

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**A INFLUÊNCIA DA SALIVA DO VETOR *Lutzomyia longipalpis* NA INFECÇÃO
DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania infantum chagasi***

JEFFERSON MESQUITA BRITO

SÃO LUÍS - MA

2018

JEFFERSON MESQUITA BRITO

**A INFLUÊNCIA DA SALIVA DO VETOR *Lutzomyia longipalpis* NA INFECÇÃO
DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania infantum chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Dra. Lucilene Amorim Silva

Coorientador: Dr. Francinaldo Soares Silva

SÃO LUÍS - MA

2018

Mesquita Brito, Jefferson.

A INFLUÊNCIA DA SALIVA DO VETOR *Lutzomyia longipalpis*
NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania infantum chagasi*
/ Jefferson Mesquita Brito. - 2018.

83 f.

Coorientador(a): Francinaldo Soares Silva.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
UFMA, 2018.

1. Flebotomíneo. 2. Infecção. 3. Leishmanioses. 4.
Modulação. 5. Reposta imune. I. Amorim Silva, Lucilene.
II. Soares Silva, Francinaldo. III. Título.

JEFFERSON MESQUITA BRITO

**A INFLUÊNCIA DA SALIVA DO VETOR *Lutzomyia longipalpis* NA INFECÇÃO
DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania infantum chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Data: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão

Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Aramys Silva dos Reis
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Eduardo Martins de Sousa
Universidade CEUMA

“Somos o que fazemos repetidamente. A excelência, portanto, não é um ato, mas um hábito.”

(Aristóteles)

A Deus pelo presente da vida e seu infinito amor.

Aos meus pais pelo carinho e dedicação na minha criação

Aos meus avós por auxiliar em minha criação.

Aos meus bisavós Maria Coelho e João Eufrásio (*in memoriam*)
por serem meus exemplos de integridade.

Aos meus orientadores Lucilene e Francinaldo, pois sem eles
nada disso seria possível.

Às professoras Rosane e Flávia, pelo direcionamento científico.

Ao meu amor Benedita, por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir o desenvolvimento desta pesquisa e ceder conhecimento aos envolvidos neste projeto. Quem me ajudou nas dificuldades e auxiliou com seu infinito conhecimento e amor em toda minha vida.

À minha orientadora Dra. Lucilene Amorim Silva pela sua disponibilidade e dedicação no decorrer desses anos. Melhor orientadora que poderia ter, foi quem acreditou na ideia e me ajudou em todas as etapas deste projeto, sem ela não seria possível chegar aos resultados expostos nesta dissertação. Ela me ajudou tanto na minha vida acadêmica como na minha vida pessoal, agradeço imensamente a esta grande pesquisadora, que a considero como mãe.

Ao meu orientador Dr. Francinaldo Soares Silva, sempre disponível e paciente, uma pessoa essencial para esta caminhada, foi ele quem me incentivou a seguir nesta carreira e incentivou a brigar pelos meus sonhos, sem ele não seria possível chegar até este momento da minha vida acadêmica. Sempre me dirigiu bons conselhos, tanto na vida acadêmica como na vida pessoal, mais do que um orientador ou amigo (amigão), o considero um pai. Agradeço também à sua esposa Claudia, uma grande amiga por quem tenho um grande carinho.

À Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e à Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra pelos incentivos e direcionamento científico durante o desenvolvimento desta pesquisa. É uma honra estar ao lado de pessoas renomadas. São nossos exemplos de cientistas.

Ao Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira pelos ensinamentos, sempre disposto a ensinar, pelas contribuições essenciais para melhoria deste estudo, foram anos de muita aprendizagem e incentivos, obrigado!

Ao amor da minha vida por me acompanhar nesta jornada, Benedita Maria Costa Neta, a quem devo uma boa parte da minha vida profissional e pessoal, quem está comigo em todos os momentos, bons ou ruins, e sempre tem uma forma de me incentivar e alegrar, independentemente da situação. Conviver com ela é uma benção, não conseguiria estar onde estou sem sua ajuda.

Ao Sr. Benedito, sua esposa Sra. Maria e seu filho Eduardo por ceder um espaço em sua propriedade para as coletas dos flebotomíneos, sempre prestativo e alegre com as visitas da equipe do Laboratório de Entomologia Médica (LEME). Bastante receptivos e amáveis, é prazeroso realizar pesquisas científicas regadas a conversas descontraídas e agradáveis.

À minha mãe, Úrçula de Maria Brito Mesquita, por todo carinho e amor em todas as etapas da minha vida, fundamental para formação, como já falei várias vezes: tenho orgulho de ser seu filho. Não tenho palavras para descrever o amor, gratidão e carinho que tenho por você.

Ao meu pai José Carvalho Brito, por ser meu exemplo de humildade e esforço, sempre feliz, admiro sua perseverança e inteligência, principalmente em seu trabalho. Pelos conselhos de pais que sempre guardo comigo e levo aonde vou.

Aos meus irmãos Jemeson, Yasmim, Johnata e Jainara, pelo carinho e incentivo. Ao meu sobrinho Klaus, Ana Cristina, Rafaela e Daniel pelos momentos felizes que passamos, são crianças maravilhosas. Às minhas tias Jamile e Janaina, são pessoas essenciais na minha vida, conseguem levantar o astral de qualquer um, tenho momentos maravilhosos ao lado de vocês. Quero viver mais vezes todos esses momentos!

A todos do Laboratório de Imunofisiologia (LIF), que me receberam de braços abertos, principalmente ao meu irmão de laboratório Douglas, quem me ensinou boa parte dos procedimentos que fiz na minha dissertação. Aos meus amigos mestrando, Lilian, Liana, André, Patrícia e Aluísio, com os quais dividi momentos de estudo. À Renata e Carlene, sempre dispostas a auxiliar todos no laboratório, agradeço pela ajuda. Agradeço também à Luana e Carol, por serem pessoas prestativas e sempre de bom humor ao ajudar. Ao professor Eder, professora Mayara e professora Thiare pelos ensinamentos, disponibilidade ao ensinar e conselhos durante todo meu mestrado.

A todos do Laboratório de Entomologia Médica (LEME), aos amigos Apoliana, Abdias e Luis Paulo, que me ajudaram durante a realização deste trabalho, principalmente em campo, parte essa que é não fácil, mas prazerosa. Ao João e Islana, que me ajudaram na extração das glândulas, sempre prestativos. Obrigado!

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que contribuíram para minha formação, vou levar esses conhecimentos para resto da minha vida.

Aos meus cunhados Francisco, Inácio e Rocknubia, são meus grandes amigos! À tia Dorinha e tio Edson pelos momentos felizes. A todos da minha família, agradeço por todos os momentos!

À turma de mestrado 2016.1 por termos caminhado juntos para alcançar esse objetivo em comum.

As instituições de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fornecerem os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização desta pesquisa pelos recursos disponibilizados para a realização do projeto. E a todos direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

Meus sinceros agradecimentos!

Sumário

1 INTRODUÇÃO	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1 Leishmanioses	25
3.2 Ciclo de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	27
3.3 Vetores naturais	31
3.4 Mecanismos de evasão de <i>Leishmania</i>	33
3.5 Interação saliva, <i>Leishmania</i> e sistema imune	35
3.6 Principais proteínas da saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	39
4 OBJETIVOS	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	42
6 RESULTADOS	44
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÕES	48
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da situação epidemiológica da leishmaniose visceral no mundo em 2013	25
Figura 2. Espécies de <i>Leishmanias</i>	26
Figura 3. Ciclo das leishmanioses em transição do ambiente silvestre ao ambiente peridoméstico e intradomiciliar	27
Figura 4. Ciclo de <i>Leishmania</i> no sistema fagocítico mononuclear	28
Figura 5. Ciclo de <i>Leishmania</i> no flebotomíneo	31
Figura 6. <i>Lutzomyia longipalpis</i> , vetor de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	25
Figura 7. Ação da saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em neutrófilos e macrófagos durante o repasto sanguíneo	37
Figura 8. Áreas de coletas pertencentes ao município de Chapadinha, Maranhão	43
Figura 9. Coleta e armazenamento dos flebotomíneos	44
Figura 10. Glândulas salivares visualizadas em estereomicroscópio	45
Figura 11. Número de <i>Leishmania infantum chagasi</i> não internalizada	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As leishmanioses que ocorrem no Brasil	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO	Adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>biochemical oxygen demand</i>)
C	Complemento
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL2/MCP-1	Quimiocina
CD4 ⁺	Co-receptor de linfócito T auxiliar
CD8 ⁺	Co-receptor de linfócito T citotóxico
CO ₂	Gás carbônico
CP	Carga parasitária
CR3	Receptor complemento três
FasL	Receptor Fas-Ligante
g	Gravidade
GP63	Glicoproteína 63
HP	Hoover Pugedo
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina gama
IgM	Imunoglobulina mu
IL	Interleucina
kHz	Kilohertz
LPG	Lipofosglicano
LjL	Proteína saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
LjM	Proteína saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MR	Receptor de manose
NO	Óxido nítrico
°C	Celso
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phate Buffered Salin</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PSG	Gel secretado por promastigotas (<i>promastigote secretory gel</i>)
ROS	Espécies reativas ao oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	Roswell park memorial institute medium
JNK	Jun n-terminal kinases
SGS	Sonicado de glândulas salivares (<i>salivary gland sonicate</i>)
Syts	Sinaptogamina

TCD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
TCD8 ⁺	Linfócito T citotóxico
Th1	“T helper 1”
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Mol
μ g	Micrograma
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetro
Vamp	Proteína de membrana ligada à vesícula

