. 8, p. 4534-4542, 2001.

RAMALHO-ORTIGAO, M. *et al.* *Phlebotomus papatasi* SP15: mRNA expression variability and amino acid sequence polymorphisms of field populations. **Parasites and Vectors**, London, v. 8, p. 1-14, 2015.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

- RASMUSSEN, C; RITSKES-HOTINGA, M. An alternative method for rat fixation when giving subcutaneous, intramuscular and intraperitoneal infection (Camilla's method). **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, Scandinavian, v. 26, n. 3, p. 156-159, 1999.
- READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, n. 6, p. 147-154, 2014.
- REIS, L. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.35, n. 2, p. 103-115, 2006.
- RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, New York, v. 4, n. 3, p.143-152, 1995.
- RIBEIRO, J. M. C.; ROWTON, E. D.; CHARLAB, R. The salivary 5-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagus sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, Amsterdam, v. 30, n. 11, p. 279-285, 2000.
- RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in parasitology**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.
- ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, London, v. 75, n.76, p. 115-130, 2006.
- ROBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ROCHA, F. J. S. *et al.* Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.
- RODRIGUES, E.H. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, 3572-3576, 2002.
- ROGERS, K.A.; Titus, R.G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* and fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite immunology**, Oxford, v. 25, n. 3, 127-134, 2003.
- ROHOUSOVA, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, Praha, v. 53, n. 3, 161-171, 2006.
- ROHOUSOVA, I. *et al.* Detection of species specific response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, London, v. 130, n. 5, p. 493-499, 2005.
- ROHOUSOVA, I., *et al.* Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p.80-86, 2012.

SACKS, D; NOBEN-TRAUTH, N. The Immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 2, p. 845-858, 2002.

SAMUELSON, J. *et al.* A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 173, n. 1, 49-54, 1991.

SALES, K.G.D.S. *et al.* Fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of dog and human blood and *Leishmania* parasites in sand flies. **Parasite & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 131. 2020.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **The Lancet. Infectious diseases**, New York, v. 6, n. 6, p. 342-349, 2006.

SCOTT, P. NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature reviews Immunology**, London, v. 16, n. 9, 581-592, 2016.

SOUZA, M.A. *et al.* Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial pathogenesis**, London, v. 57, p. 27-32, 2013.

SECUNDINO, N.F. *et al.* The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasites and Vectors**, London, v. 5, n. 20, p. 1-4, 2012. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-20>. Acesso em: 12 ago. 2018.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 69, p. 323, 1975.

SILVA, F. *et al.* Inflammatory cell infiltration and high antibody production in balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 94-98, 2005.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F.T.T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 423-431, 2009.

SOARES, R.P.P.S.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Annals of the Brazilian Academy Sciences**, Rio De Janeiro, v.75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOONG, L.; HENARD, C.A.; MELBY, P.C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminaries in Immunopathology**, Germany, v. 34, n. 6, p. 735-751, 2012.

SOUSA, L. M. *et al.* Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Parasite immunology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 13-31, 2014.

TEIXEIRA, C. R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, 2005.

TENNANT, J. R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, Baltimore, v. 2, p. 685-694, 1964.

THIAKAKI, M. *et al.* Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Microbes and infection**, Paris, v. 7, n. 4, p. 760-766, 2005.

TIRADO, T.C., *et al.* Use of the high-content imaging system equipment to evaluate in vitro infection by *Leishmania braziliensis* in response to sand fly *Nyssomyia neivai* saliva. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 209, p. 105540, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32442434/>. Acesso em: 14 de junho 2019.

TRACEY, D. *et al.* Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS immunology and medical microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.

TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, New York, v. 239, n. 4845, 1306-1308, 1988.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Unifesp, 2005.

VASCONCELOS, C.O. *et al.* Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 21-27, 2014.

VALENZUELA, J.G. *et al.* Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 194, n. 3, p.331-342, 2001.

VLKOVA, M. *et al.* Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e1344, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001344>. Acesso em: 12 ago. 2018.

VOLF, P.; ROHOUSOVÁ, I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitology**, London, v. 1, p. 37-41, 2001.

VOLF, P., VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, United States, 36 Suppl 1:S1-9, 2011.

VOLF, P.; TESAROVA, P.; NOHYNKOVA, E. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 251-256, 2000.

VRIES, H. J.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, Auckland, v. 16, n. 16, p. 99-109, 2015.

WATANABE, H. *et al.* Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, Philadelphia, v. 22, n. 5, p. 460-466, 2004.

WEINKOPFF, T. *et al.* Repeated exposure to *Lutzomyia intermedia* sand fly saliva induces local expression of interferon-inducible genes both at the site of injection in mice and in human blood. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e2627, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002627>. Acesso em: 20 out. 2018.

WHEAT, W. H. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **Journal of immunology**, Bethesda, v. 180, n. 12, p. 8286-8298, 2008.

ZER, R. *et al.* Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 810-814, 2001.

ZIJLSTRA, E.E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasite & Vectors**, London, v.9, n. 1, p. 464, 2016.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA TROPICA

Acta Tropica 227 (2022) 106271



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropicaEffects of *Migonemyia migonei* salivary gland homogenates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice

Débora Elienai de Oliveira Miranda^a, Kamila Gaudêncio da Silva Sales^a,
 Luciana Aguiar Figueredo^a, Sheilla Andrade de Oliveira^a,
 Amanda Vasconcelos do Nascimento^a, Diego José Lira Torres^a, Petra Sumova^b, Petr Volf^b,
 Sinval Pinto Brandão-Filho^a, Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque^c, Virginia Maria
 Barros de Lorena^a, Filipe Dantas-Torres^{a,*}

^a Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil

^b Charles University, Prague, Czech Republic

^c Central Laboratory of Public Health Dr Milton Beserra de Sobral, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Cutaneous leishmaniasis
 BALB/c mice
 Sand fly saliva
 Immunomodulation
Migonemyia migonei
Leishmania (Viannia) braziliensis

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most widespread clinical form of leishmaniasis in the Americas. *Migonemyia migonei* is a widely distributed phlebotomine sand fly species in Brazil and has been implicated as a vector for *L. (V.) braziliensis*. In the present study, we investigated the effects of salivary gland homogenates (SGH) of *Mg. migonei* on the course of *L. (V.) braziliensis* infection in BALB/c mice. Mice were separated into four groups (six mice per group): CTRL (uninfected mice); SGH (mice inoculated with *Mg. migonei* SGH); SGH+LEISH (mice inoculated with *Mg. migonei* SGH plus *L. (V.) braziliensis* promastigotes); LEISH (mice inoculated with *L. (V.) braziliensis* promastigotes). Mice were followed up for 8 weeks and the cellular immune response was evaluated by flow cytometry at the end of the experiment. Analysis of cytokine production by splenic cells stimulated with 0.5 SGH, 0.25 SGH of *Mg. migonei* or *L. (V.) braziliensis* soluble antigen stimulation (LSA) demonstrated that upon stimulation with SGH 0.25, the production of IL-17A and TNF was not sustained in the SGH group, with decreasing levels of these cytokines after 5 days compared to 3 days of incubation. Analyzing the production of cytokines after LSA stimulation, we observed lower levels of IL-17A in the SGH group after 5 days compared to 3 days. The same was observed for IFN- γ in the SGH group. Yet, the levels of TNF were significantly higher in the LEISH group after 5 days compared to 3 days. Among SGH+LEISH and LEISH mice, three animals in each group developed skin lesions on the tail, the mean lesion size was significantly higher in the LEISH group. Our study suggests that *Mg. migonei* SGH may modulate BALB/c immune response, as reflected by the low production or early decrease of pro-inflammatory cytokines in splenic cell cultures following stimulation with *L. (V.) braziliensis* antigen. Our data also suggest that *Mg. migonei* saliva may reduce the lesion size in BALB/c mice, but further research with a larger sample size is needed to confirm this hypothesis.

