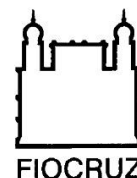




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DA SALIVA DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA* SOBRE O
RECRUTAMENTO CELULAR INDUZIDO POR *LEISHMANIA
BRAZILIENSIS***

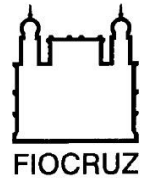
PAULO SÉRGIO DE MORAIS DA SILVEIRA MATTOS

Salvador – Bahia

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**EFEITOS DA SALIVA DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA* SOBRE O
RECRUTAMENTO CELULAR INDUZIDO POR *LEISHMANIA
BRAZILIENSIS***

PAULO SÉRGIO DE MORAIS DA SILVEIRA MATTOS

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Camila Indiani

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Patologia
Humana para obtenção de grau de
Mestre

Salvador - Bahia

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M444e Mattos, Paulo Sérgio de Morais da Silveira
Efeitos da saliva de *Lutzomyia intermedia* sobre o recrutamento celular induzido
por *Leishmania braziliensis* / Paulo Sérgio de Morais da Silveira Mattos. - 2017.
44 f.; 30 cm, il.

Orientadora: Dra. Camila Indiani. Laboratório de Imunoparasitologia.
Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia.
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz. 2017

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Saliva. 3. *Lutzomyia intermedia*. I.Título.

CDU 616.993.161:577.27

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para esse trabalho:

- A Dra. Camila Indiani por toda orientação, dedicação, paciência, perseverança e ensinamentos
- Ao Dr. Bruno Bezerril Andrade – pelo entusiasmo, exigência e disponibilidade em ensinar a citometria de fluxo multiparamétrica.
- Aos colegas Augusto Carvalho, Fabiana Celes, Rebecca Curvelo, Rohit Sharma, Sayonara Viana e Vinícius Costa por toda a colaboração e nos experimentos realizados.
- Aos companheiros do LIMI e LIP e a Dra. Aldina Barral por sempre proporcionar um ambiente exemplar para o trabalho.
- A Andrezza Miranda e Juliana Oliveira por todo o apoio de secretaria.
- Aos Professores do Curso de Patologia e às agências financiadoras CAPES e CNPq.
- À minha esposa, Adrielle Lima, mãe Joselice Morais, sogros e cunhados por todo incentivo, compreensão, carinho, superação e paciência.

MATTOS, Paulo Sérgio. Efeitos da saliva de *Lutzomyia intermedia* sobre o recrutamento celular induzido por *Leishmania braziliensis*. 44 p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

A saliva de flebotomíneos tem uma série de componentes farmacológicos e imunomoduladores, que podem promover uma imunidade contra a infecção por *Leishmania*. Neste trabalho, nós estudamos os efeitos da saliva de *Lutzomyia intermedia*, o principal vetor da *Leishmania braziliensis* no Brasil, no recrutamento celular induzido pela presença do parasita. Camundongos BALB/c foram inoculados com formas metacíclicas de *L. braziliensis* na presença ou não de sonicado de glândula salivar (SGS) de *Lu. intermedia*. Observamos que há um rápido recrutamento celular para o local da infecção, consistindo de diversos tipos celulares: macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células NK. Apesar de observarmos flutuações nas frequências celulares ao longo dos tempos avaliados (2,12, 24 e 72h), o tempo de 24h após a inoculação foi aquele no qual observamos um maior efeito do SGS. Nesse tempo, a frequência de macrófagos e de neutrófilos presentes na orelha foi significativamente maior na presença da saliva. Não observamos mudanças significativas na frequência das populações estudadas ao avaliarmos o linfonodo de drenagem. Em seguida, avaliamos o efeito da saliva de *Lu. intermedia* sobre os neutrófilos, especificamente. Por meio de ensaios *in vitro*, não observamos uma modulação positiva na taxa de infecção, na produção de superóxido ou na taxa de apoptose de neutrófilos quando os mesmos foram expostos a *L. braziliensis* + saliva de *Lu. intermedia*. Por fim, avaliamos os efeitos da saliva sobre o desenvolvimento da leishmaniose experimental. Animais co-inoculados com formas metacíclicas de *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia* apresentaram lesões similares aos animais controle. Também não observamos aumento na carga parasitária na orelha ou no linfonodo de drenagem na presença da saliva. Esses resultados sugerem que a saliva de *Lu. intermedia* modula o recrutamento inicial de leucócitos no sítio da infecção mas não altera o curso do desenvolvimento da doença, em modelo experimental de infecção por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Flebótomo, Saliva, Leishmaniose, *L. braziliensis*, *Lu. intermedia*, Recrutamento

MATTOS, Paulo Sérgio. Effects of *Lutzomyia intermedia* saliva on cell recruitment induced by *Leishmania braziliensis*. 44 p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Sand fly saliva has a number of pharmacological and immunomodulatory components that can promote immunity against *Leishmania* infection. In this work, we studied the effects of saliva from *Lutzomyia intermedia*, the main vector of *Leishmania braziliensis* in Brazil, in the cellular recruitment induced by the presence of the parasite. BALB/c mice were inoculated with metacyclic forms of *L. braziliensis* in the presence or absence of salivary gland sonicate (SGS) from *Lu. intermedia*. We observed a rapid cellular recruitment to the infection site, consisting of several cell types: macrophages, monocytes, dendritic cells, neutrophils and NK cells. Although we observed fluctuations in the cellular frequencies throughout the evaluated times (2, 12, 24 and 72h), the time of 24h after the inoculation was the one in which we observed a greater effect of the SGS. At that time, the frequency of macrophages and neutrophils present in the ear was significantly higher in the presence of saliva. We did not observe significant changes in the frequency of the populations studied when evaluating the draining lymph node. Next, we evaluated the effect of *Lu. intermedia* saliva on neutrophils, specifically. With the use of *in vitro* assays, we did not observe a positive modulation in the infection rate, superoxide production or in the neutrophil apoptosis rate when cells were exposed to *L. braziliensis* + *Lu. intermedia* saliva. Finally, we evaluated the effects of saliva on the development of experimental leishmaniasis. Animals co-inoculated with metacyclic forms of *L. braziliensis* + *Lu. intermedia* SGS showed similar lesions to those observed in control animals. We also did not observe an increase in the parasite load in the ear or in the drain lymph node, in the presence of saliva. These results suggest that the saliva of *Lu. intermedia* modulates the initial recruitment of leukocytes at the site of infection but does not alter the course of disease development in an experimental model of *L. braziliensis* infection.

Keywords: sand fly, saliva, leishmaniasis, *L. braziliensis*, *Lu. intermedia*, recruitment

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estratégia de análise das populações celulares recrutadas para o sítio da infecção.....p.17
- Figura 2. Cinética de recrutamento de leucócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.18
- Figura 3. Cinética de recrutamento de leucócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.19
- Figura 4 - Cinética de recrutamento de células dendríticas após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.20
- Figura 5 - Cinética de recrutamento de macrófagos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.21
- Figura 6. Cinética de recrutamento de monócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.22
- Figura 7. Cinética de recrutamento de neutrófilos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.23
- Figura 8. Cinética de recrutamento de células natural killer após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.....p.24
- Figura 9. Estratégia de análise das populações celulares recrutadas para o linfonodo de drenagem.....p.25
- Figura 10. Cinética de recrutamento celular no linfonodo drenante após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*.p.26
- Figura 11. Estratégia de análise de infecção e produção de superóxido por neutrófilos.p.27
- Figura 12. Efeitos da saliva de *Lu. intermedia* sobre neutrófilos murinos.....p.28
- Figura 13. Efeitos da saliva de *Lu. intermedia* sobre a apoptose de neutrófilos murinos.....p.30
- Figura 14. Avaliação do efeito da saliva de *Lutzomyia intermedia* sobre a infecção experimental por *Leishmania braziliensis*.....p.32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK - Solução para lise de hemácias
AUC – área sob a curva
BSA - Soro bovino albumina
BV – Brilliant Violet
CD - Grupo de diferenciação
CXCL - CXC quimiocina ligante
DCs – Células dendríticas
DHE - Dihidroetídio
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
FACS - Separação das células ativadas com fluorescência
GFP - proteína verde fluorescente
IFN- γ - Interferon gama
IL – Interleucina
Lb – *Leishmania braziliensis*
LC - Leishmaniose cutânea
LCD - Leishmaniose cutânea difusa
LD - Leishmaniose disseminada
LM - Leishmaniose mucosa
LT - Leishmaniose tegumentar
MFI – Índice médio de fluorescência
NK - Células matadoras naturais
NO - Óxido nítrico
PBS - Tampão-fosfato salina
PE - Ficoeritrina
PI – Iodeto de propídio
PerCP – Proteína clorofílica peridinina
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SGS - Sonicado de glândula salivar
Th1 - Células T auxiliaadoras do tipo I
Th2 - Células T auxiliaadoras do tipo 2
TNF - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 LEISHMANIOSE	8
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL	9
1.3 EFEITOS DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL...10	
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	13
3.2 CULTIVO DE PARASITAS	13
3.3 OBTENÇÃO DO SONICADO DE GLÂNDULA SALIVAR (SGS)	13
3.4 INFECÇÃO, MEDIDA DAS LESÕES E DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	15
3.5 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	15
3.6 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS	15
3.7 INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS	15
3.8 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO	16
3.9 MARCAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	16
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS	16
4.1 A SALIVA DE <i>Lutzomyia intermedia</i> MODULA O RECRUTAMENTO CELULAR INDUZIDO PELA <i>Leishmania braziliensis</i> NO SÍTIO DA INFECÇÃO.....	17
4.2 A CO-INOCULAÇÃO DA SALIVA DE <i>Lutzomyia intermedia</i> COM <i>Leishmania braziliensis</i> NÃO MODIFICA O RECRUTAMENTO CELULAR NO LINFONODO DRENANTE	25
4.3 INFECÇÃO E PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS COM A SALIVA DE <i>Lutzomyia intermedia</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	27
4.4 MORTE DE NEUTRÓFILOS APÓS ESTIMULAÇÃO COM SALIVA DE <i>Lu. Intermedia</i> e <i>L. braziliensis</i>	29
4.5 EFEITO DA SALIVA DE <i>Lutzomyia intermedia</i> SOBRE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Leishmania braziliensis</i>	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, existem cerca de 15 milhões de pessoas infectadas por *Leishmania* enquanto que 350 milhões vivem em áreas onde há risco de infecção (WHO, 2010). Em humanos, a leishmaniose se manifesta sob a forma tegumentar e visceral, sendo que estas formas clínicas são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. No Brasil, o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar (LT) é a *Leishmania braziliensis* e o principal agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) é a *Leishmania infantum*.