Resumo

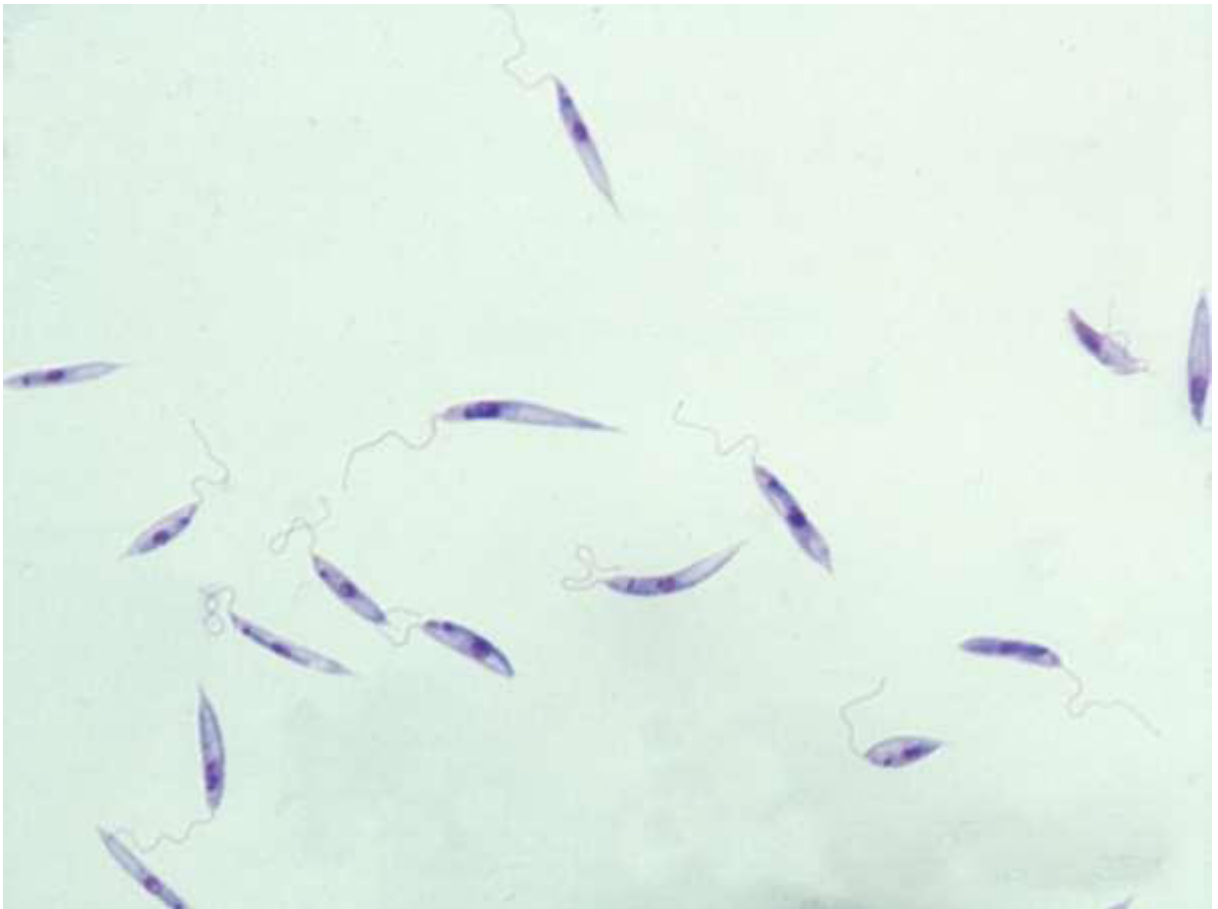
A transmissão do protozoário do gênero *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de flebotomíneos infectadas, através do inóculo do parasita juntamente com a saliva na pele do hospedeiro vertebrado. A saliva do vetor possui proteínas com ação vasodilatadora, anticoagulante e quimiotática, que atuam diretamente no sistema imunológico do mamífero. Pressupõe-se assim que a mesma possa exercer influência em etapas distintas durante todo o curso da infecção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis* em diferentes momentos da infecção de macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7 por *Leishmania infantum chagasi*, causador da leishmaniose visceral. Para tanto, os flebotomíneos foram coletados e apenas as fêmeas não ingurgitadas foram utilizadas. As glândulas salivares foram extraídas e colocadas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril, sonicadas, centrifugadas e os sobrenadantes (incluindo a saliva) foram conservados a -80°C. Para os ensaios *in vitro*, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em *chamber slides* e estimulados em diferentes momentos: antes, durante e pós infecção com *L. infantum chagasi* na proporção de 10 parasitos por macrófago. Em seguida as *chamber slides* foram acondicionadas em estufa a 5% de CO₂ à 37°C por 48 horas. Nossos achados mostram que os grupos estimulados com saliva antes e durante a infecção apresentaram maior número de macrófagos parasitados em relação ao controle. Verificou-se que os macrófagos estimulados em todos os momentos apresentaram produção aumentada de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas, em especial no grupo durante a infecção. Em relação à produção de citocinas, TNF- α foi detectada nos grupos com estímulos antes e durante a infecção, entretanto o grupo antes da infecção produziu mais IL-6 em comparação aos demais. Além destes resultados, destacamos que a saliva ainda influencia na proliferação e possível infectividade do parasito. Portanto, a saliva modula tanto a resposta imune dos macrófagos como potencializa a infecção pela *Leishmania*, sendo essencial para a sua manutenção.

Palavras-chave: leishmanioses; infecção; resposta imune; modulação; flebotomíneo.

Abstract

Parasitic protozoa of the genus *Leishmania* are transmitted when an infected sand fly takes a blood meal from a vertebrate host. During the blood-feeding process sand flies salivate into the host skin. Vector saliva presents active elements crucial for hematophagy that act directly on the host immune system, such as vasodilators, anticoagulants and chemotactic molecules. It is presumed that vector saliva exerts influence on distinct phases throughout the *Leishmania* infectious cycle. Therefore, our objective was to evaluate the influence of *Lutzomyia longipalpis* vector saliva on *Leishmania infantum chagasi* infection in the macrophage cell line RAW 264.7. To obtain saliva, sand flies were collected from rural areas of Chapadinha County, province of Maranhão, Brasil, transported to the lab, sexed, and the non-blooded females placed in B.O.D. incubator at 27°C. The salivary glands were dissected out under sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution, sonicated, centrifuged and the supernatants collected and stored at -80°C. For the in vitro experiments, RAW 264.7 macrophages were cultivated in chamber slides and stimulated with saliva at three stages of infection: before, during and post *L. infantum chagasi* infection in a 10:1 parasite: macrophage ratio. Subsequently, the chamber slides were incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C, for 48 hours. Our findings showed that the saliva-stimulated cells before and during *L. infantum chagasi* infection showed the highest number of *Leishmania*-infected macrophages. It was observed that the saliva-stimulated macrophages produced high amount of nitric oxide at all stages of infection, expressly in the saliva-stimulated cells during *Leishmania* infection. Regarding the cytokine production, TNF- α was detected in the saliva-stimulated cells during and post *Leishmania* infection. However, the saliva-exposed macrophages produced more IL-6 before *Leishmania* infection than the other two stages. Furthermore, we show that saliva affects both *Leishmania* proliferation and infectivity. Therefore, saliva can modulate the immune response of macrophages and enhance *Leishmania* infection, crucial events for parasite survival.

Key-words: leishmaniasis; infection; immune response; modulation; sandfly



Promastigota de *Leishmania infantum chagasi*

Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um espectro de manifestações clínicas que se sucede desde úlceras cutâneas (leishmaniose cutânea), destruição total das mucosas do nariz, boca e garganta (leishmaniose mucocutânea) até a visceralização do parasito (leishmaniose visceral), frequentemente constituindo a forma mais grave da doença. A leishmaniose visceral (LV) possui menor incidência (de 200.000 a 400.000 novos casos anualmente) em relação à leishmaniose tegumentar americana (LTA) que atinge de 0,7 a 1,3 milhões de casos por ano, sendo esta a maior em números de casos pelo mundo, e, desse total, há entre 20.000 a 30.000 casos de morte anualmente (WHO, 2017).

O Brasil é um país endêmico para as leishmanioses segundo a Organização Mundial da Saúde. Apenas em 2015 foram 19.395 casos reportados de LTA e 3.289 de LV. O estado do Maranhão é o quarto com maior número de casos de LTA (539) e o primeiro em casos reportados de LV (1684) no Brasil (WHO, 2017).

O agente etiológico dessas enfermidades é transmitido durante o repasto sanguíneo realizado pela fêmea do flebotomíneo infectada. Sabe-se que a transmissão do protozoário do gênero *Leishmania*, ocorre durante o repasto sanguíneo realizado pelos vetores infectados através do inoculo do parasito juntamente com a saliva no tecido tegumentar do hospedeiro vertebrado (LESTINOVA et al., 2017).

A saliva do flebotomíneo possui proteínas que alteram a homeostase do sistema imune do mamífero. Possui ação vasodilatadora, anticoagulante, quimiotática e imunomoduladora, que resulta em uma modulação de leucócitos do hospedeiro para uma resposta suscetível ou resistente à infecção. Deste modo, dependendo do hospedeiro, do vetor e da espécie de *Leishmania* inoculada, podem-se obter diferentes respostas imunológicas nas leishmanioses (CARREGARO et al., 2013; FRANCESQUINI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

Camundongos pré-tratados com saliva de flebotomíneos apresentam aumento na produção de imunoglobulinas do tipo M (IgM) primordialmente, seguido pelo aumento na produção de imunoglobulinas do tipo G2a (IgG2a) e surgimento de linfócito B de memória (MARTÍN-MARTÍN et al., 2015), além do aumento dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, sugerindo uma resposta efetora contra *Leishmania*. Contudo, quando a saliva é simultaneamente injetada com o parasito, o que ocorre naturalmente

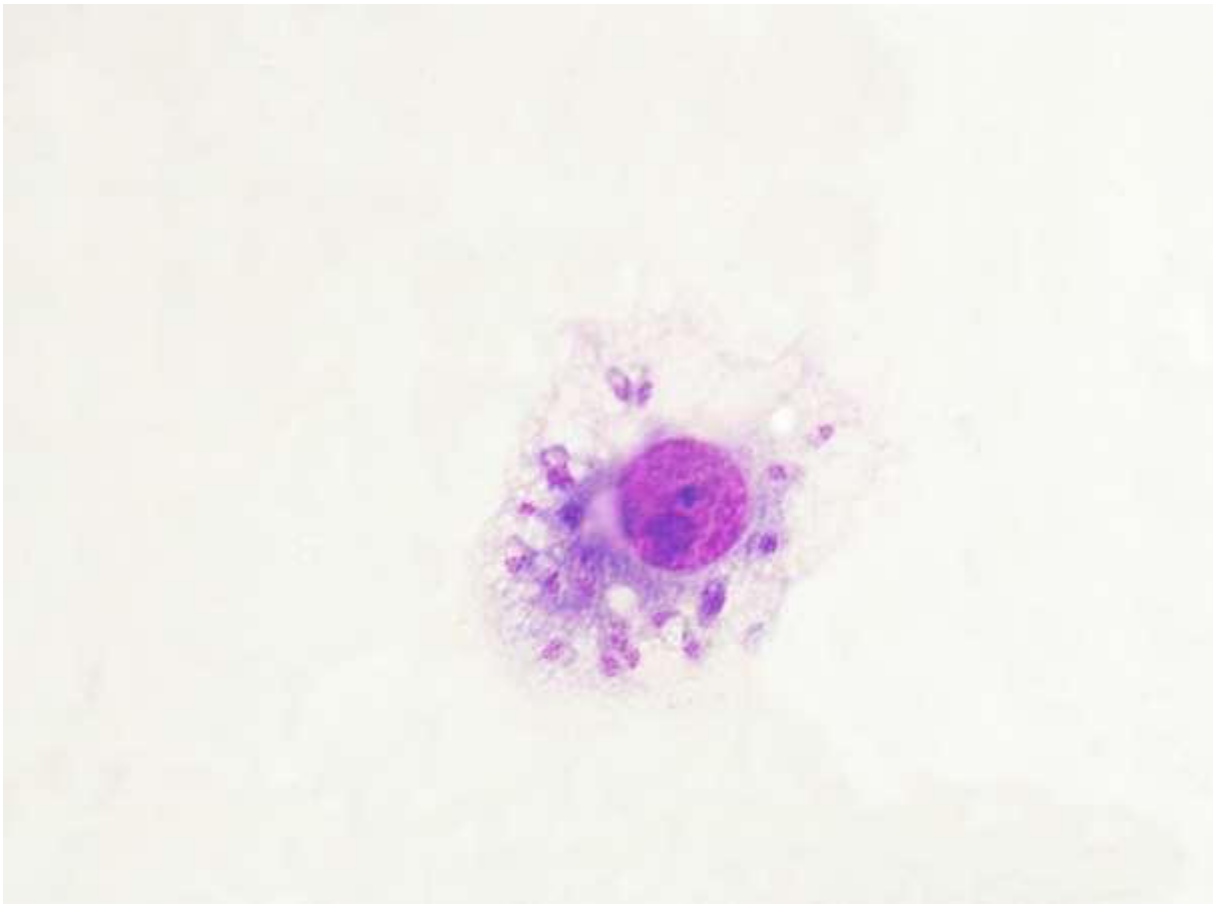
durante uma infecção em condições ambientais, nota-se a exacerbação da infecção, com aumento da carga parasitária e suscetibilidade do hospedeiro vertebrado, devido a este fato tal imunização não é totalmente eficiente (CARREGARO et al., 2013).