1. Introduction

Leishmaniasis is a widespread disease caused by numerous *Leishmania* spp., which are transmitted by different species of phlebotomine sand fly vectors (Alvar et al., 2012). The disease has a wide clinical spectrum, ranging from self-healing localized skin ulcers to severe mutilating mucocutaneous lesions or life-threatening visceral disease. Disease progression is related to several factors, including host genetic

and immune response, *Leishmania* strain type (Zijlstra, 2016; Luz et al., 2018). In this regard, factors related to the vectors may also influence the course of *Leishmania* spp. infection (Lestonova et al., 2017; Tirado et al., 2020). At the time of transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes, the sand fly vector also inoculates its saliva into the host. The saliva has pharmacological properties that favor the parasite's survival in the host organism (Titus and Ribeiro, 1988). In fact, by interfering with local hemostasis, inflammatory and immune responses,

* Corresponding author.

E-mail address: filipe.torres@fiocruz.br (F. Dantas-Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106271>

Received 25 August 2021; Received in revised form 6 December 2021; Accepted 7 December 2021

Available online 11 December 2021

0001-706X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

the sand fly saliva causes important local physiological and immunological changes that favor the transmission and the establishment of *Leishmania* spp. (Andrade et al., 2005; Rohousová and Volf, 2006; Menezes et al., 2008).

Experimental models of cutaneous leishmaniasis (CL) have been used to investigate the effects of sand fly salivary gland homogenates (SGH) on the course of infection with different *Leishmania* spp. For instance, different studies have investigated the effects of SGH in mice co-inoculated with *Leishmania* (*Viannia*) *brasilensis*, which is the most widespread causative agent of CL in the Americas. In the early 1990s, authors demonstrated that SGH of *Lutzomyia longipalpis* co-inoculated with *L. (V.) braziliensis* increases the size and duration of lesions in BALB/c mice (Samuelson et al., 1991). However, *Lu. longipalpis* is not a natural vector of *L. (V.) braziliensis*, which is transmitted by several other sand fly species in the Americas (Brazil et al., 2015). Thus, the question whether SGH from different sand fly species could exert different effects on *L. (V.) braziliensis* remained.

Subsequent studies using other sand fly species, including natural vectors, confirmed SGH from these sand flies may increase *L. (V.) braziliensis* infectivity and size of the lesions (Donnelly et al., 1998; Bezerra and Teixeira, 2001). On the other hand, de Moura et al. (2007) demonstrated that the SGH of *Nyssomyia intermedia* did not promote protection against *L. (V.) braziliensis* infection, although the development of the lesion was delayed. Furthermore, a plasmid expressing a salivary protein (Linb-11) isolated from *Ny. intermedia* saliva was able to protect BALB/c mice against *L. (V.) braziliensis* infection (de Moura et al., 2013).

Altogether, the above-mentioned studies suggested that SGH from different sand fly vectors may have different effects on the course of *L. (V.) braziliensis* infection in mice, increasing infectivity and lesions, or possibly promoting protection. In this perspective, we investigated the clinical and immunological effects of SGH from *Migonemyia migonei* on the course of *L. (V.) braziliensis* infection in BALB/c mice. We choose this sand fly species as a model considering its prominent role as a vector of *L. (V.) braziliensis* (Nieves and Pimenta, 2000; Alexandre et al., 2020; Sales et al., 2020).

2. Materials and methods

2.1. Ethics approval

Procedures adopted in this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA, number: 114/2017) of the Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Pernambuco, Brazil. The animal protocol was designed to minimize pain or discomfort to the mice, which were maintained in rooms with a controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$) environment under continuous air renovation conditions. Mice were housed in a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food (Nuvilab, Curitiba, Paraná, Brazil) and water.

2.2. Parasites and soluble antigen preparation

A *L. (V.) braziliensis* strain (MHOM/BR/75/M2903) previously isolated from a patient in Serra dos Carajás, Pará state, northern Brazil, was used in this study. Parasites were grown in Schneider medium (pH 7.4), containing 10% fetal bovine serum (10 U/ml penicillin) and 10 µg/ml streptomycin (complete Schneider medium), maintained at 26 °C. The promastigotes were passed *in vitro* on a weekly basis. On the sixth day of culture, stationary phase promastigotes (1×10^6 parasite cells/ml) were harvested, centrifuged ($1620 \times g$ for 10 min) in phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.4), and subsequently used for mice infection.

Leishmania soluble antigen (LSA) extracts were prepared using a protocol described by Chamakh-Ayari et al. (2014) and used in cell culture. Promastigote cultures of *L. (V.) braziliensis* were washed in $1 \times$ PBS, centrifuged at $800 \times g$ for 15 min at 4 °C and supernatants were

removed. The pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA) 1×10^9 parasites/ml. The parasite solution was subjected to three rapid freeze-thaw cycles followed by six pulses of 20 s/40 W in a sonicator. Samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and supernatants were collected. To check the integrity of the LSA, a polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970) at concentrations of 20 µg/ml and 40 µg/ml, which were stained with Coomassie blue. After these procedures, the LSA fractions were stored at -20 °C until use in cell culture assays (Brito et al., 2000).

2.3. SGH production

The salivary glands were obtained from *Mg. migonei* females from a colony maintained at Charles University, Prague, Czech Republic. The colony was established from specimens captured in Baturité municipality, Ceará state, northeastern Brazil, and maintained in standard conditions as described by Volf and Volfova (2011). The salivary glands were dissected in Tris buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) and lyophilized for shipment to Brazil at room temperature. One hour before use, the preparation was reconstituted in distilled water at a proportion of one salivary gland per 1 µl of distilled water. The equivalent to a single salivary gland was used for each inoculation point.

2.4. BALB/c mice inoculation with *L. (V.) braziliensis*, SGH, or both

For experimental infection, we used BALB/c mice, the animal model used in most of the previous studies assessing the effects of sand fly saliva on the host immune response and/or *Leishmania* infection (Samuelson et al., 1991; Donney et al., 1998; Bezerra and Teixeira, 2001; De Moura et al., 2007, 2013). Eight weeks-old BALB/c mice were separated into four groups (six mice per group): Control (CTRL) group (six uninfected mice inoculated with PBS); SGH group (six mice, each inoculated with the equivalent to a single salivary gland); SGH+LEISH group (six mice, each inoculated subcutaneously into the hind footpad with 10^6 stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* in 50 µl of PBS plus the equivalent to a single salivary gland); LEISH group (six mice, each inoculated with 10^6 stationary phase promastigotes of *L. (V.) braziliensis* in 50 µl of PBS).

2.5. Macroscopic evaluation of infection

The hind footpad swelling in each infected mouse was monitored weekly for 8 weeks by measuring the thickness of the infected footpad with a metric caliper and subtracting the thickness of the uninfected control footpad (Franceschini et al., 2014). The presence and size of lesions on the tail were also measured with a metric caliper. The mice were euthanized at the end of the observation period.