A LT apresenta quatro formas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) representa cerca de 90 a 95% dos casos de LT, caracteriza-se clinicamente pelo surgimento de uma pápula eritematosa, a qual se torna um nódulo, posteriormente, lesão(ões) ulcerada(s) de bordas elevadas com um fundo geralmente granuloso, nas partes expostas do corpo, incluindo o rosto, pescoço e braços (CHOI; LERNER, 2001; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GUIMARÃES et al., 2005). Algumas dessas lesões apresentam uma aparência verrucosa, semelhante a tuberculose verrucosa. Em 10% dos casos os pacientes desenvolvem linfadenopatia regional (BARRAL et al., 1992). Na LCL, o indivíduo apresenta uma histologia com parasitismo raro ou ausente, com a formação de um granuloma, a epiderme hiperplásica e reativo na Reação de *Montenegro* (BITTENCOURT, 2009). Dois a 5% dos pacientes com LCL podem progredir para leishmaniose mucosa (COSTA et al., 2009).

As leishmanioses são transmitidas ao hospedeiro vertebrado quando o inseto vetor (flebótomo) pertencentes, no Brasil, ao gênero *Lutzomyia* inocula, durante o repasto sanguíneo, as formas infectantes do parasita. Durante o repasto sanguíneo, os flebótomos inoculam na pele do hospedeiro vertebrado a sua saliva juntamente com as formas metacíclicas do parasita. A saliva dos flebótomos, assim como de outros insetos hematófagos, apresentam estratégias diferentes para o repasto sanguíneo de modo que nem todos os grupos formam o “lago sanguíneo”, como os flebotomíneo. Os componentes farmacológicos da saliva auxiliam o “feeding”, porém, a formação do “lago” é primeiramente decorrente da laceração tecidual pela curta probóscide dos flebotomíneos.

(CHARLAB et al., 1999; RIBEIRO et al., 1986). Entre os componentes da saliva estão inibidores de agregação plaquetária e vasodilatadores (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO, 1995). Na saliva de *Lutzomyia longipalpis*, o vetor da *L. infantum* no Brasil, já foram identificadas moléculas com atividade apirase, anti-coagulante, vasodilatadora e imunomoduladora (CHARLAB et al., 1999; SAMUELSON et al., 1991). No que diz respeito a saliva de *Lu. intermedia*, foram descritas enzimas como apirase, 5'-nucleotidase, endonuclease, adenosina desaminase, hialuronadase e glucosidase (DE MOURA et al., 2013).

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

A utilização de modelos experimentais murinos no estudo das leishmanioses tem proporcionado uma melhor compreensão da patologia da doença, onde se têm abordado com detalhes os mecanismos imunológicos envolvidos na infecção e a resposta induzida por alguns candidatos a vacinas.

O modelo da LCL utiliza camundongos infectados com *Leishmania major*, por via subcutânea e grande quantidade de parasitas (OLIVEIRA et al., 2000). Nesse modelo, as linhagens de camundongos C57BL/6, C3H e CBA são resistentes à infecção, controlam o processo inflamatório e a carga parasitária através do balanço da resposta Th1/Th2. Desta forma, esse perfil, está relacionado com a polarização Th1 e produção de IL-12 juntamente com IFN- γ , ativando os macrófagos e subsequentemente levando o parasita a morte através da produção de óxido nítrico (NO), desenvolvendo pequenas lesões com cura espontânea no local do inóculo. Nessas linhagens, este padrão de resistência está correlacionado com a participação de células T CD4⁺ do tipo Th1 com a produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Nas cepas de camundongos suscetíveis, como o BALB/c, por exemplo, ocorre uma polarização da resposta para Th2, com produção de IL-4.

Na infecção experimental por *L. braziliensis* por via de inoculação intradérmica, observamos a presença de lesões ulceradas e disseminação do parasita para os órgãos linfóides com cura espontânea da lesão (MOURA et al., 2005). Esta cura está associada a uma resposta imune celular do tipo Th1, com produção de IFN- γ , tanto por células T CD4⁺ quanto por células T CD8⁺ (MOURA et al., 2005).

1.3 EFEITOS DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL

Na tentativa de aprimorar o modelo animal de LCL, mimetizando o que ocorre na natureza no momento da transmissão do parasita, a adição da saliva do flebótomo tem se mostrado importante. Foi demonstrado que as proteínas da glândula salivar do vetor inoculadas juntamente com a *Leishmania* são importantes para o estabelecimento da infecção (TITUS; RIBEIRO, 1988). A inoculação de *L. major* mais o sonicado da glândula salivar (SGS) de *Lutzomyia longipalpis* (TITUS; RIBEIRO, 1988) ou de *Phlebotomus papatasi*, este último o vetor natural de *L. major* (BELKAID et al., 1998), na pata de camundongo exacerbou a infecção aumentando o tamanho da lesão e a quantidade de parasitas. Vários estudos demonstraram que as proteínas salivares, inoculadas juntamente com o parasita, modulam a resposta imune do hospedeiro vertebrado, promovendo a inibição da resposta imune celular protetora do tipo Th1. No caso da saliva de *P. papatasi*, isto ocorre através da diminuição da produção de IFN- γ , IL-2 e óxido nítrico (NO) (MBOW et al., 1998). A inoculação de *L. major* + SGS de *P. papatasi* promove o aumento de IL-4 e IL-5, citocinas associadas com a susceptibilidade à doença (BELKAID et al., 1998). Da mesma maneira, a adição da saliva de *Lu. longipalpis* na infecção por *L. amazonensis* estimula a produção de IL-10 e reduz a produção de IFN- γ (NORSWORTHY et al., 2004).

Na LCL experimental, a presença da saliva de *Lu. longipalpis* em camundongos BALB/c (LIMA et al., 1996; DONNELLY et al., 1998; SAMUELSON et al., 1991) e C3H/Hej (DONNELLY et al., 1998) infectados com *L. braziliensis* resultou na formação de lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos (LIMA et al., 1996; DONNELLY et al., 1998; SAMUELSON et al., 1991). Bezerra & Teixeira (2001) mostraram que a inoculação de SGS de *Lu. whitmani* aumentou a infectividade da *L. braziliensis* e a carga parasitária em camundongos BALB/c. Por último, a inoculação da saliva de *Lu. longipalpis* com *L. amazonensis* também levou a formação lesões maiores na orelha de camundongos dessa linhagem, as quais se desenvolveram rapidamente e apresentaram um número maior de parasitas (THIAKAKI et al., 2005).

Por outro lado, diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição do hospedeiro a saliva dos flebotomíneos resulta em uma resposta imune contra seus componentes. Esta resposta é ampla, abrangendo desde uma resposta humoral com a produção de anticorpos

específicos, até uma resposta celular com a produção de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) (VALENZUELA et al., 2001). Assim, ao mesmo tempo em que a saliva dos flebotomíneos exacerba a infecção pela *Leishmania*, a pré-exposição à saliva ou a picadas de flebotomíneos não-infectados resulta em redução da lesão a uma infecção subsequente: a pré-exposição de camundongos a picadas de *P. papatasi* ou a imunização com SGS deste mesmo vetor foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major* (BELKAID et al., 1998; KAMHAWI et al., 2000). Essa dicotomia do perfil imunogênico da pré-exposição com a saliva de flebotomíneos, refletiu em estudos que buscaram compreender quais as proteínas da saliva seriam os responsáveis em promover um efeito protetor ou exacerbador. Em relação ao vetor *P. papatasi*, a proteína SP15 foi capaz de proteger contra o desafio com *L. major* no modelo murino (VALENZUELA et al., 2001). De maneira similar ocorre quando os animais são vacinados com essa proteína, secretada pela *Leishmania tarentolae* em combinação com o CpG (KATEBI et al., 2015). Gomes e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína LJM19, presente no vetor *Lu. longipalpis*, foi capaz de induzir uma resposta protetora em hamsters contra o desafio com *L. infantum*. A proteína LJM11, também encontrada na saliva de *Lu. longipalpis* também induziu resposta protetora contra *L. major* (ABDALLAH et al., 2014). Camundongos expostos a picadas de *P. duboscqi*, outro vetor da *L. major*, foram capazes de controlar a infecção após o desafio com *P. duboscqi* infectado com *L. major*, demonstrando que a exposição às proteínas da saliva é capaz de induzir uma resposta protetora contra a leishmania (TEIXEIRA et al., 2014).

Nos estudos experimentais com *L. braziliensis*, foi demonstrado que a inoculação do SGS de *Lutzomyia intermedia*, o principal vetor dessa espécie no Brasil, não conferiu proteção frente à infecção por *L. braziliensis* (DE MOURA et al., 2007). Entretanto, o plasmídeo expressando a proteína salivar Linb-11 foi capaz de proteger contra a infecção com *L. braziliensis* mais SGS de *Lu. intermedia* (DE MOURA et al., 2013). Por outro lado, a pré exposição com a saliva de *L. whitmani*, também transmissor da *L. braziliensis*, foi capaz de proteger à infecção desse parasita (GOMES et al., 2016).

Diante dos estudos demonstrando os efeitos da saliva dos flebotomíneos na infecção por leishmania, assim como, a possibilidade de se induzir imunidade contra a leishmaniose por meio da pré-exposição com as proteínas salivares, investigamos nesse trabalho se a saliva de *Lu. intermedia* durante a infecção por *L. braziliensis* em camundongos é capaz de modular o recrutamento celular

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito da saliva da *Lutzomyia intermedia* sobre o perfil de recrutamento celular induzido pela *Leishmania braziliensis* em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de neutrófilos, monócitos, células dendríticas, macrófagos e células natural killer recrutadas para o local de infecção, na presença ou não de saliva de *Lu. intermedia*.
- Determinar o efeito da saliva sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos expostos a *L. braziliensis*

Determinar os efeitos da saliva de *Lu. intermedia* sobre o desenvolvimento da LCL experimental

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Camundongos BALB/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade foram obtidos do biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/ FIOCRUZ-BA). Os animais foram mantidos em condições apropriadas de temperatura, alimentação e livres de patógenos específicos. Os procedimentos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) do IGM/FIOCRUZ-BA (012/2016).