Nesse mesmo contexto, o pré tratamento com a saliva, sem infecção, inibe a quimiotaxia. Diminui a migração de neutrófilos, macrófagos, linfócitos B, TCD4⁺ e TCD8⁺ através do aumento na produção de interleucina do tipo 10 (IL10) ou 4 (IL4) em camundongos desafiados com ovalbumina (OVA), além de inibir a aptidão de apresentação de antígenos por células dendríticas (células apresentadoras de antígenos) para linfócitos CD4⁺, evidenciando uma resposta reguladora anti-inflamatória (CARREGARO et al., 2008).

Os estudos *in vitro* indicam que o estímulo da saliva de *Lu. longipalpis* mais *L. infantum chagasi* induz a apoptose de neutrófilos através da caspase mediada pelo Fas-Ligante (FasL). Nessas condições, os neutrófilos produzem CCL2/MCP-1 para recrutar monócitos e macrófagos para o sitio da infecção e assim exacerbar a infecção, através da fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados, evento associado à sobrevivência da *L. infantum chagasi* (PRATES et al., 2011).

Devido a esses fatos, é importante salientar que há prevalência de flebotomíneos em áreas endêmicas (para as leishmanioses) durante todo ano e seu contato com o homem e outros reservatórios domésticos é contínuo (SILVA, et al., 2012; FILHO et al., 2015; MORAES et al., 2015), ou seja, sempre haverá contato do homem ou animal doméstico com a saliva das espécies de flebotomíneos prevalentes naquele local, durante todo ano e independente da situação do mamífero (infectado ou não). Além do mais, vários fatores estão relacionados à visceralização do parasito, como a infectividade da cepa e a influência do conteúdo salivar do vetor. Até mesmo o gel formado pelo parasito no esôfago do vetor possui propriedades que auxiliam na infecção (CAMPOS-PONCE et al., 2005).

Deste modo, apesar das pesquisas já existentes abordarem a influência da saliva na infecção, esses estudos não aplicaram os estímulos em diferentes momentos a infecção em ambiente *in vitro*. Por conseguinte, este trabalho busca contribuir com esses achados, esclarecendo a interação do vetor, hospedeiro e parasito da LV, visto que, a saliva do flebotomíneo possa gerar alguma resposta imunológica antes, durante e após infecção.



Macrófago (RAW 264.7) estimulado com saliva de *Lutzomyia longipalpis* 4 horas antes da infecção por *Leishmania infantum chagasi*.

Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas que variam desde a leishmaniose tegumentar, que acomete a pele e mucosas do indivíduo infectado, até a leishmaniose visceral, onde ocorre a visceralização do parasito no hospedeiro vertebrado, constituindo assim a forma letal da doença. Esta enfermidade está presente em vários países pelo mundo, ocorrendo em continentes como: Ásia, Europa, África e Américas (Figura 1), com número de casos variando de 1 a 1,5 milhões de casos anuais. São consideradas uma das seis doenças infecciosas mais importantes do planeta (MS, 2010; MS 2014).

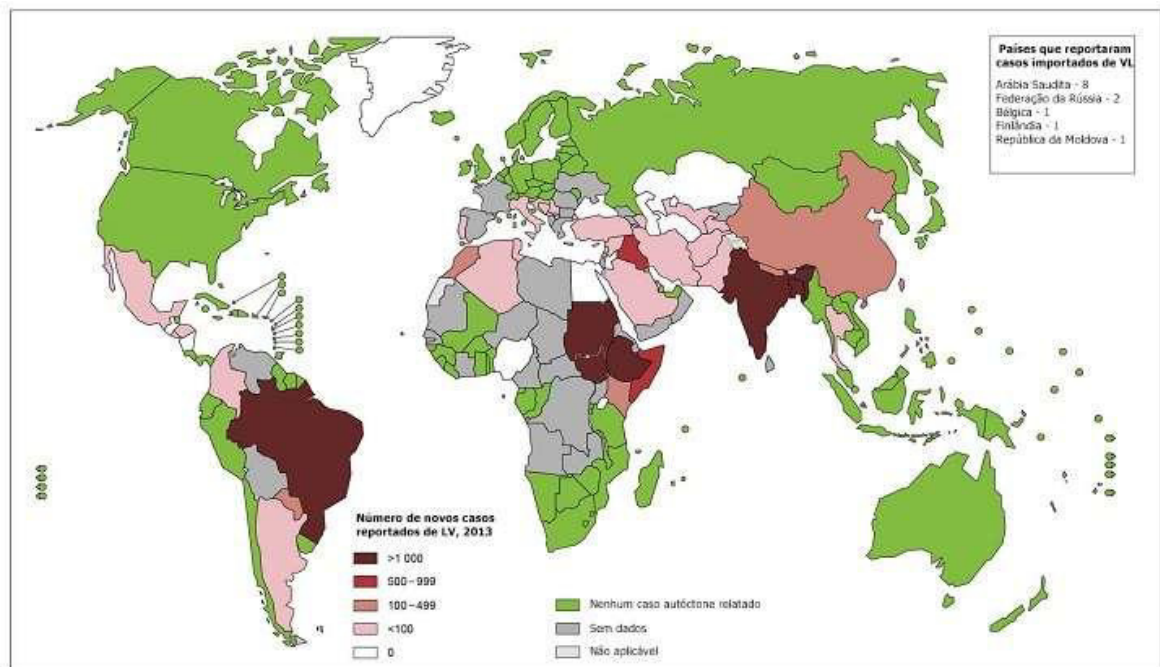


Figura 1. Mapa da situação epidemiológica da leishmaniose visceral no mundo em 2013.

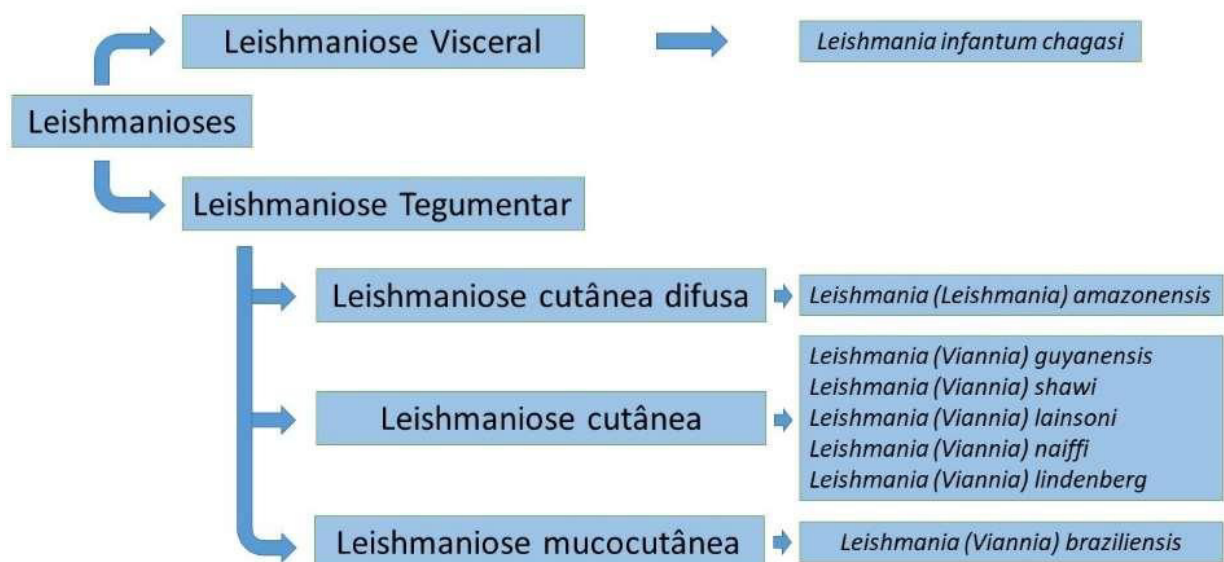
Fonte: modificada de WHO, 2017.

O Brasil, juntamente com Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul, compreenderam, em 2014, 90% dos casos de leishmanioses no globo. O Brasil é um país endêmico para as leishmanioses e apenas em 2015, apresentou 3.289 casos reportados para leishmaniose visceral (LV) e 19.395 casos de leishmaniose tegumentar (LT). O estado do Maranhão, por sua vez, apresentou 1.684 casos registrados de LT e 539 casos reportados de LV, destacando-se em primeiro lugar no número de casos reportados de LV no Brasil (WHO, 2017).

O estado do Maranhão possui características favoráveis para a proliferação da doença, como a presença de vetores. Estudos realizados por Silva et al. (2015; 2016), que capturaram e identificaram várias espécies de flebotomíneos, dentre as espécies capturadas, alguns apresentam importância médica como: *Nyssomyia whitmani*, vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*, e *Bichromomyia flaviscutellata*, vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ambos agentes etiológicos causadores da LTA. Outro vetor capturado foi *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), responsável pela transmissão do protozoário *Leishmania infantum chagasi* (Cunha; Chagas, 1937) causador da LV (MS, 2010; MS, 2014).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae. No mundo existem cerca de 21 espécies deste protozoário (WHO, 2017), enquanto no Brasil existem oito espécies que acometem o ser humano, sendo sete espécies causadoras da leishmaniose tegumentar e uma espécie causadora da leishmaniose visceral (Figura 2).

Figura 2. Espécies de *Leishmanias* relacionadas com as leishmanioses que ocorrem no Brasil.



Os aspectos clínicos da doença variam de acordo com a espécie do parasito. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causa a leishmaniose cutânea difusa, enquanto que *Leishmania (Viannia) braziliensis* causa a leishmaniose mucocutânea, a mais amplamente distribuída em território nacional. As outras espécies que existem no Brasil são *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*,

Leishmania (Viannia) lainsoni, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenberg* que causam a leishmaniose cutânea (MS, 2010; BRAZIL et al., 2015).

Apenas uma espécie causa a leishmaniose visceral no Brasil, *L. infantum chagasi*, resultando, frequentemente, em hepatoesplenomegalia devido à sua visceralização e, posteriormente, a morte do indivíduo infectado se não for devidamente tratada (MS, 2014, BRAZIL et al., 2015).

3.2 Ciclo de *Leishmania infantum chagasi*

Originalmente, o ciclo parasitológico das espécies de *Leishmania* é silvestre. Entretanto, com o desmantamento e a urbanização, o flebotomíneo vetor natural das leishmanioses invadiu o ambiente urbano e pré-adaptou-se ao ambiente peridomiciliar e doméstico (Figura 3). Devido a este fato, o parasito foi transmitido para animais domésticos (reservatórios) e para o ser humano. Tanto o homem quanto os animais domésticos não estão adaptados ao protozoário, como ocorre naturalmente com os animais silvestres, devido a isso, acabam por apresentar as manifestações clínicas, características destas doenças (MS, 2014).