2.6. Cell culture for cytokine measurement

Eight weeks post-inoculation (wpi), the spleen of each mouse was aseptically removed after euthanasia. Then, splenic cell suspensions were obtained by maceration in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA). The spleens were macerated with a syringe plunger on a fine mesh screen (Falcon®), cell strainer 40 µm). The cell suspension obtained was deposited in 50 ml falcon tubes. After centrifugation at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C, the red blood cells were lysed by adding sterile water to the precipitate for 20 s (1 ml/spleen). The cells were resuspended in RPMI medium supplemented with 5% bovine fetal serum (Cultilab Materials para Cultura de Células, Campinas, SP, Brazil) and kept on ice for 5 min to deposit the lumps. After this period, the supernatant was transferred to a new tube, centrifuged again at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C and the precipitate was resuspended in supplemented RPMI medium. Cell counting and the viability test were performed using trypan blue in a Neubauer chamber (Tennant, 1964). The resuspended

cells were cultured at a concentration of 10^6 viable cells/well in 48-well plates (Costar Cambridge, MA, USA). Cells were then stimulated with concanavalin (ConA) (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SGH 0.5 (0.5 μl - the equivalent of a 1/2 of salivary gland), SGH 0.25 (0.25 μl - the equivalent of a 1/4 of salivary gland) or LSA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A culture with no stimulation was used as control. The plates were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator, and after 3 and 5 days the supernatants were collected and immediately frozen at -20 °C for further analysis of cytokine production. We collected cultured cells after 3 and 5 days to verify whether there was any difference in cytokine production over time.

2.7. DNA extraction and PCR testing

The extraction of genomic DNA from the ear tissue from mice was performed using the commercial kit DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. DNA samples were eluted in 100 μl and frozen at -20 °C. The quantity and purity of the extracted DNA were evaluated using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA).

DNA samples were then tested by a conventional PCR using the primers B1 (5'-GGGGTTGGTGAATATAGTGG-3') and B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), which target a 750-base pair region of the kinetoplast minicircle of *Leishmania* spp. belonging to the subgenus *Viannia* (de Bruijn and Barker, 1992). PCR reactions contained 14 μl of type I water, 2.5 μl of dNTP (2 mM), 0.5 μl of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) (5 U/ μl), 1.5 μl of MgCl₂ (50 mM), 2.5 μl of 10 \times PCR buffer, 2.5 μl each primer (100 pmol/ μl) (Invitrogen) and 2 μl of the template DNA. The amplification conditions consisted of 35 cycles (94 °C for 1 min, 65 °C for 1 min and 72 °C for 1 min), preceded by an initial denaturation step of 5 min at 94 °C (Rodrigues et al., 2002). A positive (DNA extracted from *L. (V.) braziliensis* cultured promastigotes) and a negative (DNA extracted from male phlebotomine sand flies) control were included in each PCR run. The products were analyzed in 1.5% agarose gels, being stained with ethidium bromide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and visualized under a UV transilluminator, using 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) as a molecular weight marker.

2.8. Cytometric bead array immunoassay

The BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences) was used to measure the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF, following the manufacturer's instructions. Results were obtained through 24 h using the BD FACSCalibur™ (BD Biosciences), considering the minimum of 2100 reads. The acquisition was performed using the CellQuestPro software and the analyzes with the FCAAP Array software (BD Biosciences) version 3.0. Results were expressed as rate index from stimulated culture/unstimulated cultures.

2.9. Statistical analyses

Quantitative data were tested for normality using the D'Agostino test. Kruskal-Wallis (followed by Dunn's multiple comparison test) was used to analyze nonparametric data, whereas the *t*-test or ANOVA (with Tukey's multiple comparison test) were used for parametric data. Correlation between the cytokines was performed using Spearman correlation coefficient (r_s) test (for non-normally distributed data) or Pearson correlation coefficient (r) test (for normally distributed data). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Macroscopic evaluation and detection of *L. (V.) braziliensis* DNA in infected mice

The macroscopic evaluation revealed the presence of mild non-ulcerative lesions in BALB/c mice infected with *L. (V.) braziliensis*, alone (LEISH group) or in combination with *Mg. mignonei* SGH (SGH+LEISH group). These animals presented cachexia (Fig. 1B) and mild non-ulcerative lesions on the tail (Fig. 1C-D).

In particular, three mice in the LEISH group presented mild non-ulcerative lesions on the tail from the 5th wpi. The lesions reached variable sizes, progressively increasing until the 8th wpi. Two mice from this presented a very minor increase in the thickness of their inoculated hind footpad (i.e., 0.04-0.05 μm) from the 6th to the 8th wpi, as compared to their non-inoculated hind footpad. Similarly, two mice in the SGH+LEISH group also presented mild non-ulcerated lesions on the tail starting on the 5th wpi and an additional one starting on the 6th wpi. However, such lesions decreased progressively until the 8th wpi. One mouse in this group showed very minor increase in the thickness (i.e., 0.03 μm) of its inoculated hind footpad from the 3rd to the 8th wpi, whereas another mouse showed the very same increase only in the 4th wpi. Moreover, they showed alopecia in the 5th wpi and were less active as compared to CTRL mice.

There were no significant differences in the hind footpad thickness between LEISH and SGH+LEISH groups. However, considering mice presenting lesions on the tail (i.e., three in each group), we found statistically significant differences in the mean lesion size (Fig. 1A) on the 6th wpi (*t*-test, $t_{(4)} = 3.148$, $P = 0.0346$), 7th wpi (*t*-test, $t_{(4)} = 8.097$, $P = 0.0013$), and 8th wpi (*t*-test, $t_{(4)} = 3.447$, $P = 0.0011$). Mice from the SGH and CTRL groups showed no skin lesions or increase in the thickness of their inoculated hind footpad.

Upon PCR testing, three (50%) mice in the SGH+LEISH group and three (50%) in the LEISH group were positive, whereas all mice in the SGH and CTRL groups were negative.

3.2. Cytokine production by splenic cells stimulated with SHG 0.5, SGH 0.25 and LSA after 3 days

The LSA presented proteins whose molecular weights varied between 17 kDa and 225 kDa. The antigen presented an electrophoretic profile consistent with crude antigens of *L. (V.) braziliensis* and showed no sign of degradation.

In splenic cell cultures stimulated with SGH 0.5 (Fig. 2A), levels of IL-17A were lower in the CTRL group as compared to the other groups, with statistically significant difference between SGH and CTRL group (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.023$). TNF production was significantly higher in the SGH group compared to the CTRL and LEISH groups (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.018$). No statistically significant differences were found with regard to IL-10, IFN- γ (Fig. 2A), IL-4, IL-6 and IL-2 production (Supplementary material 1).

Splenic cell cultures stimulated with SGH 0.25 (Fig. 2B) showed significantly lower levels of IL-10 in the SGH group as compared to the SGH+LEISH group (Dunn's test, $df = 5$, $P = 0.042$). TNF production was higher in the SGH group compared to the CTRL and LEISH groups (Fig. 2B), but differences were not statistically significant. Likewise, differences from other cytokines and groups were not statistically significant.

As far as, splenic cell cultures stimulated by LSA, the LEISH group produced higher levels of IL-10 as compared to CTRL and SGH groups (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.001$) (Fig. 2C). In addition, the SGH+LEISH group produced higher levels of IL-10 when compared to the SGH group (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.001$). Finally, TNF levels were significantly higher in the SGH+LEISH group when compared to CTRL and LEISH groups (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.001$).

D.E.O. Miranda et al.