3.2 Cultivo de parasitas

A cepa de *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/01BA788) transgênica para a proteína verde fluorescente (GFP) foi cultivada em meio Schneider (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco, USA), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µl/ml (Gibco, EUA) a 26°C por 5 a 7 dias. Ao atingir a fase estacionária, os parasitas metacíclicos foram obtidos após a incubação com a lectina *Bauhinia purpurea* (50µg/mL) (Vector Laboratories), por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, os parasitas foram centrifugados a 40 × g para sedimentar os aglutinados. Os parasitas não aglutinados, foram centrifugados à 3000 rpm a 4°C e utilizados nos experimentos.

3.3 Obtenção do Sonicado de Glândula Salivar (SGS)

Os flebótomos foram capturadas da colônia em Corte de Pedra (Bahia) e foram identificadas como *Lu. intermedia* utilizando critérios morfológicos e a chave de identificação de Young & Ducan (1994). As fêmeas foram dissecadas para a obtenção das glândulas salivares, as quais foram mantidas a -70° C. Imediatamente antes do uso, as glândulas salivares foram sonicadas em tubos de 1.5ml e depois foram centrifugadas a 10.000 × g por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante (Sonicado de Glândula Salivar ou SGS) foi então utilizado em todos os experimentos.

3.4 Infecção, medida das lesões e determinação da carga parasitária

Camundongos BALB/c foram inoculados com promastigotas metacíclicos de *L. braziliensis* (10^5), na derme da orelha esquerda, em volume de 10 μ l, empregando-se uma agulha 27G. Os grupos consistiram de animais controle (inoculados com PBS), *Lb* (inoculados com 10^5 *L. braziliensis*), e *Lb*+SGS (inoculados com 10^5 *L. braziliensis* + SGS equivalente a 1 par de glândulas salivares). A evolução da lesão foi monitorada semanalmente pela mensuração da espessura da orelha, utilizando-se um paquímetro digital (Thomas Scientific). Para a determinação da carga parasitária na 6ª e 10ª semana após infecção, os animais foram eutanasiados e a orelha infectada e seu respectivo linfonodo drenante foram coletados. As orelhas foram lavadas com álcool 70% e os folhetos foram separados com auxílio de duas pinças esterilizadas. Os folhetos foram incubados com meio RPMI incompleto contendo 0.2mg/ml de Liberase (Roche), durante 2 horas à 37°C com 5% CO₂. A reação foi parada com a adição de 3ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Pen/Strep). Tanto os folhetos da orelha quanto o linfonodo de drenagem foram processados (separadamente) com o auxílio de um êmbolo de uma seringa de 5ml. As preparações foram filtradas em um *cell strainer* (40 μ m, BD Biosciences). O equivalente a 20 μ l deste homogeneizado foi diluído de forma seriada em meio de Schneider (INVITROGEN) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibióticos (Pen/Strep), em placas de 96 orifícios. O número de parasitas foi determinado a partir da diluição mais alta, nas quais as promastigotas foram observadas, até após duas semanas de incubação a 25°C.

3.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Após a obtenção das células da orelha e do linfonodo de drenagem, como descrito acima, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Pen/Strep). O número de células presentes foi determinado por coloração com Trypan blue e as células foram então marcadas com um coquetel contendo os seguintes anticorpos: anti-CD45 AF700 (eBioscience), anti-CD49b BV510 (BD), anti-F4/80 PE (BioLegend), anti-CD11b PECy7 (BioLegend); anti- Ly6G PECy5 (BioLegend), anti-Ly6C APC (eBioscience) e anti-CD11c BV421 (BioLegend) por 30 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Após a marcação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e marcadas com o Fixable Viability Dye (eFluor

780) (Ebioscience) por 20 minutos. As células foram novamente centrifugadas e foram ressuspendidas em tampão FACS (PBS suplementado com 1% soro bovino fetal. As amostras foram adquiridas no citômetro LSRFortessa e os dados foram analisados com o software Flow Jo.

3.6 Obtenção de neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos da medula óssea de camundongos e foram enriquecidos por separação magnética, empregando-se o kit de separação magnética de células anti-Ly6G (Miltenyi Biotec), seguindo as instruções dos fornecedores. Para tal, as células da medula óssea foram maceradas com auxílio de cadinho, em 1mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram centrifugadas a 461 x g por 5 minutos e foram ressuspendidas em 5mL de tampão de lise de hemácias ACK (0,83% NH₄Cl 0,15M, 0,1% KHCO₃ 1 mM, 0,04% Na₂ EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) e incubadas a 4°C. Após 4 minutos, foram adicionados 5mL de RPMI suplementado. As células foram filtradas com *cell strainer* de 40µm (BD Biosciences). Em seguida, as células foram marcadas com anti-Ly6G biotilado por 20 minutos a 4°C, lavadas em tampão MACS (0,5% BSA, 2mM EDTA em PBS 1X, pH 7,2) e incubadas com micropérolas magnéticas anti-biotina por 15 minutos na geladeira. Após nova lavagem, os neutrófilos foram submetidos à seleção magnética, empregando-se colunas LS. A coluna foi lavada com tampão MACS e as células Ly6G⁺, retidas à coluna, foram obtidas após a eluição com 5mL de tampão MACS. As células foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos, ressuspendidas em 1mL de RPMI completo e contadas para serem ajustadas para uso. O grau de pureza foi determinado por meio de microscopia ótica, empregando-se lâminas preparadas por citocentrifugação e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

3.7 Infecção de neutrófilos

Os neutrófilos (10⁶) foram infectados com *L. braziliensis*- GFP na presença ou não de SGS de *Lu. intermedia* na proporção de 2:1 (parasitas por célula). As células foram plaqueadas em placa de fundo chato (Nunc) e mantidas a 37°C a 5% de CO₂. A taxa de infecção dos neutrófilos foi determinada por citometria de fluxo.

3.8 Detecção da produção de superóxido

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Após 30 minutos de infecção as células foram centrifugadas a 461 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em PBS 1X e foram novamente centrifugadas. No escuro, a sonda Dihydroethidium (DHE) (Invitrogen) foi diluída em PBS 1x e utilizada na concentração final de 3 μ M. A placa contendo as células foi incubada por 30 minutos a 37°C/5% CO₂. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 461xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μ l/poço de PBS 1X, essa lavagem foi repetida mais uma vez. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 μ l/poço de tampão FACS. As células foram adquiridas no citômetro LSRFortessa e os dados foram analisados com o software Flow Jo.

3.9 Marcação de células apoptóticas

Os neutrófilos da medula óssea foram co-cultivados com *L. braziliensis GFP* metacíclica, como descrito acima, durante 18h. Os neutrófilos foram então marcados com PI (BD Biosciences). Como controle positivo, as células foram tratadas com radiação ultra violeta (UV) por 30 minutos. Ao término da marcação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão FACS. As células foram adquiridas no citômetro LSR Fortessa e os dados foram analisados com o software Flow Jo.

3.10 Análise Estatística

A significância das diferenças observadas foi calculada pelo teste Mann Whitney para comparação de dois grupos independentes e Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais grupos independentes usando GraphPad V. 6.0 (Prism Software, EUA) e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 A saliva de *Lutzomyia intermedia* modula o recrutamento celular induzido pela *Leishmania braziliensis* no sítio da infecção

Inicialmente, determinamos a estratégia de análise para caracterização das populações celulares recrutadas para o sítio da infecção. Nosso objetivo foi caracterizar quais populações celulares são recrutadas para o sítio de inoculação dos parasitas, na presença da saliva. As populações foram selecionadas dentro de *gates* feitos em *singlets, live*, CD45⁺. A partir daí, partimos para verificar a expressão de marcadores de superfície celular. Os monócitos foram caracterizados como Ly6C⁺Ly6G⁻, neutrófilos como CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺, macrófagos como CD11b⁺F4/80⁺, célula dendríticas como CD11b⁺ CD11c⁺ e células NK como CD49b⁺ (Figura 1).

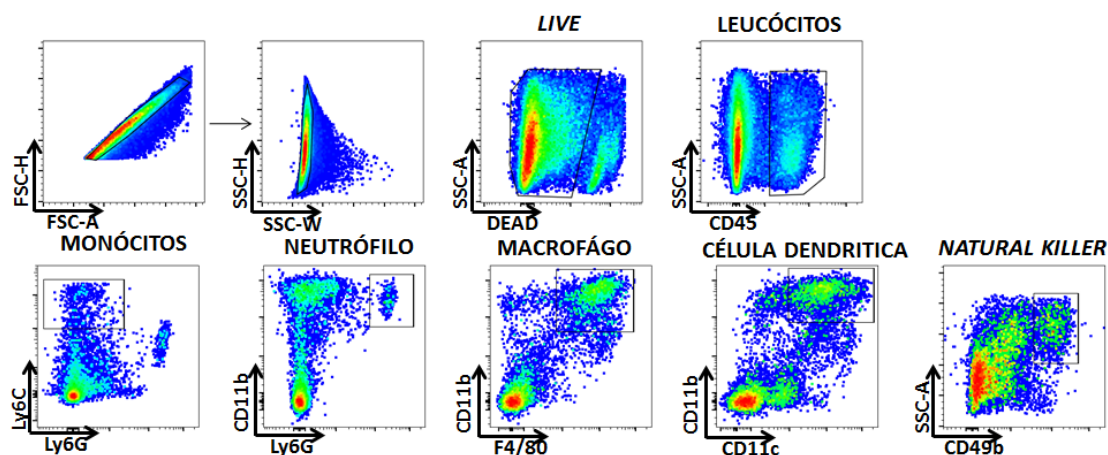


Figura 1. Estratégia de análise das populações celulares recrutadas para o sítio da infecção. Dot plots mostram as populações celulares de monócitos (Ly6C⁺Ly6G⁻), neutrófilos (CD11b⁺LY6G⁺), macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺), célula dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) e células NK (CD49b⁺), analisadas dentro de *singlets, live*, CD45⁺.