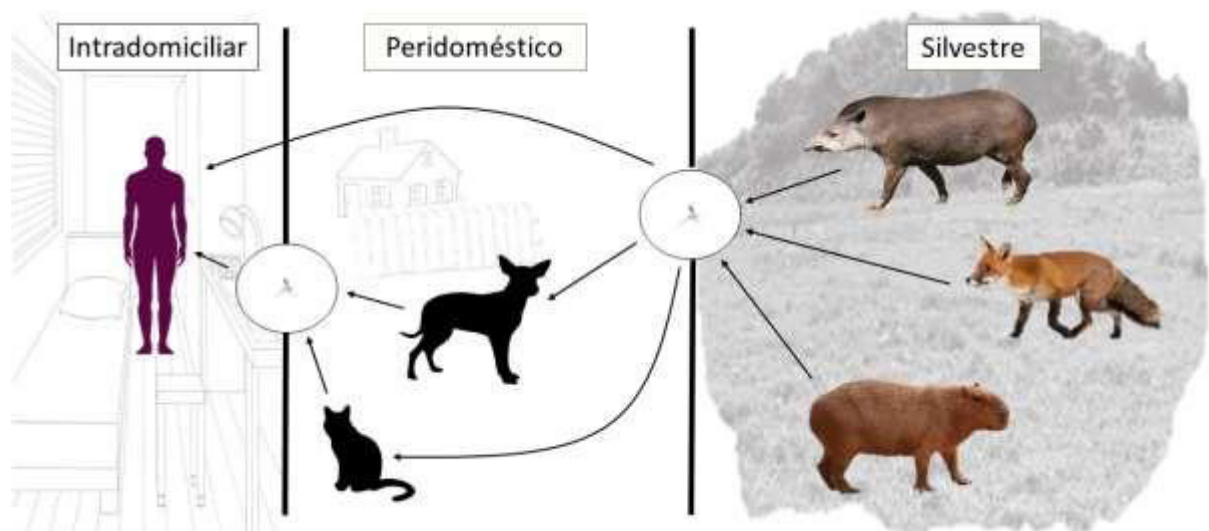


Figura 3. O ciclo de *Leishmania* em transição do ambiente silvestre ao ambiente peridoméstico e intradomiciliar.

Fonte: Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

Sabe-se que *L. infantum chagasi* é transmitida pela fêmea do flebotomíneo *Lu. longipalpis* durante o repasto sanguíneo. A primeira vez que se confirmou a

competência de *Lu. longipalpis* para a transmissão de *L. infantum chagasi* foi em 1977 por Lainson et al. (1977). Até então, apenas suspeitava-se da participação deste inseto no ciclo da LV em ambientes endêmicos (OLIVEIRA et al., 2017).

O parasito do gênero *Leishmania* possui um ciclo de vida heteroxênico (Figura 4), ou seja, uma parte do ciclo ocorre no mamífero e a outra parte no flebotômio. A infecção do mamífero acontece durante o repasto sanguíneo praticado pelos insetos infectados, que inoculam a promastigota metacíclica, forma infectante de *Leishmania*, no tegumento do hospedeiro vertebrado. Neste, o parasito (intracelular obrigatório) infecta leucócitos, como a célula dendrítica, neutrófilo e sobretudo o macrófago, a principal célula hospedeira (KAYE; SCOTT, 2011).

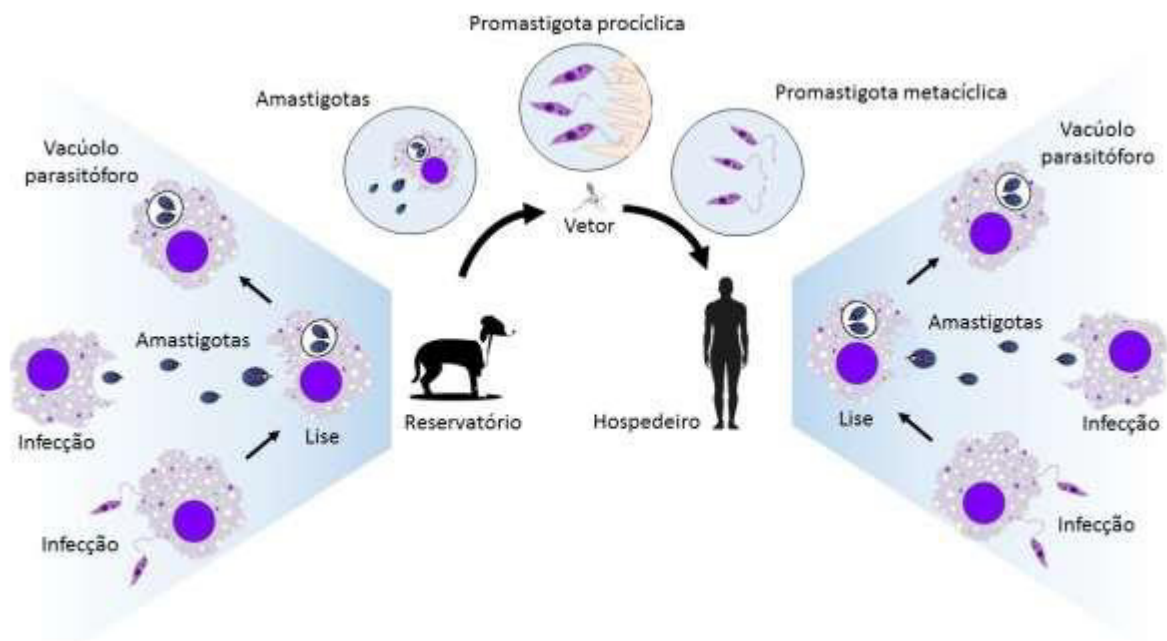


Figura 4. Ciclo de *Leishmania* no sistema fagocítico mononuclear. No reservatório canino, hospedeiro vertebrado e no sistema digestivo do flebotômio, vetor natural de *Leishmania*.
Fonte: Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

Entretanto, este parasito (*Leishmania*) tem a capacidade de infectar outros tipos celulares, até mesmo residentes como o fibroblasto, pois são células que apresentam baixa produção de óxido nítrico e, portanto, aumentam as chances de proliferação deste parasito durante a fase inicial da infecção, contando apenas com a tentativa de controle dos macrófagos residentes no conjuntivo (BOGDAN et al., 2000; KAYE; SCOTT, 2011).

No interior da célula hospedeira, ocorre a destruição de várias promastigotas, mas algumas sobrevivem induzindo a formação do vacúolo parasitóforo, e diferenciando-se em amastigotas. As amastigotas são ovoídes e resistentes a espécies reativas de oxigênio, e conseguem manipular a atividade oxidativa intracelular. A reprodução ocorre por divisão binária até o rompimento celular e liberação das formas amastigotas no meio extracelular para que outros fagócitos possam fagocitá-las e assim continuar o ciclo (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

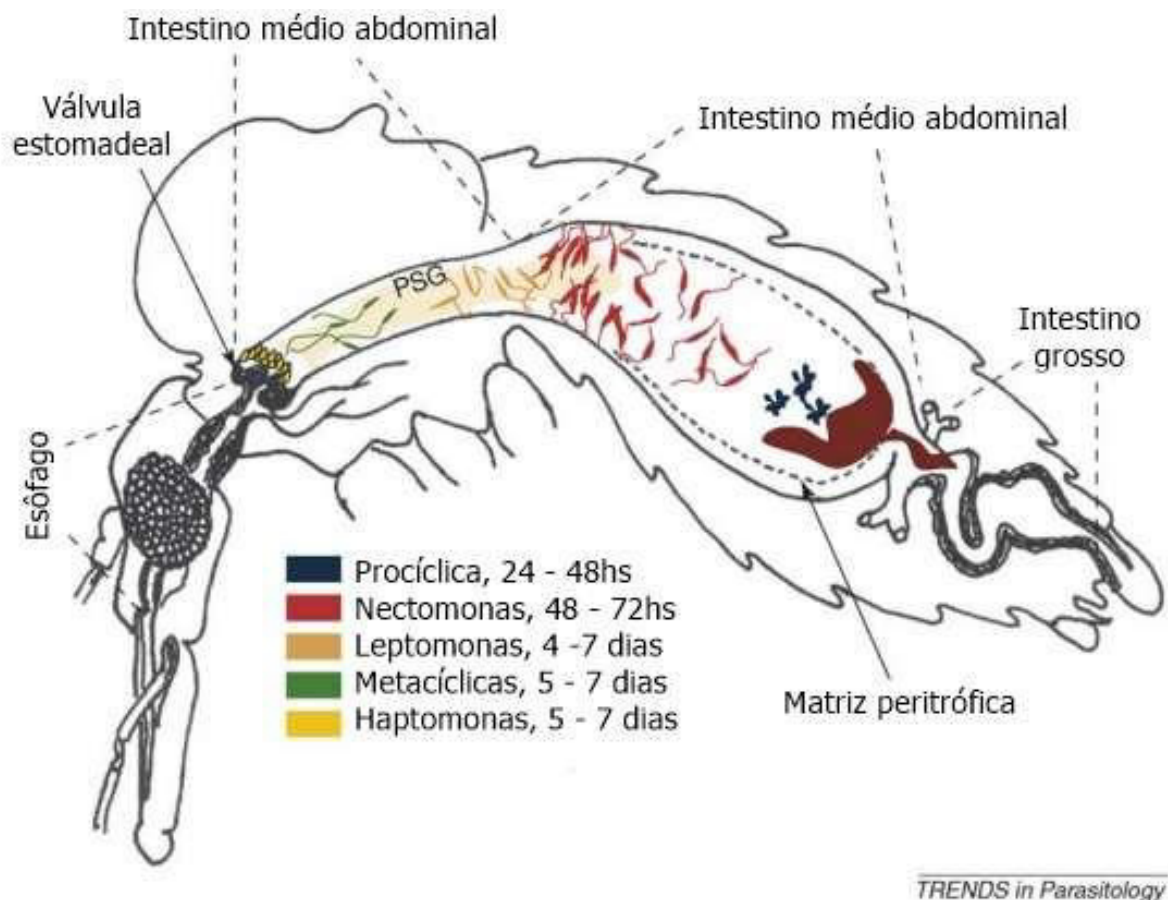


Figura 5. Ciclo de *Leishmania* no flebotomíneo. As diferenciações do parasito durante o estágio de vida no sistema digestivo do **hospedeiro invertebrado**.

Fonte: Kamhawi, 2006.

Dentro do macrófago, o parasito obtém proteção contra a ação do sistema complemento, e uma vez na circulação sanguínea consegue alcançar vísceras importantes para a infecção como baço e fígado. Vários fatores estão relacionados à visceralização do parasito, como a infectividade da cepa e a influência do conteúdo

salivar do vetor. Até mesmo o gel formado pelo parasito no esôfago do vetor possui propriedades que auxiliam na infecção (CAMPOS-PONCE et al., 2005).