Acta Tropica 227 (2022) 106271

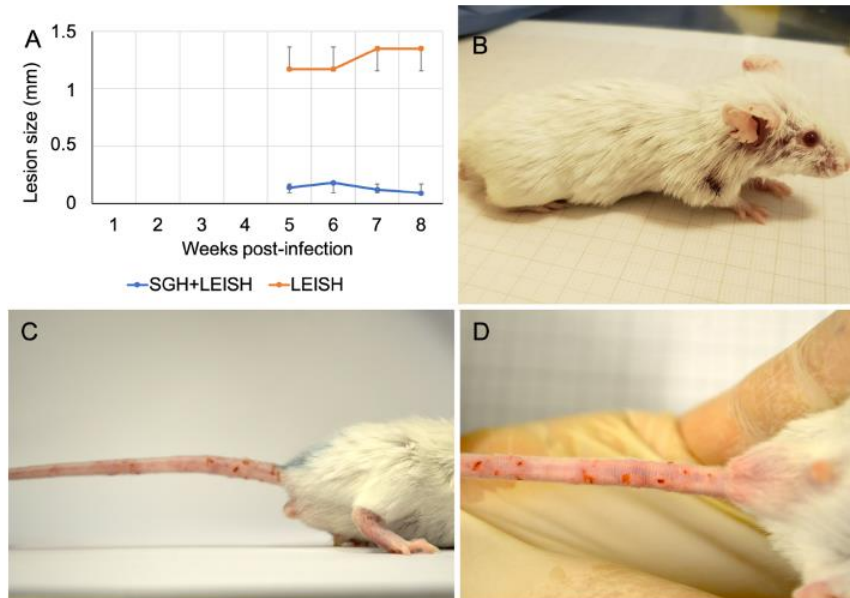


Fig. 1. Lesions in some BALB/c mice infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (A) Evolution of the size (mean per group) of lesions on the tail monitored weekly for 8 weeks post-inoculation. On the 5th week, two mice from the SGH+LEISH group and three mice from the LEISH group presented lesions, whereas from the 6th to the 8th week, three mice in each group presented lesions. Differences from the 6th to the 8th week were statistically significant (*t*-test, $P < 0.05$; see text for details); (B) Mouse showing cachexia; (C-D) Mild non-ulcerative lesions on the tail of two mice.

3.3. Cytokine production by splenic cells stimulated with SGH 0.5, SGH 0.25 and LSA after 5 days

There was no statistically significant difference regarding the production of IL-10, TNF, IL-6, IL-17A, IFN- γ , IL-4 and IL-2 when cells were stimulated with SGH 0.5 (Supplementary material 2). When stimulated with SGH 0.25 (Fig. 3A), the production of IL-17A (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.020$) and IFN- γ (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.037$) decreased in the SGH group compared to the LEISH group. There was no statistically significant difference in relation to IL-10, TNF, IL-6, IL-4 and IL-2 production.

When stimulated with LSA (Fig. 3B), lower levels of IL-17A were detected in the SGH+LEISH group compared to the CTRL group (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.024$). Regarding IFN- γ , the LEISH and SGH+LEISH groups showed higher levels compared to the SGH group (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.004$). In addition, the SGH group showed lower levels of IFN- γ compared to the CTRL group (Tukey's test, $df = 5$, $P = 0.004$).

3.4. Cytokine production in splenic cell culture over time

There were no statistically significant differences in the production of IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ and IL-2 after 3 and 5 days post-stimulation with SGH 0.5 (Supplementary material 3). Upon stimulation with SGH 0.25 (Fig. 4A), the production of IL-17A and TNF was not sustained in the SGH group, with decreasing levels after 5 days in comparison with 3 days of stimulation *in vitro*. The production of other cytokines was not statistically different.

Analyzing the production of cytokines after LSA stimulation (Fig. 4B), we observed lower levels of IL-17A and IFN- γ in the SGH group after 5 days compared to 3 days. On the other hand, the levels of TNF

were significantly higher after 5 days than 3 days in the LEISH group.

3.5. Correlation between IL-10, TNF and IFN- γ production after different stimuli

To evaluate the influence of the inhibitory cytokine IL-10 on T-cell activation in cultures, the correlation of IL-10 with IFN- γ and TNF was assessed. There was no correlation between IL-10, TNF or IFN- γ production 3 days after stimulation with SGH 0.5, SGH 0.25 or LSA (Table 1). However, after 5 days, we observed a correlation between IL-10 and TNF in the CTRL group stimulated with SGH 0.25 ($r_s = 1.00$, $P = 0.002$), as well as in the SGH+LEISH group after stimulation with either SGH 0.25 ($r_{(5)} = 0.89$, $P = 0.016$) or LSA ($r_{(5)} = 0.90$, $P = 0.013$). A correlation between TNF and IFN- γ was also found in the SGH+LEISH group ($r_{(5)} = 0.83$, $P = 0.040$), as well as a correlation between IL-10 and IFN- γ in the LEISH group ($r_{(5)} = 0.85$, $P = 0.029$), after stimulation with SGH 0.25.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the course of infection and cytokine release in susceptible BALB/c mice inoculated with *Mg. migozei* SGH alone or in combination with *L. (V.) braziliensis*. At the end of the observation period (8 weeks), all mice in the SGH and CTRL groups were negative *L. (V.) braziliensis* DNA, as expected. Half of the mice in the SGH+LEISH and LEISH groups were PCR positive, suggesting a low infectivity of *L. (V.) braziliensis* in BALB/c, as reported previously (Samuelson et al., 1991; Dekrey et al., 1998). However, the negative SGH+LEISH and LEISH groups could also be related to other factors, including the amount of *L. (V.) braziliensis* DNA present in the samples, which may be below the detection limit (10 fg) of the protocol of

D.E.O. Miranda et al.

Acta Tropica 227 (2022) 106271

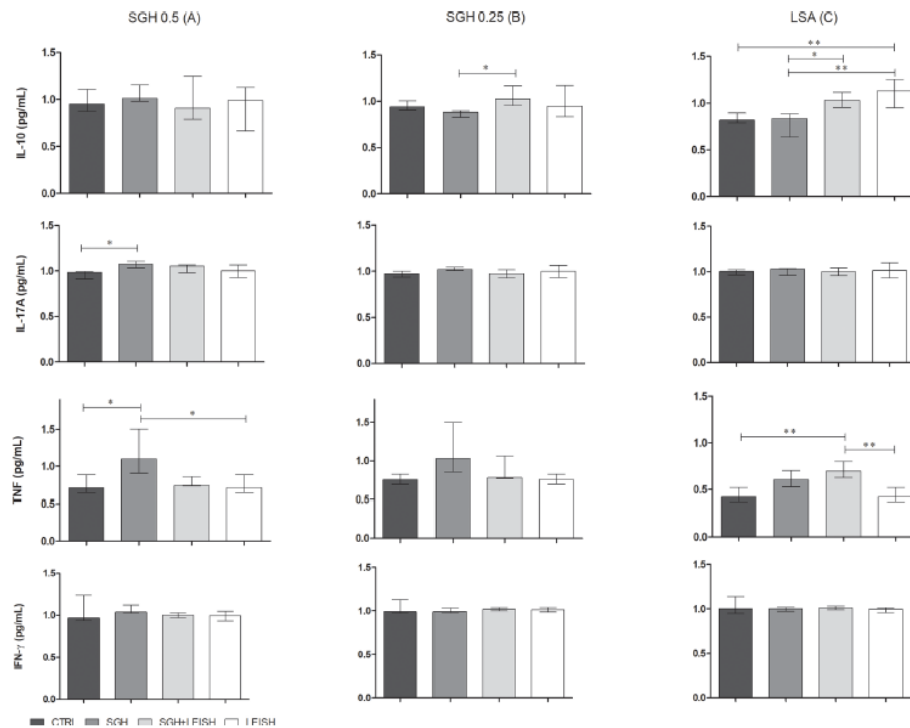


Fig. 2. Evaluation of the levels of cytokines detected in the culture supernatant after 3 days among the experimental groups after stimulation *in vitro*. (A) SGH 0.5; (B) SGH 0.25; (C) LSA. Legend: The horizontal bars indicate the statistical differences with the value of $p < 0.05$; $p < 0.001$ to 0.01 (**); $p < 0.01$ to 0.05 (*). Data of cytokine level was obtained from individual mice.