Uma vez definida a estratégia de análise, prosseguimos para avaliar a cinética de recrutamento celular para o sítio de inoculação da *L. braziliensis*. Analisamos o recrutamento nos seguintes tempos: 2, 12, 24 e 72 horas após inoculação de *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*. O grupo controle consistiu de animais inoculados com salina. Também avaliamos a presença de células na orelha de animais *naive*, os quais não receberam inóculo (Figura 2), nas orelhas *naive* (0 horas), foi possível detectar a presença de monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs) (Figura 2A, B e C), independente do estímulo aplicado (salina, parasitas ou parasitas + saliva). No

entanto, não observamos a presença de neutrófilos ou células NK (nesse momento). Conforme os estímulos foram aplicados (*L. braziliensis*, *Lb*) ou *Lb* +SGS (*L. braziliensis* + saliva de *Lu. intermedia*), observamos um aumento na frequência de todas as populações celulares avaliadas (Figura 2A, B e C), nos diferentes tempos. Além disso, quando avaliamos as áreas sob as curvas obtidas para cada população, vemos que a população celular com maior frequência de recrutamento foi a de macrófagos seguida de monócitos, DCs, neutrófilos e células NK (Figura 2D, E e F), independente do estímulo.

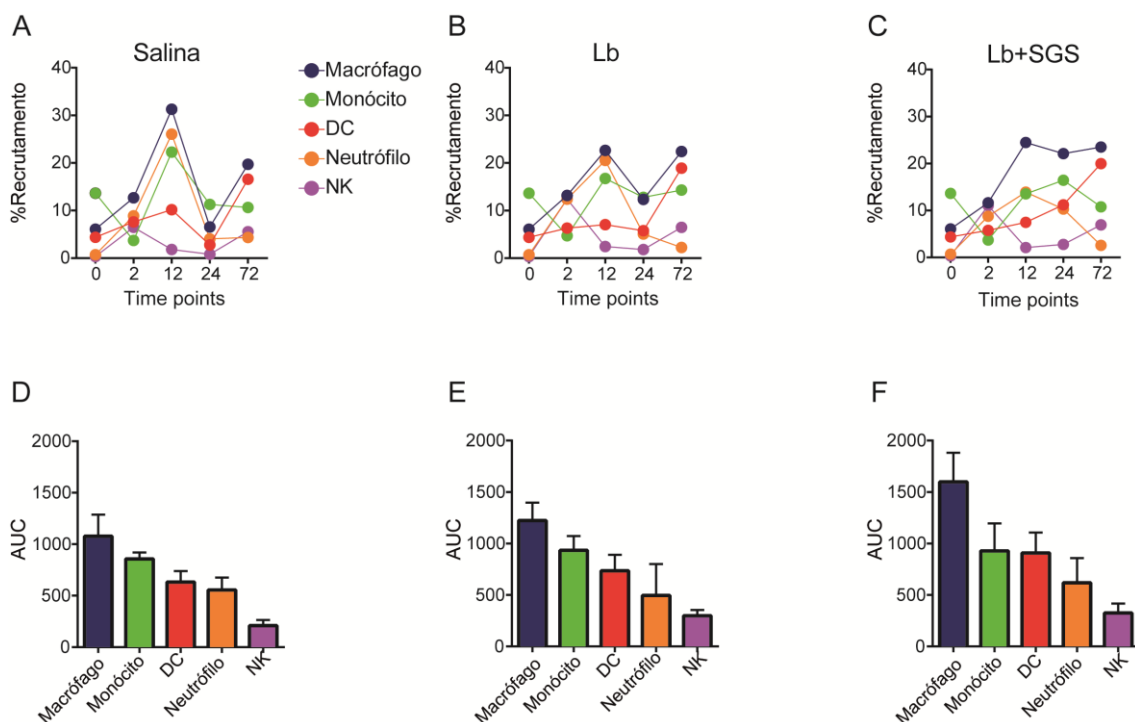


Figura 2. Cinética de recrutamento de leucócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* (10^5) ou *L. braziliensis* (10^5) + SGS (1 par). Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações celulares presentes na orelha de animais controle (A, D), inoculados com *L. braziliensis* (C, E) ou *L. braziliensis* + SGS (D, F) foram analisadas por citometria de fluxo, conforme estratégia de *gating*. Os dados mostrados são referentes a um experimento. (A, B, C) Os dados mostrados representam a frequência de células encontrada em cada tempo (D, E, F). Os dados mostrados representam área sob as curvas (AUC) mostradas em (A, B, C) e estão mostrados como média \pm SEM.

De fato, a co-inoculação *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia* aumentou de maneira significativa o recrutamento de macrófagos e de células dendríticas para a orelha dos animais (Figura 3), indicando uma modulação específica nessas populações. O mesmo efeito não foi observado nos monócitos, neutrófilos ou nas células NK.

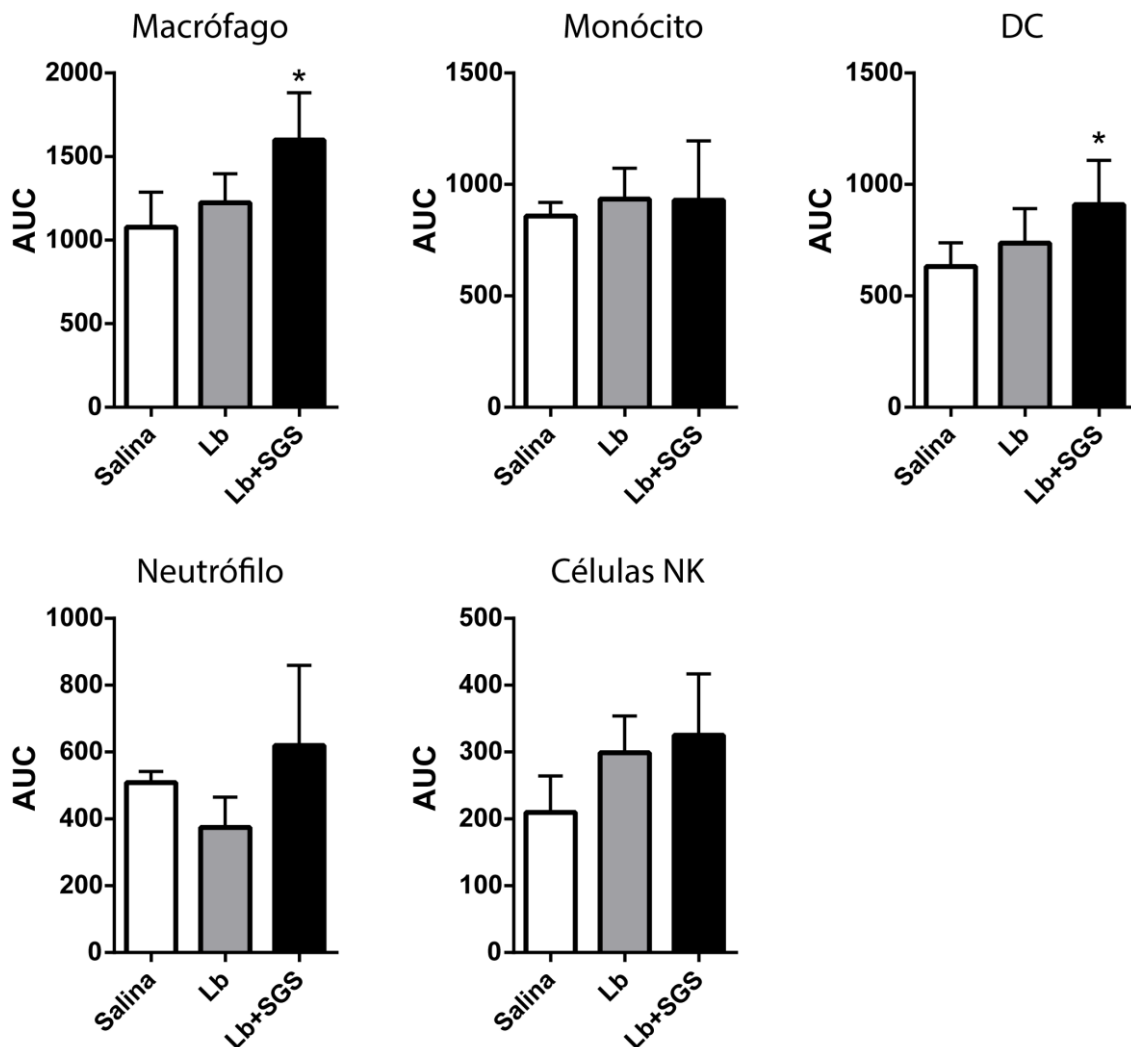


Figura 3. Diferença no recrutamento de leucócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações celulares presentes na orelha de animais controle, inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS foram analisadas por citometria de fluxo. As barras representam as comparações (Mann Whitney) das áreas sob a curva (AUC) obtidas para cada população celular e cada animal, durante o período avaliado. Os resultados mostram a média \pm SEM. * $p < 0,05$.

Com relação às DCs ($CD11b^+ CD11c^+$), observamos que a frequência dessas células é similar em 2 e 12 horas, após a inoculação dos diferentes estímulos (Figura 4A). No entanto, em 24h, há um aumento significativo na frequência dessas células, na presença da saliva de *Lu. intermedia* (*Lb* +SGS) (Figura 4A e B), comparado tanto com *Lb* somente quando comparado ao controle (salina). Esse resultado foi confirmado quando avaliamos o número absoluto de células presentes na orelha nesse mesmo tempo, 24h (Figura 4C). Após 72h, a frequência das DCs atingiu seu máximo, não havendo diferença entre os estímulos estudados (Figura 4A e C).