Em seguida, durante o processo de hematofagia praticada pelo inseto no hospedeiro vertebrado já parasitado, ocorre a ingestão de células infectadas com *Leishmania* internalizada na forma amastigota. A prática da hematofagia realizada pela fêmea do flebotomíneo ocorre para auxiliar a maturação de seus ovos. Durante este processo acontece a inoculação da saliva na derme do hospedeiro vertebrado e, se o flebotomíneo estiver infectado, o parasito será inoculado concomitante à saliva (KILLICK-KENDRICK, 1999; HALADA et al., 2017).

No trato digestivo do vetor (Figura 5), especificamente no final do intestino médio, ocorre a lise celular dos fagócitos que liberam as formas amastigotas no interior da matriz peritrófica do inseto. Neste momento, ocorre uma baixa na viabilidade (cerca de 66%) e a diferenciação da forma amastigota para promastigota procíclica (comprimento corporal entre 6,5 a 11,5 μm), forma alongada, com flagelo pequeno, no entanto móvel. Então, ocorre diferenciação para a forma promastigota nectomona (comprimento corporal $\geq 12 \mu\text{m}$), forma em que libera quitinase no trato digestivo do inseto e assim consegue a ruptura da membrana peritrófica (ROGERS et al., 2002; KAMHAWI, 2006).

As promastigotas nectomonas diferenciam-se em leptomonas, com comprimento corporal entre 6,5 a 11,5 μm e flagelo maior que o corpo, passam pelo segundo ciclo de multiplicação, seguido pela migração para a válvula estomodeal e diferenciação para haptomonas formas curtas e imóveis que se fixam na válvula. Posteriormente se diferencia em promastigota metacíclica (comprimento corporal $\leq 8 \mu\text{m}$), forma com grande mobilidade e virulência devido ao corpo estreito e pequeno, entretanto com grande flagelo (ROGERS et al, 2002; KAMHAWI, 2006).

A promastigota haptomona bloqueia a válvula do estomodeu. Esta promastigota secreta a PSG (gel secretado pela promastigota) em seu esôfago e bloqueando a válvula do estomodeu, danificando-a. Embebido neste gel, as promastigotas haptomonas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas. No momento do repasto sanguíneo, o flebotomíneo encontrará dificuldade para ingerir o sangue, que

posteriormente é regurgitado juntamente com as formas promastigotas metacíclicas no tegumento do hospedeiro vertebrado (ROGERS et al., 2002; ROGERS, 2012).

3.3 Vetores naturais

Os vetores naturais das leishmanioses são os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), conhecidos vulgarmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, furrupa, cangalhinha, arrupiado e o conhecido flebótomo. Apesar de seu tamanho diminuto, de 1 a 3 mm, são de fácil identificação devido seu corpo coberto por finas cerdas de coloração castanho claro a escuro, seu hábito de voar em pequenos saltos e pousar característico de asas entre abertas em forma de lança (Figura 6). Os flebotomíneos estão pré-adaptando-se ao ambiente urbano, tanto no ambiente peridomiciliar como intradomiciliar, principalmente abrigos de animais como galinheiros, chiqueiro, canil entre outros, o que torna o problema da leishmaniose ainda mais acentuado (MS, 2014).



Figura 6. Fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *Leishmania infantum chagasi*.
Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Entomologia Médica (CCAA/UFMA).

Há cerca de 1000 espécies de flebotomíneos no mundo (BRASIL et al., 2015), porém apenas 30 espécies aproximadamente possuem importância médica, pois são competentes para transmitirem as espécies de *Leishmania* (WHO, 2017). O gênero *Phlebotomus* predomina nas regiões da Europa, Ásia, norte da África, Norte e centro da Península Arábica entre outras regiões desertas e semi-áridas, enquanto o gênero

Lutzomyia encontra-se no continente americano adaptados a ambientes de mata (ORYAN; AKBARI, 2016).

Atualmente, muitos pesquisadores estão utilizando a chave de identificação proposta por Galati (2003), em que os flebotomíneos não estariam no mesmo gênero, dividindo assim as espécies em vários outros gêneros. Contudo, outra chave que ainda é bastante utilizada também é a proposta por Young e Duncan (1994), em que as espécies de flebotomíneos das Américas são do mesmo gênero.

Esses insetos habitam solos ricos em matéria orgânica (lixo e fezes). Locais que geralmente apresentam essas características são tocas de animais, rachaduras em paredes, ambientes com alta temperatura e umidade (ORYAN; AKBARI, 2016).

Os flebotomíneos são holometábolos, e para a oviposição, as fêmeas precisam praticar a hematofagia para obtenção de proteínas sanguíneas, essenciais para a total maturação dos ovos, isso perdura de 4 a 8 dias. O período para oviposição depende das condições ambientais. Os ovos demoram de 7 a 10 dias para eclodir e dar origem a larva que irá se desenvolver no total de 4 estágios larvais denominadas de L1, L2, L3 e L4 no período de três semanas, seguido pela metamorfose em pupa e emergindo o adulto depois de 10 dias (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Em território nacional, os principais vetores competentes que participam do ciclo da leishmaniose tegumentar são *Bichromomyia flaviscutellata*; *Nyssomyia whitmani*; *Nyssomyia intermedia*; *Psychodopygus wellcomei*; *Psychodopygus complexus*; *Nyssomyia umbratilis*; *Migonemyia migonei* (Tabela 1). O principal vetor da leishmaniose visceral é *Lu. longipalpis* que tem ampla distribuição, pois adapta-se bem ao ambiente antrópico (MS, 2010; BRASIL et al., 2015). Mas no estado de Minas Gerais confirmou-se a competência vetorial de *Lu. cruzi* para o agente etiológico da LV, participando como vetor secundário (OLIVEIRA et al., 2017).

Tabela 1. As leishmanioses que ocorrem no Brasil. Relacionadas ao agente etiológico e aos vetores competentes.

AGENTE ETIOLÓGICO	LEISHMANIOSE	VETOR
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Cutânea difusa	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Mucocutânea	<i>Nyssomyia whitmani</i> <i>Nyssomyia intermedia</i> <i>Psychodopygus complexus</i> <i>Psychodopygus wellcomei</i>
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Cutânea	<i>Nyssomyia umbratilis</i>
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	Cutânea	<i>Nyssomyia whitmani</i>
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Cutânea	<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	Cutânea	<i>Psychodopygus ayrozai</i> <i>Psychodopygus paraensis</i> <i>Psychodopygus squamiventris</i>
<i>Leishmania (Viannia) lindenberg</i>	Cutânea	<i>Nyssomyia antunesi</i>
<i>Leishmania infantum chagasi</i>	Visceral	<i>Lutzomyia longipalpis</i> <i>Lutzomyia cruzi</i>

Fonte: confeccionada de acordo com dados oriundos de MS (2014), Brasil et al. (2015) e Oliveira et al. (2017).

3.4 Mecanismos de evasão de *Leishmania*

O parasito apresenta mecanismos que burlam o sistema imune, permitindo sua sobrevivência, no interior da célula hospedeira. Após a fagocitose de *Leishmania*, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo seguido pela diferenciação da forma promastigota metacíclica para a forma amastigota. Uma vez dentro do macrófago, o parasito obtém nutrientes para sua proliferação intracelular através de receptores de membrana como a metaloprotease GP63, que atrasam a fusão do fagolisossoma devido a clivagem da proteína Vamp 8, o que diminui a oxidação e o pH, devido a isso, aumenta a atividade proteolítica e consequentemente dificulta a expressão do MHC de classe I (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

A GP63 também é responsável por clivar a proteína de superfície celular denominada de sinaptotagmina (Syts) que regula negativamente a secreção de IL-6 e TNF, com a clivagem desta proteína ocasiona o aumento da secreção desta citocinas,

auxiliando na quimiotaxia de mais fagócitos inflamatórios. Multiplica-se então os parasitos por divisão binária até a lise da célula hospedeira ou até torná-la apoptótica, liberando as formas amastigotas no meio extracelular seguido pela infecção de outras células do sistema fagocítico mononuclear (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

As diferentes espécies de *Leishmania* possuem estratégias de sobrevivência para “evadir-se” das respostas imunológicas do hospedeiro durante a infecção. Frequentemente, utilizam-se dos receptores das células hospedeiras para conseguir infectá-las e proliferar pelo maior tempo possível. No caso da *L. infantum chagasi*, destacamos a utilização dos receptores LPG (Lipofosfoglicano) em sua superfície para se ligar ao receptor complemento três (CR3) e assim conseguir retardar a fusão do fagossoma com o lisossoma de 24 a 48 horas, promovendo a sobrevivência intracelular do parasito (UENO; WILSON, 2012; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

Geralmente, os macrófagos infectados aumentam a expressão de Fas-L e a produção de IL-6 e TNF- α , conduzindo para uma resposta pró-inflamatória e ao estresse celular (estresse oxidativo), intrigantemente aumentando a viabilidade e replicação do parasito intracelular (FILARDY et al., 2014; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Porém, quando o macrófago é estimulado por IFN- γ ocorre a resposta inflamatória via ativação da PKC (Proteína kinase C), resposta imune resistente a infecção, o que pode levar a destruição do parasito (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A elevada produção de IFN- γ pode está associada a piora clínica do hospedeiro. Aumento da carga parasitária e gravidade clínica foi relatado por Costa et al. (2013) em cães de áreas endêmicas com o aumento excessivo de IFN- γ no sangue periférico. Silva (2011) também observou aumento na produção de IFN- γ e consequentemente de NO no soro de cães proporcional a sua piora clínica. Portanto, o aumento na produção desta citocina inflamatória é um parâmetro que não pode ser, geralmente, considerado um fator de resistência. Devido a isso, a produção exarcebada deste metabólito (NO) possui efeito deletério e está associada com o acréscimo das manifestações clínicas do cão, devido a injúria tecidual causado pelo aumento da carga parasitária (FILARDY et al., 2014).

Macrófagos infectados com *Leishmania* produzem quimiocinas específicas para migração de macrófagos. As quimiocinas produzidas por macrófagos peritoniais infectados por *L. major*, onde a molécula sinalizadora JNK, constituinte da MAP quinase, auxilia na sinalização e ativação do fator de transcrição c-Jun, o que acaba na síntese de MCP-1/CCL2, MIP-1/CCL3 e aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras CD-80/CD-86 (FILARDY et al., 2014).

3.5 Interação saliva, *Leishmania* e sistema imune

A saliva é um fator crucial para infecção de *Leishmania*, devido a isso várias pesquisas foram desenvolvidas com intuito de descobrir os seus constituintes e suas respectivas ações. Ribeiro et al. (1986) iniciaram a pesquisa com saliva de flebotomíneos utilizando a espécie *Lu. longipalpis* verificando suas propriedades anticoagulantes, que inibem a agregação plaquetária e causam eritema, resultado da ação da enzima apyrase, presente na saliva de vários insetos hematófagos inclusive de *Lu. longipalpis*.

Titus e Ribeiro (1988) comprovaram que a coinoculação da saliva de *Lu. longipalpis* com *Leishmania major* ou *Leishmania amazonensis* aumentou a carga parasitária intracelular em macrófagos em relação ao controle, demonstrando que a saliva possui propriedades imunossupressoras. Testes com outras salivas de insetos hematófagos (*Aedes aegypti*, *Rhodnius prolixus*) e aracnídeo (*Ixodes dammini*) não demonstraram efeito na infecção por *L. major*, indicando que apenas a saliva do flebotomíneo, vetor competente de *Leishmania*, é capaz de desencadear resposta imune por macrófagos na leishmaniose.