Rodrigues et al. (2002) herein used. Moreover, we should consider that mice were inoculated in the hind footpad and we used skin samples for the PCR. So, these negative results could also be due to the patchy distribution of *L. (V.) braziliensis* in the skin of BALB/c mice, as demonstrated with other *Leishmania* species (Doehl et al., 2017).

We observed mild non-ulcerative lesions on mice from the SGH+LEISH and LEISH groups. Lesions on mice from the LEISH group progressively increased, whereas lesions on mice from the SGH+LEISH group progressively decreased until the 8th wpi. However, considering the low number of observations (i.e., three mice from each group presenting skin lesions), we suggest further research with a larger sample size to confirm whether the *Mg. migonei* saliva can reduce the lesion size and promote a faster recovery, using BALB/c mice or other animal model. Our findings agree with a previous study showing that the lesion size caused by *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* was smaller in BALB/c mice infected in the presence of SGH from *Bichromomyia flaviscutellata* and *Psychodopygus complexus*, respectively, as compared to control mice (Franceschini et al., 2014). In another study with BALB/c mice infected with *L. (V.) braziliensis* a small lesion in the infected paw, without ulcerations was observed (Pereira et al., 2009). Similar results were also described by Rocha et al. (2007), for BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. (V.) braziliensis* which had a small nodular lesion, without changes in the infected paw and later spontaneous healing of the lesion. The self-healing outcome or protection against leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* through sand fly saliva immune response has been

documented in rodent models (Thiakaki et al., 2005; Gomes and Oliveira, 2012; Franceschini et al., 2014; Lestina et al., 2017).

Analyzing the cytokine production in splenic cell cultures from BALB/c mice in different groups, we observed some statistically significant differences (see Section 3. Results) that varied according to stimulation type and days post-stimulation. For instance, increased levels of TNF and IL-17A were recorded in splenic cell cultures from SGH group mice, 3 days after stimulation with SGH 0.5; there was also a similar increase after SGH 0.25 stimulation, although not statistically significant. Decreased levels of IL-10 were also recorded in splenic cell cultures from SGH group mice, 3 days after stimulation with SGH 0.25. Increased levels of TNF and decreased levels of IL-10 were also recorded 3 days after stimulation with LSA in mice from SGH and SGH+LEISH groups, respectively.

Antigenic and immunogenic properties of saliva are known to differ between sand fly species (for a review, see Lestina et al., 2017). As far as murine models, de Moura et al. (2010) reported an up-regulation of TNF expression in BALB/c mice pre-sensitized three times with *Ny. intermedia* saliva, which were later injected with salivary gland sonicates of this sand fly. This corroborates the present study, in which we also observed an increase in TNF expression in BALB/c mice injected with *Mg. migonei* SGH. The early increase of TNF and a decrease in IL-10 in our study may be related to the balance between Th1/Th2, as stated by de Moura et al. (2007) who analyzed the immune response against salivary of *Ny. intermedia* and effects of the pre-exposure on *L. (V.) braziliensis* infection, using an experimental intradermal model with

D.E.O. Miranda et al.

Acta Tropica 227 (2022) 106271

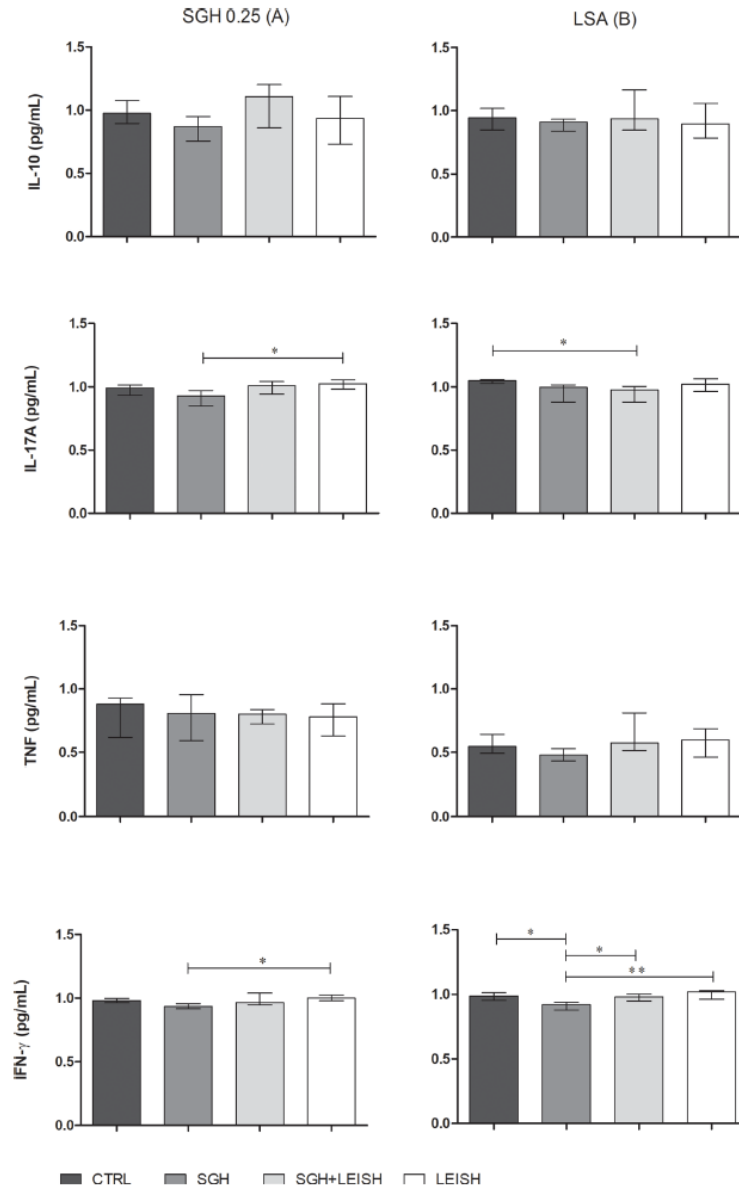


Fig. 3. Detection of cytokines in the culture supernatant (5 days) in the groups studied after stimulation *in vitro*. (A) Cytokines in the culture supernatant after stimulation with SGH 0.25; (B) Cytokines in the culture supernatant after stimulation with LSA. Legend: The horizontal bars indicate the statistical differences with the value of $p < 0.05$; $p < 0.001$ to 0.01 (**); $p < 0.01$ to 0.05 (*). Data of cytokine level was obtained from individual mice.