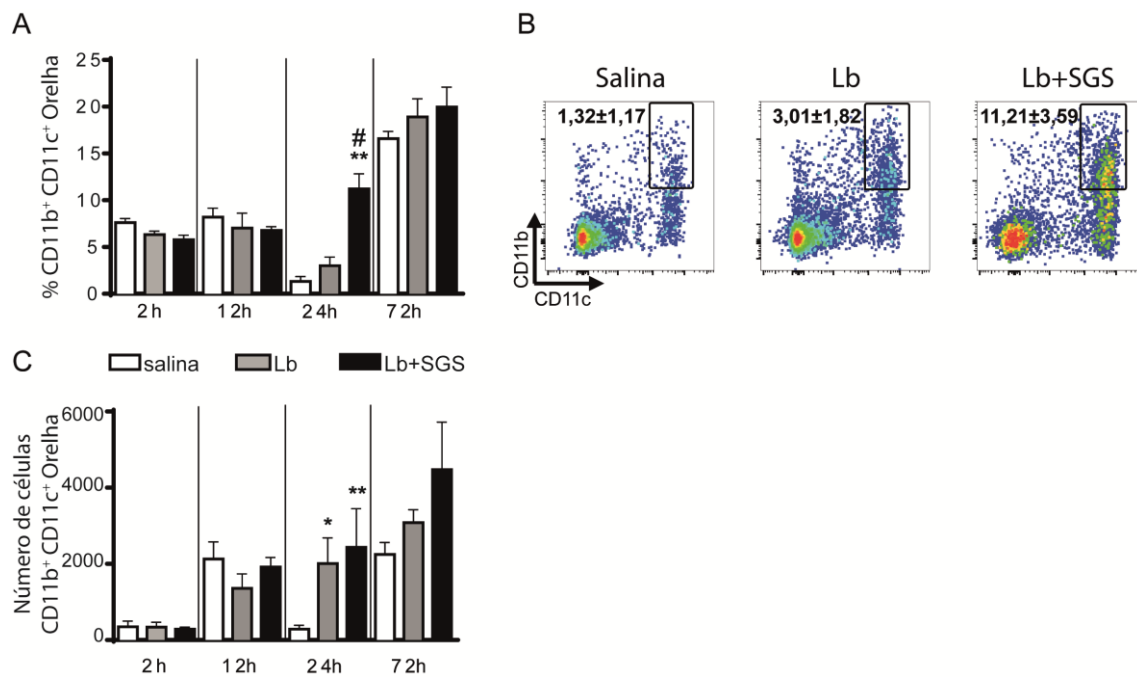


Figura 4 - Cinética de recrutamento de células dendríticas após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de células dendríticas ($CD11b^+ CD11c^+$) presentes na orelha foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células $CD11b^+ CD11c^+$ em diferentes tempos. (B) *Dot plots* representativos mostrando a frequência de células $CD11b^+ CD11c^+$ obtidas após 24h de estímulo. (C) Número total de células $CD11b^+ CD11c^+$ em diferentes tempos. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 orelhas por grupo e por tempo e estão mostrados como média \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *L. braziliensis* + SGS vs salina; # $p < 0,05$ entre os grupos *L. braziliensis* vs. *L. braziliensis* + SGS.

No que diz respeito aos macrófagos ($CD11b^+F4/80^+$), verificamos que a frequência é similar no tempo de 2 horas após inoculação dos diferentes estímulos, sendo o pico máximo de recrutamento observado no tempo de 12 horas (Figura 5A). Contudo com 24h, há persistência significativa dessas células na presença da *Lb*+SGS, comparado tanto com *Lb* somente quando comparado ao controle (salina) (Figura 5A e B). Esse resultado foi confirmado quando avaliamos o número absoluto de células presentes na orelha nesse mesmo tempo (24h) (Figura 5C). Um segundo aumento na frequência de macrófagos foi identificado no tempo de 72 horas (Figura 5A), sobretudo quando observamos o número de células presentes (Figura 5C).

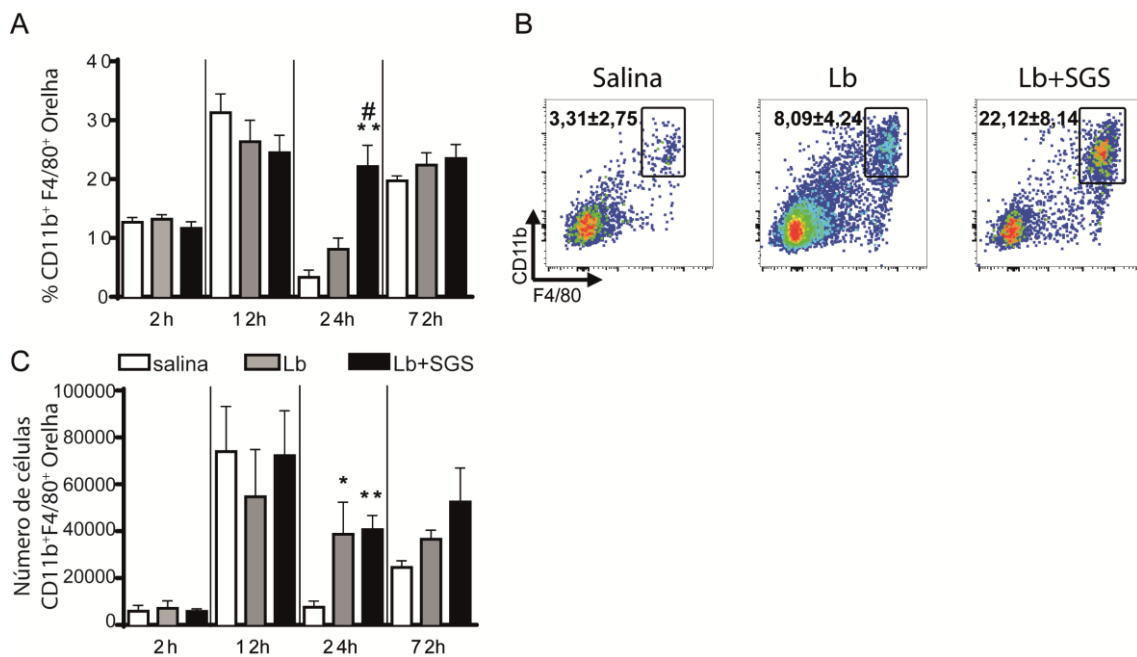


Figura 5 - Cinética de recrutamento de macrófagos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de macrófagos ($CD11b^+ F4/80^+$) presente na orelha foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células $CD11b^+ F4/80^+$ em diferentes tempos. (B) *Dot plots* representativos mostrando a frequência de células $CD11b^+ F4/80^+$ obtidas após 24h de estímulo. (C) Número total de células $CD11b^+ F4/80^+$ em diferentes tempos. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 orelhas por grupo e por tempo e estão mostrados como média \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *L. braziliensis* + SGS vs salina; # $p < 0,05$ entre os grupos *L. braziliensis* vs. *L. braziliensis* + SGS.

A frequência de monócitos ($\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$) foi semelhante no tempo de 2 horas, independente do estímulo utilizado. O pico máximo de recrutamento de monócitos ocorreu no tempo de 12h nos animais inoculados tanto com *Lb* quanto com *Lb* + SGS (Figura 6A e B), não havendo diferenças significativas entre os estímulos. No tempo de 72 horas, observamos uma leve redução tanto na frequência (Figura 6A) quanto no número de monócitos recrutados (Figura 6C).

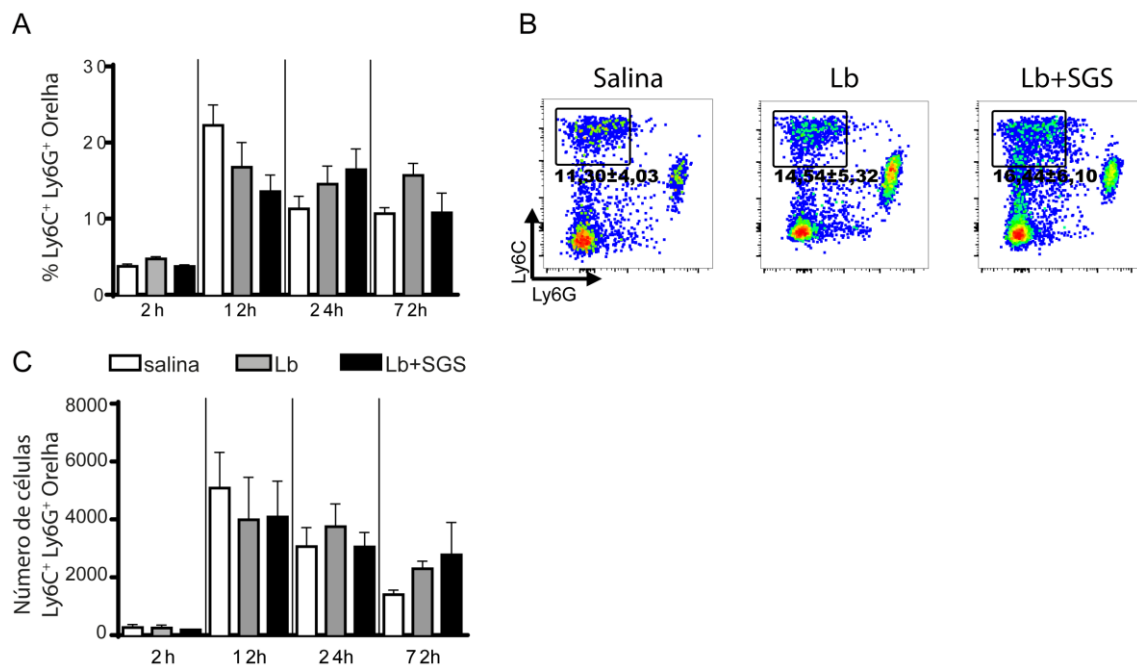


Figura 6. Cinética de recrutamento de monócitos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de monócitos ($\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$) presente na orelha foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células $\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$ em diferentes tempos. (B) *Dot plots* representativos mostrando a frequência de células $\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$ obtidas após 24h de estímulo. (C) Número total de células $\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$ em diferentes tempos. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 orelhas por grupo e por tempo e estão mostrados como média \pm SEM.

Com relação aos neutrófilos ($CD11b^+ Ly6G^+$) observamos que a frequência de recrutamento dessas células foi máxima no tempo de 12h após a inoculação e em 24 horas acontece um turnover dessas células, na presença de SGS (Figura 7A e B). Quando avaliamos o número absoluto de células presentes na orelha não encontramos diferença entre os tempos analisados e estímulos utilizados (Figura 7C).