No decorrer dos anos, observou-se que saliva de *Lu. longipalpis* auxilia na infecção de outras espécies de *Leishmania*, como demonstrado por Samuelson et al. (1991). A inoculação de *L. brasiliensis* em camundongos juntamente com a injeção de saliva de *Lu. Longipalpis* aumentava a infecção, com a presença de nódulos contendo macrófagos, linfócitos e neutrófilos, além do aumento da infecção nos linfonodos. Deste modo, a saliva possui ação moduladora do sistema imune durante o estágio inicial da infecção que influencia na evolução da doença.

Outros pesquisadores avaliaram ainda, se a saliva influenciaria diretamente na proliferação do parasito. Para isso, colocaram as espécies *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. major* e *L. donovani* em contato com a saliva de *Lu. Longipalpis* e notaram um efeito inibitório na proliferação da promastigota em ensaios *in vitro*. Neste mesmo experimento, os autores observaram que a espécie *L. infantum* apresentou resultado semelhante as espécies anteriores, entretanto esta cepa foi coletada em cães infectados naturalmente na cidade de Barcelona-Espanha (CHARLAB; RIBEIRO, 1993).

Adicionalmente, a exposição do parasito à saliva pode influenciar na metaciclogênese da promastigota no intestino do inseto. Uma vez que durante a infecção e estabelecimento do parasito no sistema digestivo do flebotomíneo ocorre espontaneamente a ingestão da saliva durante a alimentação do inseto, seja por hematofagia ou nectofagia, expondo a promastigota à saliva e auxiliando no seu desenvolvimento até a infecção (CHARLAB et al., 1995).

Portanto, observa-se que a saliva dos insetos vetores das leishmanioses possui propriedades únicas, que podem estimular tanto o sistema imune quanto o próprio parasito. Em ensaios realizados com coelhos sensibilizados de 4 a 8 semanas com saliva de flebotomíneo, a produção de IgG foi crescente e prevaleceu presente em altas concentrações no sangue periférico do animal durante 8 meses, ou seja, o sistema imune do mamífero desenvolveu uma resposta imune contra a saliva, que prioritariamente é o primeiro passo para imunização contra a leishmaniose, já que esta substância é inoculada juntamente com *Leishmania* durante a infecção natural (MARTÍN-MARTÍN et al., 2015).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a saliva pode potencializar a infecção pela *Leishmania*. Como demonstrado por COSTA et al. (2013), onde cães foram co-inoculados com *L. infantum chagasi* e saliva de *Lu. longipalpis*, foram descritas algumas peculiaridades durante o desenvolvimento da leishmaniose, demonstrando aumento nas concentrações de IgG total e IgG2 (correlacionado com a evolução da doença) e aumento progressivo de IFN- γ , embora o agravamento do quadro clínico tenha sido constante, provando que tais fatores que levariam a uma resposta imune

contra a leishmaniose não foram suficientes para destruir o parasito ou retardar a evolução da doença.

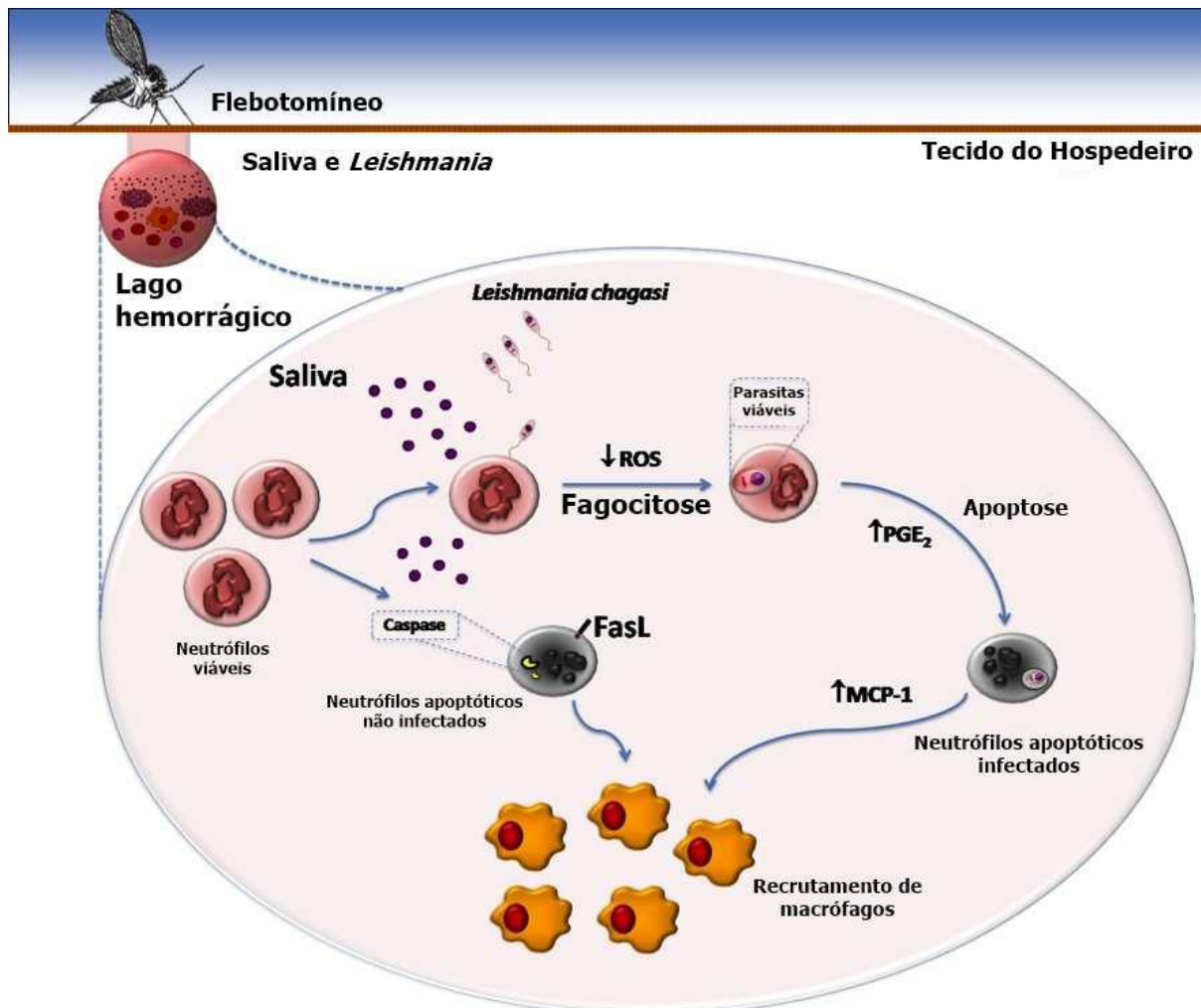


Figura 7. A ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* sobre neutrófilos e macrófagos durante o repasto sanguíneo.

Fonte: ilustração de Théo Araújo com base em resultados de Prates et al. (2011).

A saliva tem capacidade de atuar em receptores de neutrófilos, para induzir a apoptose através da caspase via receptor fas, de forma que, consequentemente, estas células produzem quimiocinas (MCP-1/CCL2) que recrutam monócitos e macrófagos para o sítio da infecção e, com isso, fagocitam estas células apoptóticas infectadas e acabam por infectar estes macrófagos (Figura 7), perpetuando a infecção no hospedeiro vertebrado (PRATES et al., 2011).

Além disso, a saliva também pode evitar a ação do sistema complemento durante a resposta imune inata, inibindo a deposição da molécula C4 (complemento

4) e consequentemente a via clássica, evitando a lise do parasito coinoculado com a saliva, mas não inibe a ação de outras proteínas importantes para coagulação como C1s (FERREIRA et al., 2016), justamente para manter a conformação do *pool hemorrhagic* no conjuntivo do hospedeiro vertebrado, possibilitando a sucção do tecido sanguíneo pelo flebotomíneo.

Dentro dos vários aspectos citados anteriormente, a saliva também induz ao efeito protetor quando estimulado antes da infecção por *Leishmania*. Camundongos pré tratados com saliva de *Nyssomyia whitmani* aumentam a concentração de IgG e IFN- γ no sangue periférico, permanecendo semanas depois da imunização, resultando na falha do desenvolvimento das lesões na infecção por *Leishmania braziliensis* (GOMES et al., 2016).

Em áreas endêmicas, pacientes negativos para leishmaniose cutânea (LC) apresentam IgG aumentada, indicando imunização pela presença do vetor não infectado. Entretanto, quando verificado a concentração de IgG em pacientes positivos para LC, estes apresentavam baixas concentrações desse anticorpo (GOMES et al., 2016), lembrando que nessas áreas sempre há prevalência de flebotomíneos, havendo alteração apenas da quantidade de algumas espécies da população destes insetos durante o ano (SILVA, et al., 2012; FILHO et al., 2015; MORAES et al., 2015), deste modo sempre haverá a exposição dos mamíferos de áreas endêmicas à saliva do flebotomíneo.

Pesquisas recentes determinaram que pacientes de áreas endêmicas prevalentes apresentaram altas concentrações de IgG anti-saliva de *Phlebotomus papatasi*, o que tende para uma resposta do tipo Th2 com produção de IL-10. Esta resposta os deixam susceptíveis à infecção pela *L. major*, diferentemente de pacientes que demonstraram maior resistência a infecção pelo parasito (KAMMOUN-REBAI et al., 2017).

Além disso, provou-se que animais infectados com *Leishmania*, expostos a picadas de flebotomíneos, aumentam a carga parasitária no sangue periférico. Isso resulta na maior transmissibilidade deste protozoário para o vetor, demonstrando que a saliva causa a piora clínica após infecção, aumentando a transmissibilidade e maior dispersão da doença (VALVERDE et al., 2017).

3.6 Principais proteínas da saliva de *Lutzomyia longipalpis*

A saliva do flebotomíneo possui várias substâncias com propriedades imunogênicas e que atuam durante a infecção. Vários estudos têm identificado e determinado que algumas delas interferem na homeostase do hospedeiro vertebrado, como o peptídeo denominado maxadilan, que é um potente vasodilatador que compõem a saliva de *Lu. longipalpis* responsável por aumentar o fluxo sanguíneo e facilitar a hematofagia (LESTINOVA et al., 2017).

Outra proteína é a LjM19, que possui propriedades imunogênicas na LV causada pela *L. infantum chagasi*. Induz a expressão da enzima iNOS mediada por macrófagos no baço e fígado de hamsteres, decorrente da produção de IFN- γ e TGF- β , o que consequentemente prolonga o período de vida desses animais por 5 meses, quando comparado com o grupo controle (KAMHAWI et al., 2015).

Já a LJM11 confere uma proteção mais efetiva para leishmaniose causada pela *L. major* em camundogos. Como resultado, esplenócitos produzem IFN- γ , o que leva a uma resposta imune do tipo Th1, resultando em menores lesões e menor carga parasitária (LESTINOVA et al., 2017).

Outras proteínas salivares de *Lu. longipalpis* utilizadas em pesquisas são LJM17 e LJL143, capazes de induzir a produção de IFN- γ e anticorpos IgG2a na infecção por *L. infantum chagasi* em cães (COLLIN et al., 2009; KAMHAWI et al., 2015). E recentemente outro componente proteico da saliva foi descoberto, denominado de proteína lufaxin tem ação anticoagulante, inibindo a produção de trombina e, portanto, a formação do coágulo de fibrina (LESTINOVA et al., 2017).