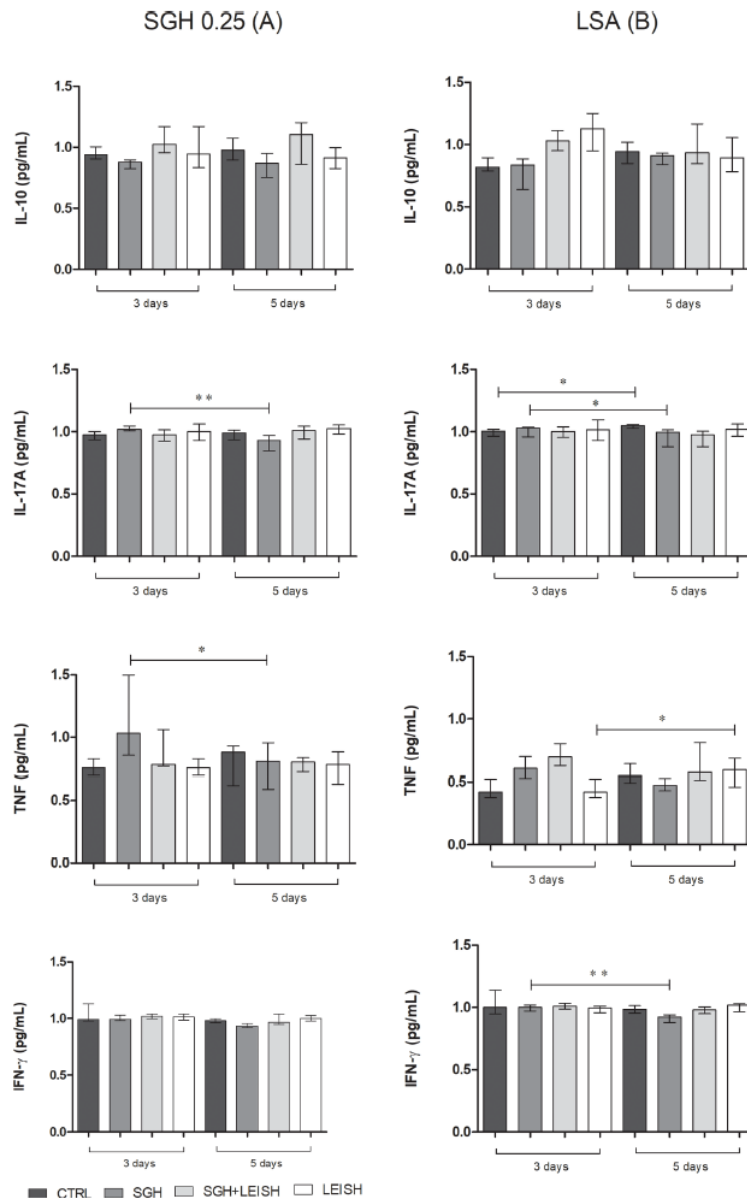


Fig. 4. Comparison of cytokines in the culture supernatant (3 days and 5 days) after stimulus. (A) Cytokines in the culture supernatant after stimulation with SGH 0.25; (B) Cytokines in the culture supernatant after stimulation with LSA. Legend: The horizontal bars indicate the statistical differences with the value of $p < 0.05$; $p < 0.001$ to 0.01 (**); $p < 0.01$ to 0.05 (*). Data of cytokine level was obtained from individual mice.

Table 1
Correlations between cytokine production IL-10, TNF and IFN- γ in groups with different stimulus *in vitro*.

Groups	Correlation coefficient ^a 3 days			5 days		
	IL-10 x TNF	IL-10 x IFN- γ	TNF x IFN- γ	IL-10 x TNF	IL-10 x IFN- γ	TNF x IFN- γ
CTRL group						
SGH 0.5	-0.47	-0.14	-0.25	-0.48	-0.49	0.59
SGH 0.25	0.39	0.61	0.15	1.00** <i>rs</i>	0.17	0.53
LSA	-0.60	0.57	-0.55	0.74	0.37	0.64
SGH group						
SGH 0.5	0.14	0.66	0.47	0.70	0.56	0.53
SGH 0.25	-0.62	-0.40	0.71	0.35	0.25	0.81
LSA	0.57	-0.56	-0.51	0.09	-0.78	0.09
SGH+LEISH group						
SGH 0.5	0.57	0.18	-0.27	0.01	0.43	0.00
SGH 0.25	-0.57	-0.30	-0.56	0.89 ^a	0.65	0.83 ^a
LSA	0.52	-0.40	-0.11	0.90 ^a	0.11	-0.29
LEISH group						
SGH 0.5	0.57	0.22	0.58	0.14	0.47	0.69
SGH 0.25	-0.61	0.13	0.48	-0.03	0.85 ^a	0.00
LSA	-0.03	-0.18	0.09	0.32	-0.08	0.73

^a Otherwise stated with superscript letters representing the Spearman correlation coefficient (*rs*), all values shown are Pearson correlation coefficients. Statistically significant results are indicated with one ($P < 0.01$ to 0.05) or two superscript asterisks ($P < 0.001$ to 0.01).

BALB/c mice.

Studies with BALB/c mice showed lower levels of IFN- γ after the challenge with *L. (V.) braziliensis* and SGH (*Ny. intermedia*) compared to mice inoculated with PBS and infected with *L. (V.) braziliensis* (de Moura et al., 2007; Weinkopff et al., 2014). Interestingly in this study, decreased IFN- γ and IL-17A levels were detected in splenic cell cultures of SGH group mice, 5 days after stimulation with SGH 0.25 when compared to the LEISH group. It is important to highlight that the same phenomenon occurs when the stimulus was the LSA, where the IFN- γ was also significantly decreased in the SGH group, 5 days after stimulation with LSA. Besides, the first study evaluating the effect of the sand fly salivary glands on human cells *in vitro*, revealed that the saliva of *Phlebotomus papatasi* inhibits the production of IFN- γ (Rogers and Titus, 2003).

Our results suggest that the cytokine production induced by splenic cells *in vitro* not sustained over time, decreasing from 3 to 5 days of culture. For example, lower levels of IL-17A and TNF were detected in splenic cell cultures from SGH group mice, 5 days after stimulation with SGH 0.25, as compared to levels at day 3. In the same way, lower levels of IL-17A and IFN- γ were detected in SGH group mice 5 days after stimulation with LSA, as compared to 3 days. On the other hand, the levels of TNF were significantly higher after 5 days than 3 days in the LEISH group. *Leishmania (V.) braziliensis* antigens are natural stimulators of IFN- γ and IL-17A released by Th1 cells, which lead to quick infection of macrophages and neutrophils, favouring parasite survival in early stages of infection (Alexander and Brombacher, 2012; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017). Low expression of regulatory cytokines from activated T cells is a remarked characteristic of *L. (V.) braziliensis* (Souza et al., 2013). Studies with mice infected with *L. (V.) braziliensis* (e.g. BALB/c knockout to TNF) suggest that TNF is an important cytokine for infection control mainly during the acute phase (Rohoušová and Volf, 2006; Rocha et al., 2007). This corroborates our findings, since the production of TNF by splenic cells was sustained over time in the LEISH group. Interestingly, sera from patients with mucosal leishmaniasis presented higher concentrations of TNF than sera from patients with cutaneous leishmaniasis (Da-Cruz et al., 1996; Gaze et al., 2006), suggesting that this cytokine may be involved in the immune response presented in the chronic phase of the disease and tissue destruction. Thus, reduction of IL-17A and IFN- γ levels after 5 days in SGH group

might be the result of a regulatory role of the *Mg. migonei* saliva.

We found a positive correlation between IL-10 and TNF in the CTRL group stimulated *in vitro* with SGH 0.25, as well as in the SGH+LEISH group after stimulation with either SGH 0.25 or LSA. In the same way, we detected a positive correlation between TNF and IFN- γ in the SGH+LEISH group, as well as between IL-10 and IFN- γ in the LEISH group, 5 days after stimulation with SGH 0.25. This synergy between TNF and IFN- γ seems to be very important in the elimination of the parasite, since pioneer *in vitro* studies demonstrated that this correlation was essential in the activation of macrophages for the elimination of *Leishmania* via reactive oxygen species (Bodgan et al., 1990; Green et al., 1990). In another study, IL-10 was also present in the lesions, as an attempt to balance damage and parasite elimination (Scott and Novais, 2016). Our findings reinforce the cytokines' activation via *Leishmania* antigens, but also immunomodulation by sand fly saliva.

IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A play an important role in the immune response against *L. (V.) braziliensis* in different hosts (Oliveira et al., 2013; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017; Lestinova et al., 2017). For instance, IL-10 is important in the regulation of immune responses that are related to lesion progression in patients with American cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis* and increased IL-10 levels have also been reported in infections by *L. (L.) major* in BALB/c mice (de Moura et al., 2005; Kane and Mosser, 2001). TNF in *L. (V.) braziliensis* infection is reputed to be involved in the control of the parasite numbers in the skin, lymph nodes and spleen and wound healing process (Tripathi et al., 2007). IFN- γ is the main cytokine involved in macrophage activation and both IFN- γ and TNF stimulate the synthesis of nitric oxide, causing the death of the parasite (Darrach et al., 2007). Studies have already reported a direct correlation between the frequency of TCD4+ cells expressing IFN- γ and TNF and the size of the lesion (Antonelli et al., 2005) and patients with leishmaniasis have high production of IFN- γ and TNF (Oliveira et al., 2014). In the same way, IL-17A plays an important role in enhancing adaptive pro-inflammatory cell immunity, contributing to the recruitment of neutrophils (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017).

Our results support our original hypothesis that the saliva of *Mg. migonei* modulate the immune response of BALB/c mice to *L. (V.) braziliensis* infection. The knowledge gained in this study will pave the way for further studies to better understanding the relationship between sand fly bites and risk of CL development, particularly in areas where *Mg. migonei* is involved in the transmission.

5. Conclusion

We conclude that the saliva of *Mg. migonei* does not change significantly the clinical expression of *L. (V.) braziliensis* infection in BALB/c mice, but modulates their immune response. Even considering the increase of some inflammatory cytokines (e.g. TNF and IL-17A) under different stimuli and times, the splenic cells of BALB/c previously sensitized with SGH had less expressive increases, indicating that the saliva of *Mg. migonei* has a regulatory effect on the adaptive immune response to *L. (V.) braziliensis* infection. Further functional studies would be valuable to compare immunogenic properties of saliva from different sand fly species and to ascertain whether the saliva of *Mg. migonei* could play a significant role in *L. (V.) braziliensis* lesion resolution in BALB/c mice.

Funding

The study was partially supported by the European Commission, Horizon 2020 Infrastructure Infravec2 project (H2020-INFRAIA-2016-1; <https://infravec2.eu>), PS and PV were supported by ERD Funds, project CePaViP CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000759). FDT is the recipient of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 313118/2018-3).

D.E.O. Miranda et al.

Acta Tropica 227 (2022) 106271

Authors' contributions

DEOM, FDT and VMBL designed experiments. DEOM, KGSS, LAF, SAO, AVN, DJLT performed experiments. DEOM and FDT wrote the paper. FDT, VMBL, SCGA, PS and PV and SPBF revised critically the paper for scientific content. FDT is the coordinator of the study. All the authors approved the final version to be published.

CRediT authorship contribution statement

Débora Elienai de Oliveira Miranda: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft. Kamila Gaudêncio da Silva Sales: Investigation. Luciana Aguiar Figueredo: Investigation. Sheilla Andrade de Oliveira: Investigation, Writing – review & editing. Amanda Vasconcelos do Nascimento: Investigation. Diego José Lira Torres: Investigation. Petra Sumova: Investigation, Writing – review & editing. Petr Volf: Writing – review & editing. Sinval Pinto Brandão-Filho: Writing – review & editing. Suenia da Cunha Gonçalves de Albuquerque: Writing – review & editing. Virginia Maria Barros de Lorena: Methodology, Investigation, Writing – review & editing. Filipe Dantas-Torres: Supervision, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Tatiana Spitzova for help with salivary gland dissection and Vera Volfova and Tomas Becvar (all Charles University, Prague, Czech Republic) for establishment and maintenance of *Mg. migonei* colony. Regina Bressan (Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation) for the donation of the *L. (V.) braziliensis* strain.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.actatropica.2021.106271.

References

- Alexander, J., Brombacher, F., 2012. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? *Front. Immunol.* 3, 80.
- Alexandre, J., Sadlova, J., Lestinova, T., Vojtkova, B., Jancarova, M., Podesova, L., Yurchenko, V., Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., Volf, P., 2020. Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Sci. Rep.* 10, 3566.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M., 2012. The WHO leishmaniasis control team. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.* *PLoS ONE* 7, e35671.
- Andrade, B.B., Teixeira, C.R., Barral, A., Barral-Netto, M., 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 665–693.
- Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 101, 226–230.
- Bezerra, H.S., Teixeira, M.J., 2001. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 349–351.
- Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W., Rollinghoff, M., 1990. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol.* 20, 1131–1135.
- Branil, R.P., Rodrigues, A.A.F., Filho, J.D.A., 2015. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – a mini review. *Entomol. Ornithol. Herpetol.* 4, 144.
- Brito, M.E., Mendonça, M.G., Gomes, Y.M., Jardim, M.L., Abath, F.G., 2000. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 318–321.
- Chamakh-Ayari, R., Bras-Gonçalves, R., Bahi-Jaber, N., Petitdidier, E., Markikou-Ouni, W., Aoun, K., Moreno, J., Carrillo, E., Salotra, P., Kaushal, H., Negi, N.S., Arevalo, J., Falconi-Agapito, F., Privat, A., Cruz, M., Pagniez, J., Papierok, G., Rhouma, F.B.H., Torres, P., Lemesre, J., Chenik, M., Meddeb-Gamaoui, A., 2014. *In vitro* evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. *PLoS ONE* 9, e92708.
- Da-Cruz, A.M., de Oliveira, M.P., de Luca, P.M., Mendonça, S.C., Coutinho, S.G., 1996. Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 225–229.
- Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M., Seder, R.A., 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat. Med.* 13, 843–850.
- de Bruijn, M.H.L., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 52, 45–58.
- de Moura, R.R., Oliveira, F., Carneiro, M.W., Miranda, J.C., Clarêncio, J., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barral, A., Ribeiro, J.M.C., Valenzuela, J.G., Oliveira, C.I., 2013. Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2242.
- de Moura, T.R., Novais, F.O., Oliveira, F., Clarêncio, J., Noronha, A., Barral, A., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 73, 5827–5834.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Clarêncio, J., Follador, I., Carvalho, E.M., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e84.
- de Moura, T., Oliveira, F., Rodrigues, G., Carneiro, M., Fukutani, K., Novais, F., Miranda, J., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barral, A., de Oliveira, C.I., 2010. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e712.
- Dekrey, G.K., Lima, H.C., Titus, R.G., 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 66, 827–829.
- Doehl, J.S.P., Bright, Z., Dey, S., Davies, H., Magson, J., Brown, N., Romano, A., Dalton, J.B., Pinto, A.L., Pischfior, J.W., Kaye, P.M., 2017. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. *Nat. Commun.* 8, 57.
- Donnelly, K.B., Lima, C.L., Titus, R.G., 1990. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sandfly vector salivary gland lysate. *J. Parasitol.* 84, 97–103.
- Franceschini, F.C., Silveira, F.T., Passero, L.F., Tomokane, T.Y., Carvalho, A.K., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., 2014. Salivary gland homogenates from wild-caught sand flies *Lutzomyia flaviscutellata* and *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* showed inhibitory effects on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 95, 418–426.
- Gaze, S.T., Dutra, W.O., Lessa, M., Lessa, H., Guimarães, L.H., Jesus, A.R., Carvalho, L.P., Machado, P., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand. J. Immunol.* 63, 70–78.
- Gomes, R., Oliveira, F., 2012. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. *Front. Immunol.* 11, 110.
- Gonçalves-de-Albuquerque, S.C., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L.A.M., Goes, T.C., de Moraes, R.C.S., Oliveira, C.N.C., de Lorena, V.M.B., Paiva-Cavalcanti, M., 2017. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Front. Immunol.* 8, 1437.
- Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 145, 4290–4297.
- Kane, M.M., Mosser, D.M., 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 166, 1141–1147.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lestinova, T., Rohousova, I., Sima, M., de Oliveira, C.I., Volf, P., 2017. Insights into the sand fly saliva: blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005600.
- Luz, N.F., De Souza-Vieira, T., De Castro, W., Vivarini, A.C., Pereira, L., França, R.R., Silveira-Mattos, P.S., Costa, D.L., Teixeira, C., Menezes, C., Boaventura, V.S., de Oliveira, C.I., Lopes, U.G., Aronson, N., Andrade, B.B., Brodskyn, C.I., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Borges, V.M., 2018. *Lutzomyia longipalpis* saliva induces heme oxygenase-1 expression at bite sites. *Front. Immunol.* 28, 2779.
- Menezes, M.J., Costa, D.J., Clarêncio, J., Miranda, J.C., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., 2006. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol.* 9, 12.
- Nieves, E., Pimenta, P.F., 2000. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: psychodidae). *J. Med. Entomol.* 37, 134–140.
- Oliveira, W.N., Ribeiro, L.E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E.M., Bacellar, O., 2014. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* 66, 127–132.
- Oliveira, F., de Carvalho, A.M., de Oliveira, C.I., 2013. Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio. *Front. Immunol.* 4, 375.
- Pereira, C.G., Silva, A.L., de Castilhos, P., Mastrantonio, E.C., Souza, R.A., Romão, R.P., Resende, R.J., Pena, J.D., Beletti, M.E., Souza, M.A., 2009. Different isolates from