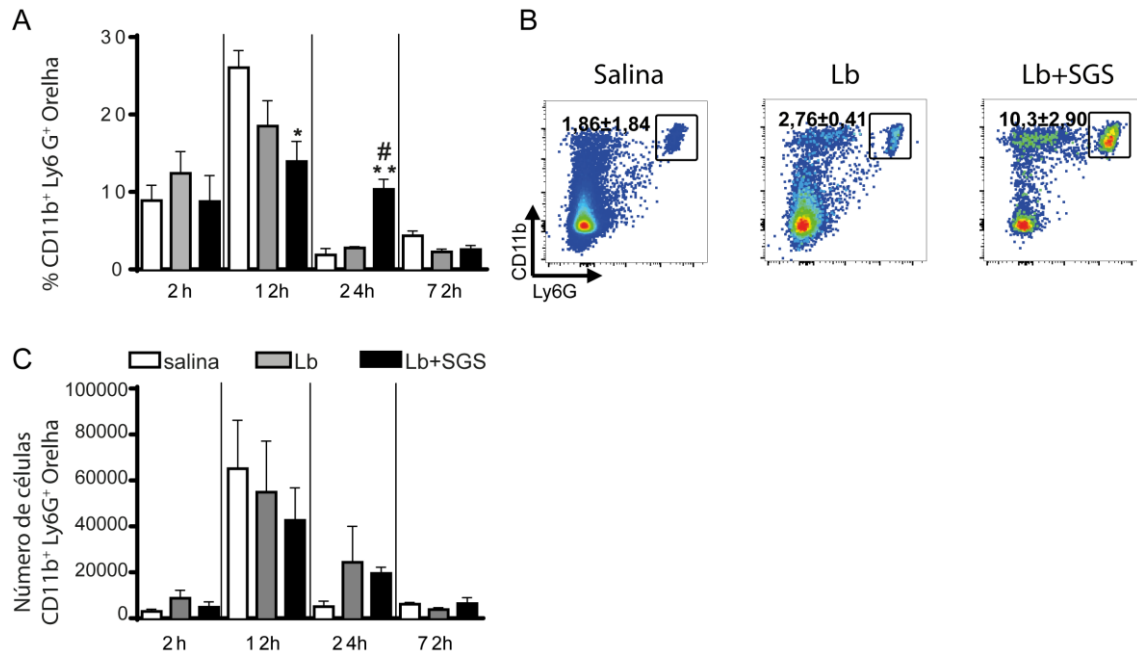


Figura 7. Cinética de recrutamento de neutrófilos após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de neutrófilos ($CD11b^+ Ly6G^+$) presente na orelha foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células $CD11b^+ Ly6G^+$ em diferentes tempos. (B) *Dot plots* representativos mostrando a frequência de células $CD11b^+ Ly6G^+$ obtidas após 24h de estímulo. (C) Número total de células $CD11b^+ Ly6G^+$ em diferentes tempos. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 orelhas por grupo e por tempo estão mostrados como média \pm SEM * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *L. braziliensis* + SGS vs salina; # $p < 0,05$ entre os grupos *L. braziliensis* vs. *L. braziliensis* + SGS.

Com relação às células NK ($CD49b^+$), observamos que a frequência dessas células, atingiu frequência máxima após 2 horas, sobretudo na presença de SGS (Figura 8A). No tempo de 12 horas, houve uma redução nessa frequência e com 24h houve um aumento significativo na presença de SGS comparado tanto com *Lb* somente quando comparado ao controle. (Figura 8A e B). Esse resultado foi confirmado quando avaliamos o número absoluto de células presentes na orelha nesse mesmo tempo, 24h (Figura 8C).

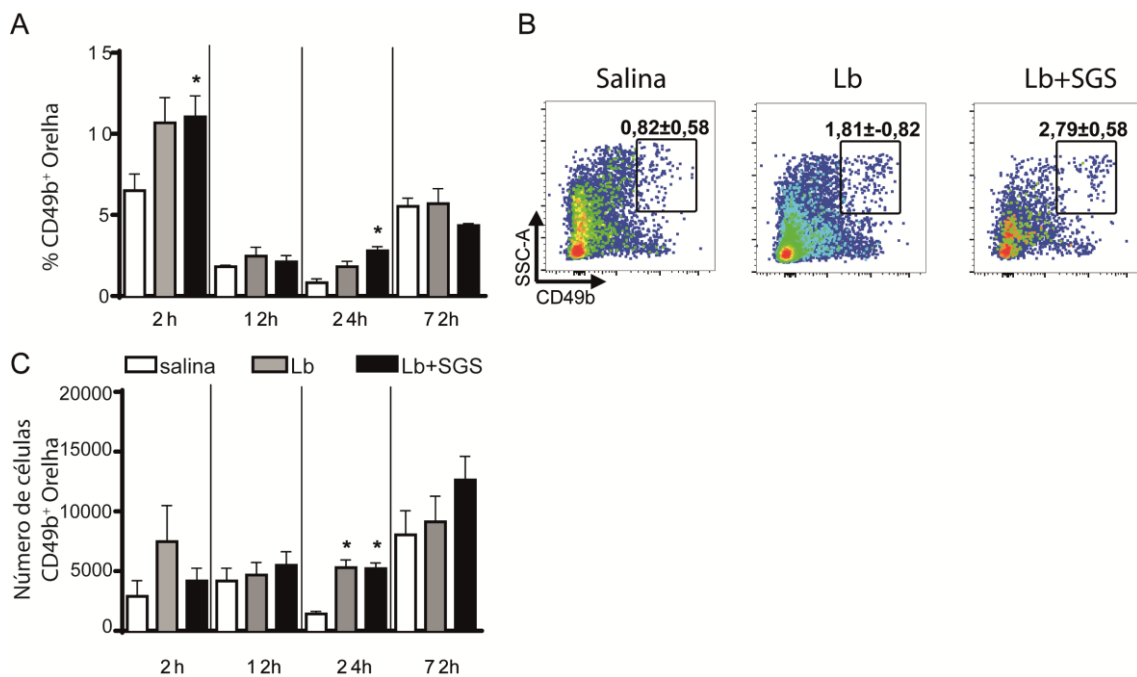


Figura 8. Cinética de recrutamento de células natural killer após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de células natural killer ($CD49b^+$) presente na orelha foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células $CD49b^+$ em diferentes tempos. (B) *Dot plots* representativos mostrando a frequência de células $CD49b^+$ obtidas após 24h de estímulo. (C) Número total de células $CD49b^+$ diferentes tempos. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 orelhas por grupo e por tempo e estão mostrados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ *L. braziliensis* + SGS vs salina

4.2 A co-inoculação da saliva de *Lutzomyia intermedia* com *Leishmania braziliensis* não modifica o recrutamento celular no linfonodo drenante

Em paralelo às avaliações realizadas na orelha dos animais, verificamos também as células recrutadas para o linfonodo drenante. Para isso, os animais foram estimulados como descrito anteriormente e os linfonodos foram coletados nos mesmos tempos. As populações de leucócitos foram selecionadas dentro de *gates* feitos em *singlets, live, CD45⁺* e verificamos a expressão de marcadores de superfície. Os monócitos foram caracterizados como $Ly6C^{+}Ly6G^{-}$, neutrófilos como $CD11b^{+}LY6G^{+}$, macrófagos como $CD11b^{+}F4/80^{+}$, célula dendríticas como $CD11b^{+}CD11c^{+}$ e células NK como $CD49b^{+}$ (Figura 9).

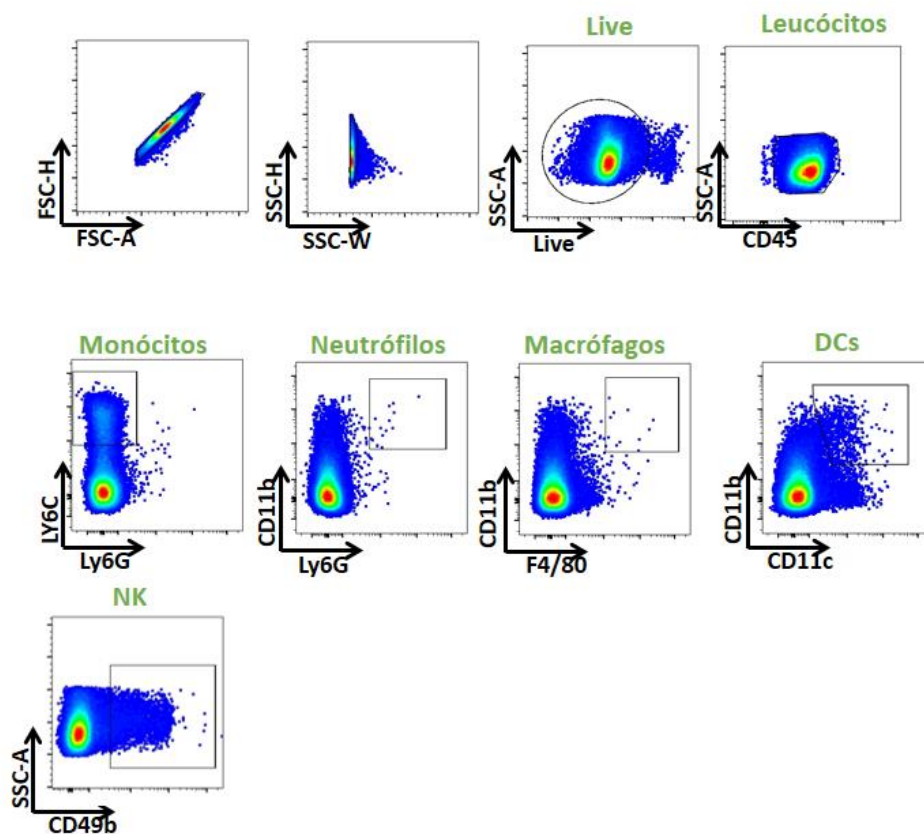


Figura 9. Estratégia de análise das populações celulares recrutadas para o linfonodo de drenagem. *Dot plots* mostram as populações analisadas de monócitos ($Ly6C^{+} Ly6G^{-}$), neutrófilos ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$), macrófagos ($CD11b^{+}F4/80^{+}$), células dendríticas ($CD11b^{+}CD11c^{+}$) e células natural killer ($CD49b^{+}$). Todas as populações foram analisadas dentro de *singlets, live, CD45⁺*.

A frequência de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+$) se manteve estável em todos os tempos analisados, nos três grupos avaliados (Figura 10A). Apenas, no tempo de 24 horas, verificamos uma redução significativa dessa população, no grupo inoculado com *Lb* somente (Figura 10A). A frequência da população de monócitos ($Ly6C^+Ly6G^+$) (Figura 10B) e células NK ($CD49b^+$) (Figura 10C) também não mostrou alterações significativas nos diferentes tempos avaliados. Nos tempos avaliados, não observamos neutrófilos ou macrófagos nos linfonodos de drenagem do sítio de inoculação pela técnica empregada.