As moléculas isoladas da saliva dos flebotomíneos diferem da saliva total na resposta imunológica em mamíferos, como mostrado, algumas possuem propriedades imunogênicas contra as leishmanioses. A seleção de substâncias específicas de acordo com sua resposta imunológica pode definir proteínas como candidatas para pontencial vacina (LESTINOVA et al., 2017).



Flebotomíneo fêmea (*Psychodopygus*) ingurgitada.

Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Entomologia Médica (LEME / UFMA).

4 OBJETIVOS

Capítulo suprimido propositadamente por questões editoriais.



Par de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Entomologia Médica (LEME / UFMA).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo suprimido propositadamente por questões editoriais.

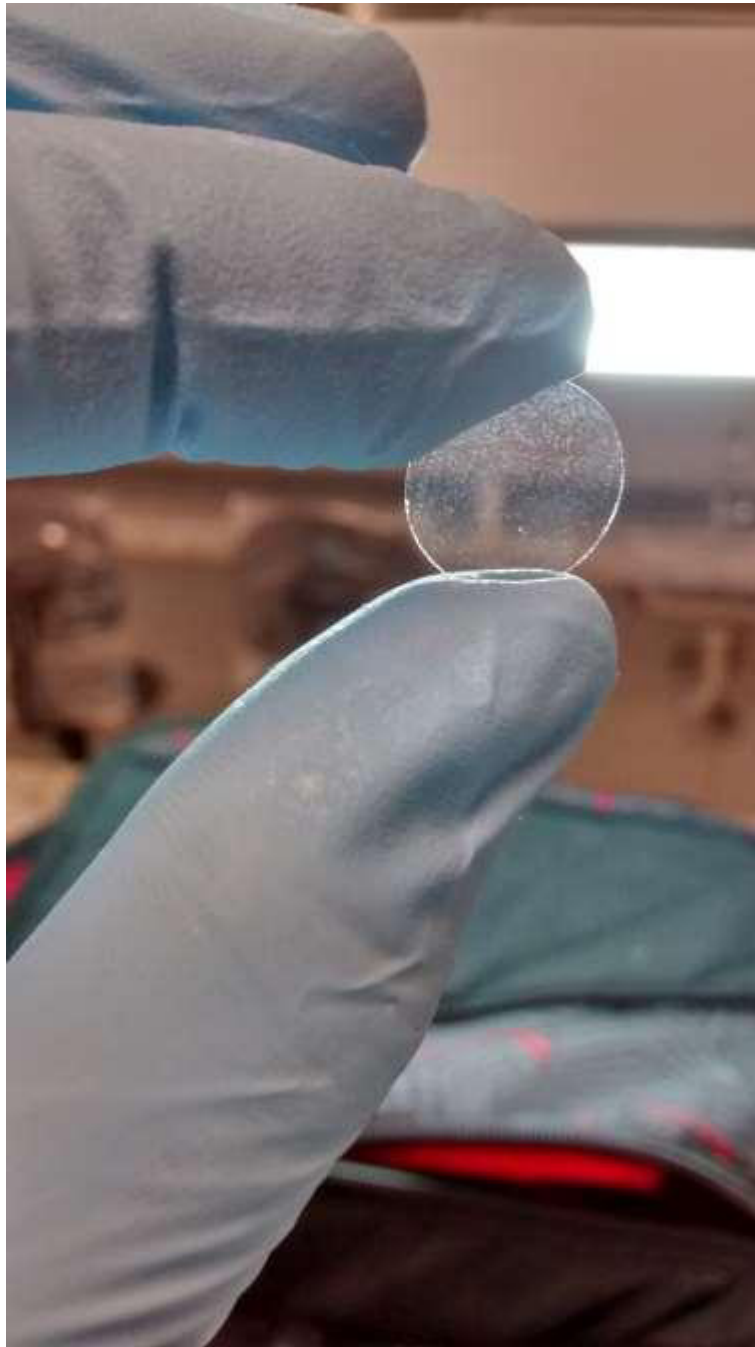


Flebotomíneos armazenados em potes.

Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Entomologia Médica (LEME / UFMA).

6 RESULTADOS

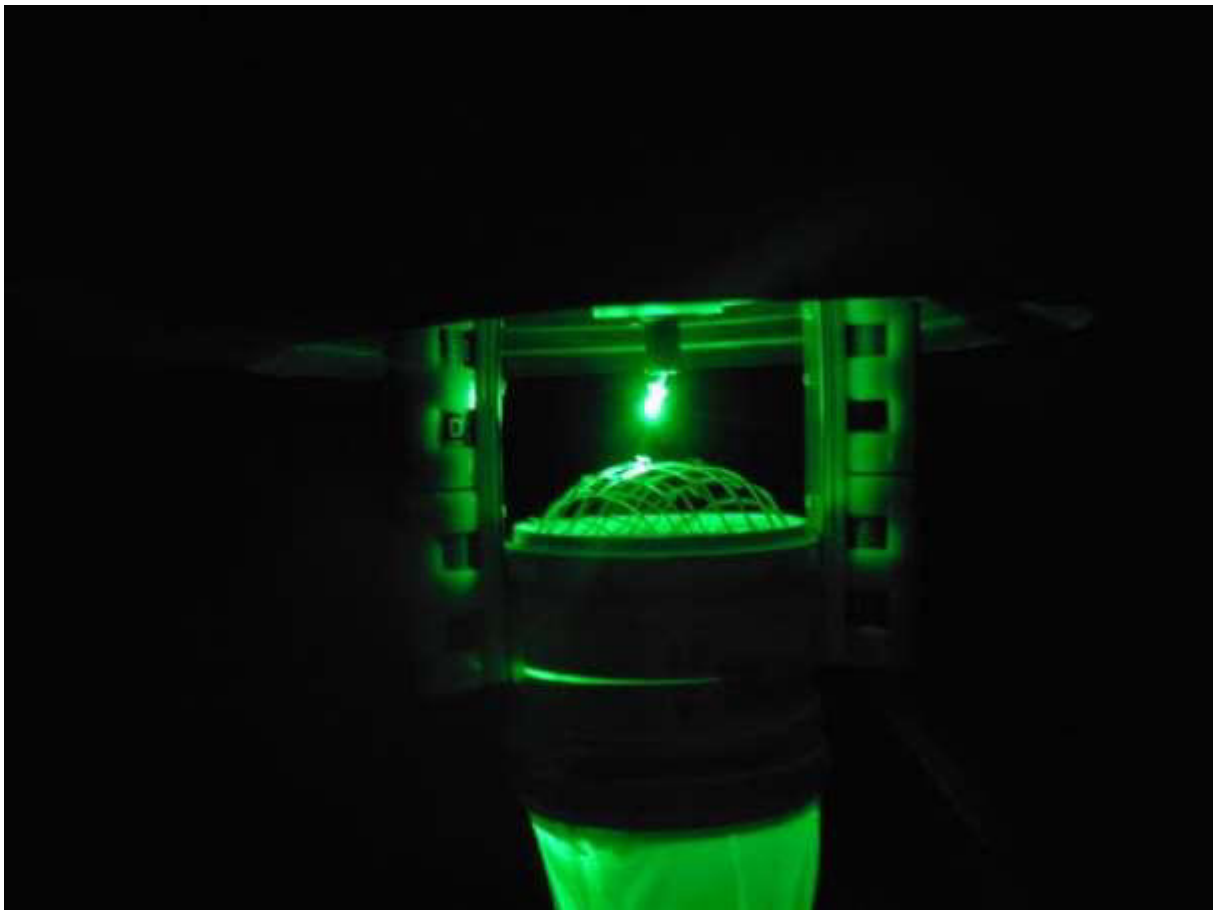
Capítulo suprimido propositadamente por questões editoriais.



Lamínula redonda (13mm) com macrófagos (RAW 264.7) aderidos.
Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

7 DISCUSSÃO

Capítulo suprimido propositadamente por questões editoriais.



Armadilha HP (Hoover Pugado) com LED (Light-emitting diode).
Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Entomologia Médica (LEME / UFMA).

8 CONCLUSÕES

Capítulo suprimido propositadamente por questões editoriais.

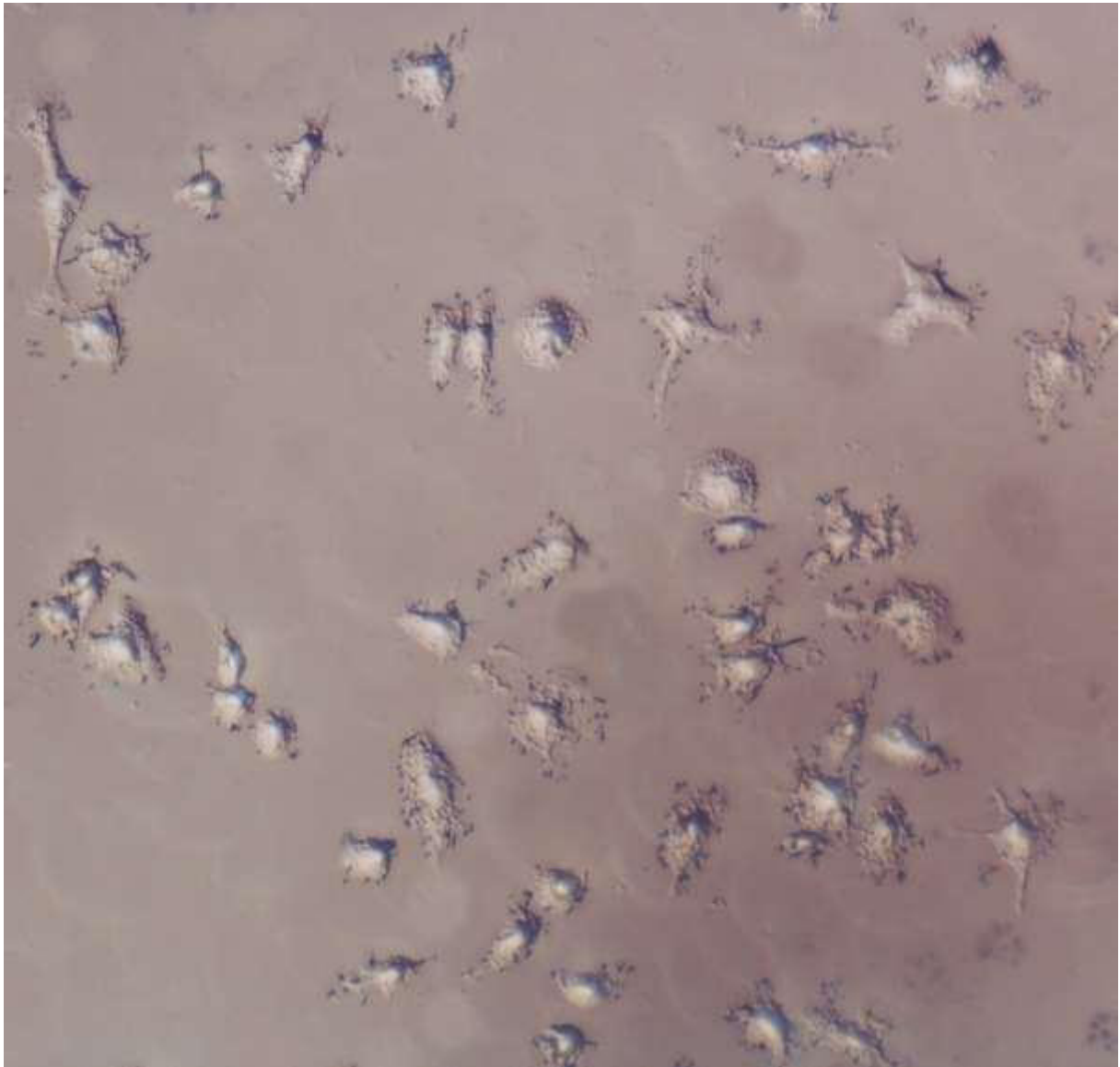


Imagem de contraste por interferência diferencial (DIC) de macrófagos (RAW 264.7).
Fonte: Imagem obtida no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / UFMA).