D.E.O. Miranda et al.

Acta Tropica 227 (2022) 106271

- Leishmania brasiliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet. Parasitol.* 165, 231–240.
- Rocha, F.J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G., Bogdan, C., 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in mice. *Infect. Immun.* 75, 3823–3832.
- Rodrigues, E.H., de Brito, M.E.F., Mendonça, M.G., Werkhäuser, R.P., Coutinho, E.M., Souza, W.V., de Albuquerque, M.F.M., Jardim, M.L., Abath, F.G., 2002. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3572–3576.
- Rogers, K.A., Titus, R.G., 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* and fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite Immunol.* 25, 127–134.
- Rohousova, I., Volf, P., 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol.* 53, 161–171.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R., 1991. A mouse model of *Leishmania brasiliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173, 49–54.
- Sales, K.G.D.S., Miranda, D.E.O., Paiva, M.H.S., Figueredo, L.A., Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2020. Fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of dog and human blood and *Leishmania* parasites in sand flies. *Parasit. Vectors* 13, 131.
- Scott, P., Novais, F.O., 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 581–592.
- Souza, M.A., de Castro, M.C., de Oliveira, A.P., de Almeida, A.F., de Almeida, T.M., Reis, L.C., Medeiros, A.C., de Brito, M.E., Pereira, V.R., 2013. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb. Pathog.* 57, 27–32.
- Tennant, J.R., 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2, 685–694.
- Thiakaki, M., Rohousova, I., Volf, P., Chang, K.P., Soteriadou, K., 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect.* 7, 760–766.
- Tirado, T.C., de Andrade, A.J., Ribeiro, M.C.V.D.C., Figueiredo, F.B., 2020. Use of the high-content imaging system equipment to evaluate *in vitro* infection by *Leishmania brasiliensis* in response to sand fly *Nyssomyia neivai* saliva. *Acta Trop.* 209, 105540.
- Tripathi, P., Singh, V., Naik, S., 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 229–242.
- Titus, R.G., Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306–1308.
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36 (Suppl 1), S1–S9.
- Weinkopf, T., de Oliveira, C.I., de Carvalho, A.M., Hauyon-La, Torre, Y., Muniz, A.C., Miranda, J.C., Barral, A., Tacchini-Cottier, F., 2014. Repeated exposure to *Lutzomyia intermedia* sand fly saliva induces local expression of interferon-inducible genes both at the site of injection in mice and in human blood. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2627.
- Zijlstra, E.E., 2016. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit. Vectors* 9, 464.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**Certificado de Aprovação**

Certificamos que o projeto intitulado “CURSO DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* NA PRESENÇA DE HOMOGENIZADO DE GLÂNDULA SALIVAR DE *Lutzomyia migonei*” protocolado sob nº 114/2017 pelo (a) pesquisador (a) **Filipe Dantas Torres** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM) em reunião **13/09/2017**. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 13 de setembro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/c)	10 (25-50gr/ 6-8 semanas/ machos) e 10 (25-45gr/ 6-8 semanas/fêmeas)
Total	20

Recife (PE, Brasil), 13 de setembro de 2017

Dr. Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mat. SIAPE: 1971435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / Fiocruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães**Comissão de Ética no Uso de Animais**

Recife, 27 de agosto de 2018

Termo Aditivo ao Certificado de Licença N° 114/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães – CEUA/IAM, em atenção à solicitação do (a) pesquisador (a): **FILIFE DANTAS TORRES** autoriza o presente Aditivo para licença **CEUA 114/2017** que inclui inclusão dos novos animais (passando de 24 para 48 camundongos) uma vez que não houve mudança na metodologia e sim um acréscimo justificável pelas possíveis perdas dos animais durante a execução e a necessidade da sua repetição.

Salientamos que este aditivo não contempla mudanças na vigência ou outras alterações no projeto acima citado.

Ressaltamos que a data de validade desta licença continua até 13 de setembro de 2021.

Cordialmente,

Lindomar José Pena
Coordenador da CEUA/IAM
(FioCruz Pernambuco)

Lindomar José Pena
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Mat. Siape: 1971435
e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
IAM / FioCruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br



Comissão de Ética no Uso de Animais

Recife, 21 de outubro de 2019

Termo Aditivo ao Certificado de Licença N° 114/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães – CEUA/IAM, em atenção à solicitação do pesquisador **Dr Filipe Dantas Torres**, autoriza o presente Aditivo com a **inclusão** da colaboradora Sheilla Andrade de Oliveira e com o **aumento** no número de camundongos Balb/c no projeto CEUA n° **114/2017: “CURSO DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* NA PRESENÇA DE HOMOGEINIZADO DE GLÂNDULA SALIVAR DE *Lutzomyia migonei*”**.

Salientamos que este aditivo não contempla mudanças na metodologia ou outras alterações no projeto acima citado. Ressaltamos que a **data de vigência** desta licença continua a mesma (**13 de setembro de 2021**).

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/c)	36 (25-50gr/ 6-8 semanas/ machos) e 36 (25-45gr/ 6-8 semanas/fêmeas)
Total	72

Cordialmente,

Lindomar José Pena
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Mat. Signet: 1973455
e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
IAM / Fiocruz

Lindomar José Pena
Coordenador CEUA/IAM