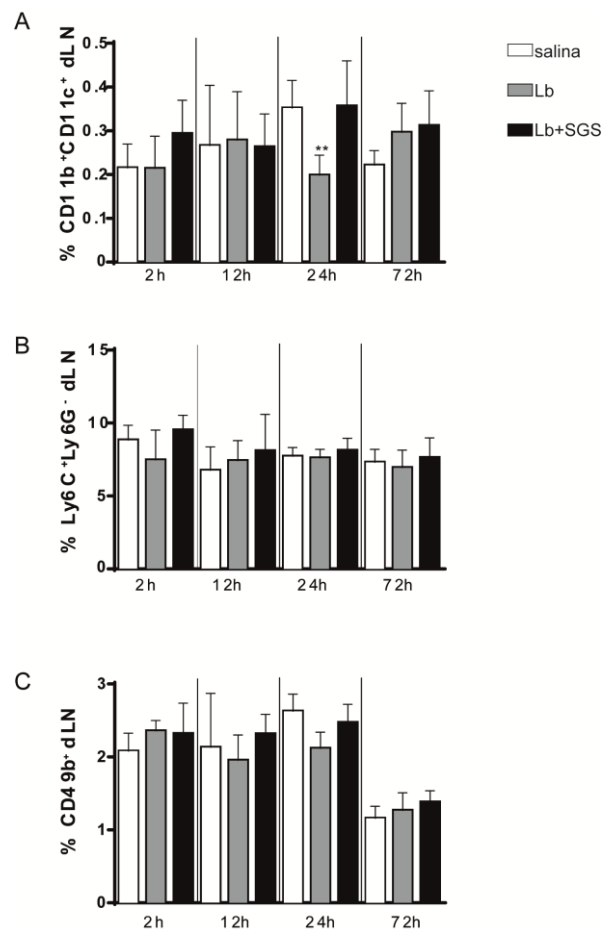


Figura 10. Cinética de recrutamento celular no linfonodo drenante após a inoculação de saliva de *Lu. intermedia*. Camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* ou *L. braziliensis* + SGS. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as populações de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+$) (A), monócitos ($Ly6C^+Ly6G^+$) (B) e células natural killer ($CD49b^+$) (C) presentes no linfonodo foram determinadas por citometria de fluxo. Os dados são referentes a um experimento realizado com 6 linfonodos por grupo, por tempo e estão mostrados como média \pm SEM. ** $p < 0,01$ *L. braziliensis* + SGS vs salina.

4.3 Infecção e produção de superóxido em neutrófilos estimulados com a saliva de *Lutzomyia intermedia* e *Leishmania braziliensis*

Como mostrado na Figura 7, observamos a capacidade dos neutrófilos de permanecerem no sítio de infecção até 24 horas, na presença de SGS de *Lu. intermedia*. Prosseguimos então, avaliando os efeitos da exposição à saliva, juntamente com a *Leishmania*, sobre essas células. Para isso, foram realizados experimentos *in vitro*, nos quais avaliamos a taxa de infecção e a produção de superóxido em neutrófilos obtidos da medula óssea. Inicialmente determinamos uma estratégia de análise, selecionando a população dentro de *gates* feitos em *singlets*, nos possibilitando identificar os neutrófilos infectados por meio do sinal GFP⁺. Para análise da produção de superóxido intracelular, utilizamos a sonda DHE e avaliamos a média de intensidade de fluorescência (Figura 11).

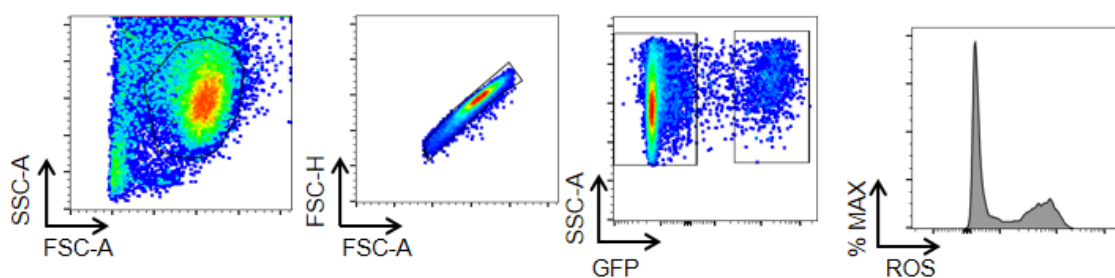


Figura 11. Estratégia de análise de infecção e produção de superóxido por neutrófilos. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e foram estimulados com *L. braziliensis* GFP na presença ou não de saliva de *Lu. intermedia*. As células infectadas foram determinadas por citometria de fluxo (GFP⁺) assim como a produção de ROS (MFI). A análise foi realizada dentro de *singlets*.

Os neutrófilos expostos à *L. braziliensis* na presença ou não de SGS apresentaram taxa de infecção semelhante (Figura 12 A e B). Em paralelo, observamos que a produção de superóxido também foi semelhante na presença ou não do SGS de *Lu. intermedia* (Figura 12 C e D).

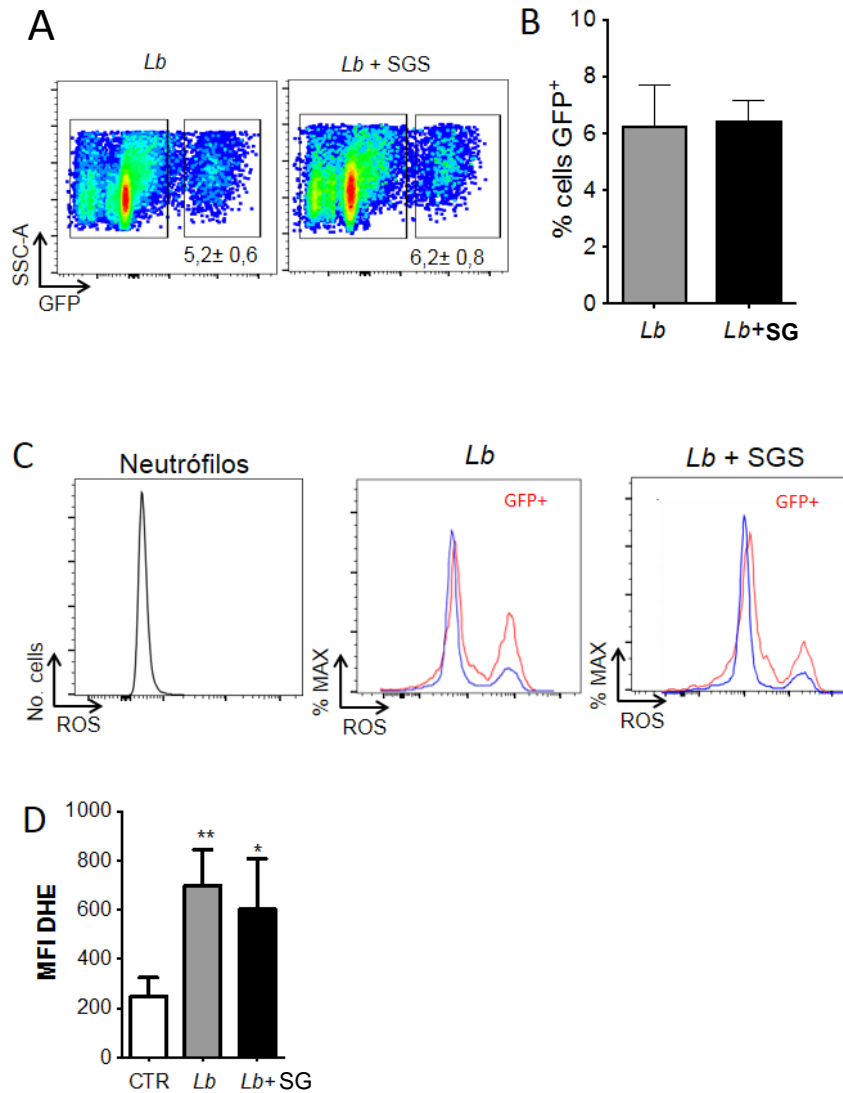


Figura 12. Efeitos da saliva de *Lu. intermedia* sobre a produção de ROS em neutrófilos murinos infectados por *L. braziliensis* GFP. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e foram expostos à *L. braziliensis* GFP na presença ou não de SGS *Lu. intermedia*. (A) Plots representativos mostrando a frequência de células infectadas (GFP⁺) (B) Representação gráfica da taxa de infecção. (C) Histogramas mostrando a expressão de ROS em células infectadas estimuladas ou não com SGS. (D) Representação gráfica das médias de intensidade de fluorescência de superóxido produzido pelas células infectadas (GFP⁺). Os dados são referentes a um experimento representativo, realizado em quadruplicata. Os dados estão mostrados como média ± SEM. *p< 0,05; **p<0,01 *L. braziliensis* + SGS vs salina;

4.4 Morte de neutrófilos após estimulação com *L. braziliensis* e saliva de *Lu. intermedia*

Em seguida, avaliamos se o SGS de *Lu. intermedia* seria capaz de modular a apoptose de neutrófilos. Para isso, os neutrófilos foram obtidos como descrito acima e foram expostos à *L. braziliensis* GFP, na presença ou não de SGS de *Lu. intermedia*. As células foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. Nossa estratégia consistiu em avaliar a presença de células PI⁺ em neutrófilos controles (Figura 13A) ou expostos a *Lb* (Figura 13B). Tanto a estimulação dos neutrófilos com *Lb* somente ou com *Lb*+SGS induziram a morte celular (Figura 13C), como mostrado pela presença de células PI⁺ (Figura 13C).