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; LUZ, R.A.I. DA; MAES L., COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 337 – 351, 2011.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M.G. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. **The journal of Experimental Medicine**, 2000.

BOGGIATTO, P.M.; BOGGIATTO, P.M.; GHOSH, F.J.M.; GIBSON-CORLEY, K.N.; Ramer-Tait, A.E.; JONES, D.E.; PETERSEN, C.A. Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP Kinase, ERK. **The American Journal of Pathology**, V. 174, N. 5, 2009.

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**, 2015.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R.D.C. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, 2005.

CARREGARO, V.; COSTA, D.L.; BRODSKYN, C.; Barral, A.M.; Barral-Netto, M.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiology**, v. 13, nº 102, 2013.

CARREGARO, V.; RIBEIRO, J.M.; VALENZUELA, J.G.; SOUZA-JÚNIOR, D.L.; COSTA, D.L.; OLIVEIRA, C.J.L.; SACRAMENTO, L.A.; NASCIMENTO, M.S.L.; MILANEZI, C.M.; CUNHA, F.Q.; Silva, J.S. Nucleosides present on phlebotomine saliva induce immunosuppression and promote the infection establishment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, nº 4, 2015.

CARREGARO, V.; SÁ-NUNES, A.; CUNHA, T.M.; GRESPAN, R.; OLIVEIRA, C.J.F.; LIMA-JUNIOR, D.S.; COSTA, D.L.; VERRI Jr., W.A.; MILANEZI, C.M.; PHAM, V.M.; BRAND, D.D.; VALENZUELA, J.G.; SILVA, J.S.; RIBEIRO, J.M.C.; CUNHA, F.O. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 4347 – 4359, 2011.

CARREGARO, V.; VALENZUELA, J.G.; CUNHA, T.M.; VERRI Jr., W.A.; GRESPAN, R.; MATSUMURA, G.; RIBEIRO, J.M.C.; ELNAIEM, D.E.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 104–114, doi: 10.1189/jlb.1107797, 2008.

CHARLAB, R.; RIBEIRO, J.M.C. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, 1993.

CHARLAB, R.; TESH, R.B.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M.C. *Leishmania amazonensis*: Sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 167-175, 1995.

COLLIN, N.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; CHENG, L.; LAUGHINGHOUSE, A.; WARD, J.M.; ELNAIEM, D.-E.; FISCHER, L.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI, S. Sand Fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLOS Pathogens**, 2009.

COSTA, D.J.; CARVALHO, R.M.A.; ABBEHUSEN, M.; TEIXEIRA, C.; PITOMBO, M.; TRIGO, J.; NASCIMENTO, F.; SILVA, L.A.; ABREU-SILVA, A.L.; CRUZ, M.S.P.; MIRANDA, J.C.; FUKUTANI, K.; OLIVEIRA, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, v. 8, 2013.

DING, A. H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.141, p. 2407-2412, 1988.

DUQUE, G.A.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 32-40, 2015.

FERREIRA, V. P.; VALE, V.F.; PANGBURN, M.K.; ABDELADHIM, M.; MENDES-SOUSA, A.F.; COUTINHO-ABREU, I.V.; RASOULI, M.; BRANDT, E.A.; MENESES, C.; LIMA, K.F.; ARAÚJO, R.N.; PEREIRA, M.H.; KOTSYFAKIS, M. OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; RIBEIRO, J.M.C.; GONTIJO, N.F.; COLLIN, N.; VALENZUELA, J.G. Salo, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific Reports**, 2016.

FILARDY, A.A.; COSTA-DA-SILVA, A.C.; KOELLER, C.M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; Lopes, M.F.; HEISE, N.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M.P.; REIS, G.A. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

FILHO, A.A.P.; BANDEIRA, M.C.A.; FONTELES, R.S.; MORAES, J.L.P.; LOPES, C.R.G.; MELO, M.N.; REBÊLO, J.M.M. An ecological study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the vicinity of Lençóis Maranhenses National Park, Maranhão, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 442, 2015.

FRANCESQUINI, F.C.; SILVEIRA, F.T.; PASSERO, L.F.D.; TOMOKANE, T.Y.; CARVALHO, A.K.; CORBETT, E.P.; LAURENTI, M.D. 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**, v. 95, p. 418–426, 2014.

FROMM, P.D.; KLING, J.C.; REMKE, A.; BOGDAN, C.; KORNER, H. Fatal Leishmaniasis in the Absence of TNF despite a strong Th1 response. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2016.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. 2003. Rangel, E. F.; Lainson, R. In: Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003. p. 23-175.

GALATI, E.A.B. Morfologia e taxonomia. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: E.F. RANGEL, R. LAINSON, **Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz**, Rio de Janeiro, p. 53-175, 2003.

GOMES, R.; CAVALCANTI, K.; TEIXEIRA, C.; CARVALHO, A.M.; MATTOS, P.S.; CRISTAL, J.R.; MUNIZ, A.C.; MIRANDA, J.A.C.; OLIVEIRA, C.; BARRAL, A. Immunity to *Lutzomyia whitmani* saliva protects against experimental *Leishmania braziliensis* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. **Frontiers in Immunology, Microbial Immunology**, v. 3, 2012.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **TRENDS in Parasitology**, 2006.

KAMHAWI, S.; ASLAN, H.; VALENZUELA, J.G. Vector saliva in vaccines for visceral leishmaniasis: a brief encounter of high consequence? **Frontiers in Public Health**, 2015.

KAMMOUN-REBAI, W.; BAHJ-JABER, N.; NAOUAR, I.; TOUMI, A.; SALAH, A. B.; LOUZIR, H.; MEDDEB-GARNAOUI, A. Human cellular and humoral immune responses to *Phlebotomus papatasi* salivary gland antigens in endemic areas differing in prevalence of *Leishmania major* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 2011.

KHOURI, R.; BÁFICA, A.; SILVA, M.P.P.; NORONHA, A.; KOLB, J.P.; WIETZERBIN, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; WEYENBERGH, J.V. IFN- β Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 2525–2531, 2009.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**, 1999.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, 1977.

LAURENTI, M.D.; SILVEIRA, V.M.S. SECUNDINO, N.F.C.; CORBETT, C.E.P.; PIMENTA, P.P.F. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology International**, v. 58, p. 220–226, 2009.

LESTINOVA, T.; ROHOUSOVA, I.; SIMA, M.; OLIVEIRA, C. I. DE; VOLFF, P. Insights into the sandfly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sandflies, hosts, and *Leishmania*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

LIMA JUNIOR, J.A.C.; COSTA, G.C.; REIS, A.S.; BEZERRA, J.L.; PATRÍCIO, F.J.B.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciências da Saúde**, v.16, n. 1, p. 46-53, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; MOTA, T.F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANJEIRA, D.F.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120 - 126, 2016.

MARTÍN-MARTÍN, I. MOLINA, R. JIMÉNEZ, M. Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits. **Plos one**, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. Acessado em: 23/03/2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. Acessado em: 23/03/2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/english>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vetor. In: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2ª ed. atualizada, 1ª impressão, Brasília-DF, p. 22-23, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vetor. In: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 1ª ed., 5ª reimpressão, Brasília-DF, p. 14-17, 2014.

MORAES, J.L.P.; SANTOS, C.L.C.; BASTOS, V.J.C.; PEREIRA, A.C.N.; MORAES, L.S.; MORAES, J.R.L.; COSTA, M.C.; REBÊLO, M.M. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em matas ciliares na transição entre a Amazônia úmida e o Nordeste semi-árido do Brasil. **Entomotropica**, v. 30, n. 3, p. 20-29, 2015.

OLIVEIRA, E.F.; OSHIRO, E.T.; FERNANDES, W.S.; MURAT, P.G.; MEDEIROS, M.J.; SOUZA, A.; OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.B. Experimental infection and

transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2016.

PATRÍCIO F.J.B. Atividade imunoestimulante e anti-*Leishmania* de *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz). **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.

PRATES, D.B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N.F.; ANDRADE, B.B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J.C.; BOZZA, P.T.; REIS, G.A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETO, M.; BORGES, V.M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, 2011.

PUGEDO, H.; BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C.; DIAS, E.S. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

RIBEIRO, J.M.C.; ROSSIGNOL, P.A.; SPIELMAN, A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1986.

ROGERS, M.E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, 2012.

ROGERS, M.E.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, 2002.

ROHOUŠOVÁ, I.; HOSTOMSKÁ, J.; VLKOVÁ, M.; KOBETS, T.; LIPOLDOVÁ, M.; VOLF, P. The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 481-485, 2011.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **The Journal of Experimental Medicine**, 1991.

SILVA F.S.; BRITO, J.M.; COSTA-NETA, B.M.C.; LOBO, S.E.P.D. Evaluation of light-emitting diode as attractant for sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2015.

SILVA JR., I.A.; MORATO, C.I.; QUIXABEIRA, V.B.L.; PEREIRA, L.I.A.; DORTA, M.L.; OLIVEIRA, M.A.P.; HORTA, M.F.; RIBEIRO-DIAS, F. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. **BioMed Research International**, 2015.

SILVA, F.S.; CARVALHO, L.P.C.; SOUZA, J.M. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área rural do nordeste do estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 3, p. 337-347, 2012.

SILVA, F.S.; GOMES, R.; PRATES, D.P.; MIRANDA, J.C.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in Balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 94–98, 2005.

SILVA, F.S.; SILVA, A. A. da; REBÊLO, J. M. M. An evaluation of light-emitting diode (led) traps at capturing phlebotomine sand flies (diptera: psychodidae) in a livestock area in Brazil, **Journal of Medical Entomology**, 2016.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais. Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. **SCIENCE**, 1988.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, 2012.

VALVERDE, J.G.; PAUN, A.; INBAR, E.; ROMANO, A.; LEWIS, M.; GHOSH, K.; SACKS, D. Increased transmissibility of *Leishmania donovani* from the mammalian host to vector sand flies after multiple exposures to sand fly bites. **The Journal of Infectious Diseases**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Clinical forms of the leishmaniasis. Acessado em: 15/04/2017. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory Data Repository. Acessado em: 22/01/2017. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Fact sheet N°375, Updated February 2015. Acessado em: 22/01/2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. Associate Publishers, Gainesville, 881 pp.

ZAKAI, H.A.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. 116, nº 309, 1998.