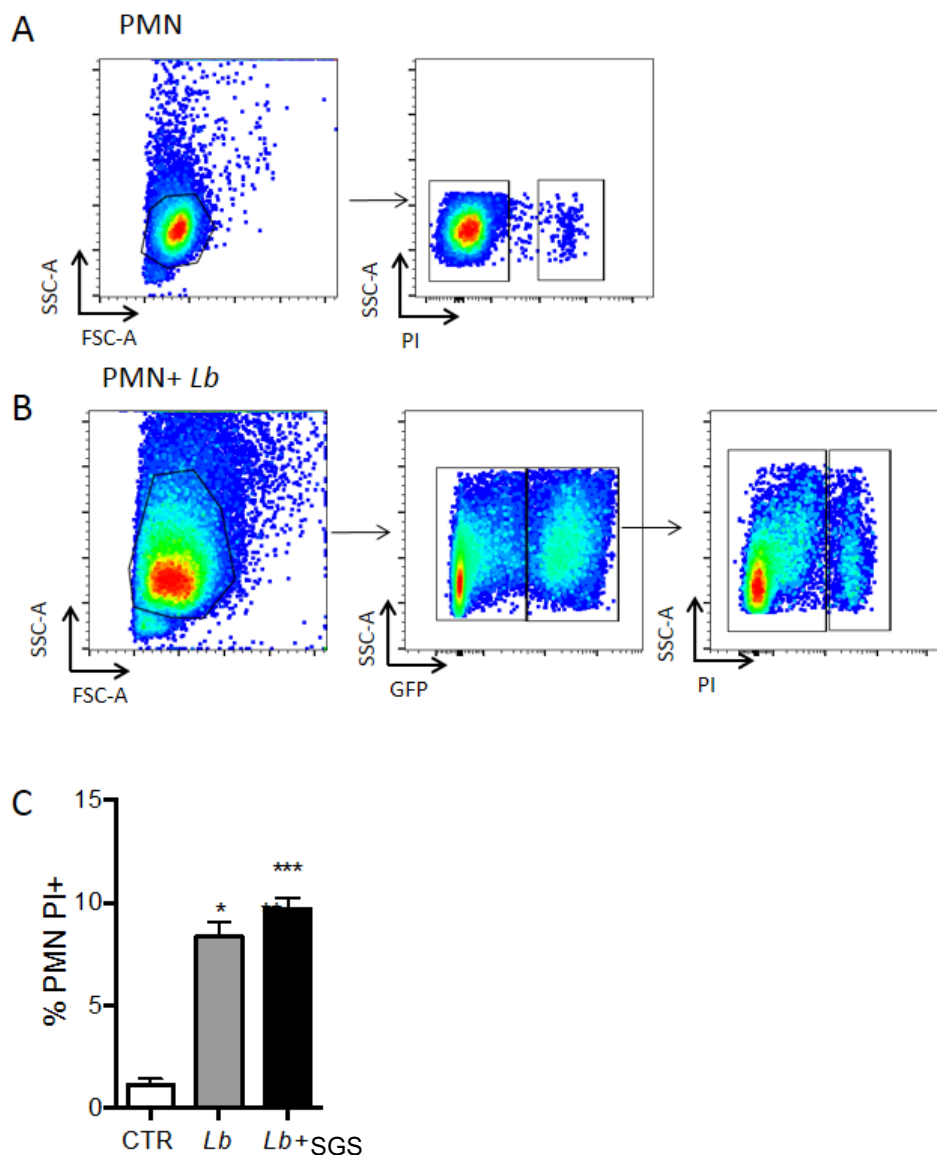


Figura 13. Efeitos da saliva de *Lu. intermedia* sobre a apoptose de neutrófilos murinos. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e foram expostos à *L. braziliensis* GFP ou *L. braziliensis* GFP + SGS *Lu. intermedia*. Após 18 horas de estimulação, as células foram marcadas com PI e foram analisadas por citometria de fluxo. (A) *Dot plots* representativos mostrando as células PI⁺ na população de neutrófilos controles (PMN) e na população expostas aos parasitas (PMN+*Lb*). (C) Representação gráfica da frequência de PMN PI⁺ nas três condições analisadas. Os dados são referentes a um experimento realizado em quadruplicata. Dados mostrados como média ± SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ *L. braziliensis* + SGS vs salina;

4.5 Efeito da saliva de *Lutzomyia intermedia* sobre a infecção experimental por *Leishmania braziliensis*

Por fim, avaliamos os efeitos da presença da saliva de *Lu. intermedia* sobre a infecção experimental por *L. braziliensis*. Observamos que o desenvolvimento da lesão em camundongos inoculados com *L. braziliensis* ou co-inoculados com *L. braziliensis* mais SGS de *Lu. intermedia* foi bastante similar. Em ambos os grupos, a lesão se desenvolve após a quarta semana, com pico durante a sexta semana e redução gradativamente a partir da sétima semana (Figura 14A). Na sexta e na décima semana de acompanhamento das lesões, determinamos a carga parasitária na orelha e no linfonodo, por meio do ensaio de diluição limitante (Figura 14B, C). Também não observamos diferenças significantes em relação à quantidade de parasitas nesses dois sítios comparando animais infectados com *L. braziliensis* na presença ou não de SGS de *Lu. intermedia*.

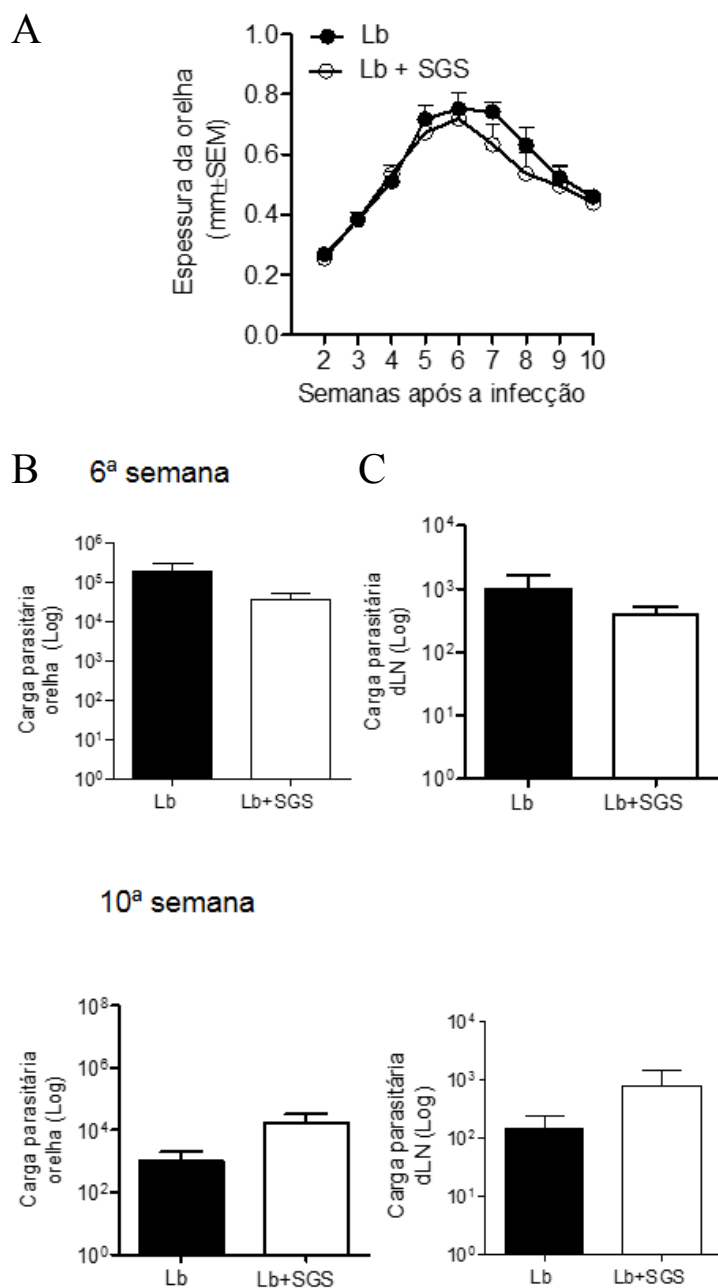


Figura 14. Avaliação do efeito da saliva de *Lutzomyia intermedia* sobre a infecção experimental por *Leishmania braziliensis*. Camundongos BALB/c foram inoculados com *L. braziliensis* na presença ou não de SGS de *Lu. intermedia*. (A). As lesões na orelha dos grupos de animais infectados foram monitoradas semanalmente por 10 semanas (12 animais por grupo). (B) Carga parasitária da orelha. (C) Carga parasitária do linfonodo. Os resultados são referentes a um experimento realizado com 12 animais. Os dados estão mostrados como média \pm SEM.

5 DISCUSSÃO

A saliva de flebótomos, assim como de outros insetos hematófagos, contém um repertório de moléculas capazes de interferir nas respostas hemostática, inflamatória e imune do hospedeiro vertebrado (revisado em TITUS & RIBEIRO, 1990). Em modelos experimentais de infecção por leishmanias, observou-se que a co-inoculação de *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* resultou na formação de lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos (LIMA et al., 1996; DONNELLY et al., 1998; SAMUELSON et al., 1991). Diante desses achados, levantamos a hipótese de que a saliva de *Lu. intermedia*, o principal vetor da *L. braziliensis* (MARCONDES, 1996) modula o recrutamento inicial de células, no momento da inoculação do parasita, e que isso leva à exacerbação da infecção. Nosso objetivo principal foi avaliar as populações celulares presentes em diferentes tempos após a inoculação de *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*.

Inicialmente, observamos que SGS de *Lu. intermedia*, juntamente com as formas metacíclicas de *L. braziliensis*, aumenta de forma global o recrutamento celular e, de maneira significativa, a frequência de macrófagos e de células dendríticas. Nossos resultados comprovam estudos anteriores mostrando que a saliva de *Lu. longipalpis* é capaz de induzir o recrutamento de macrófagos (TEIXEIRA et al., 2005) e de neutrófilos (MONTEIRO et al., 2007), em modelo de bolsão inflamatório. Empregando este mesmo modelo, nós também observamos que a presença de SGS de *Lu. intermedia* aumentou o influxo de neutrófilos e de macrófagos (MOURA et al., 2010) e a saliva de *Lu. longipalpis* promoveu um aumento de neutrófilos comparado com a presença de *L. infantum* somente (VASCONCELOS et al., 2014). Em relação à cinética de recrutamento, a inoculação da saliva de *Lu. longipalpis* por via intradérmica induziu o acúmulo de neutrófilos após 6h, persistindo até 48h, e de macrófagos após 12h (CARREGARO et al., 2013). O recrutamento de neutrófilos também foi comprovado empregando-se flebótomos infectados com *L. major*, demonstrando inclusive que essas células são rapidamente infectadas pelos parasitas (PETERS et al., 2008). Aqui, nós observamos um aumento significativo na presença de neutrófilos 24h após a inoculação da saliva de flebotomíneos, indicando um possível turnover no sítio da inoculação. Ribeiro-Gomes e colaboradores (2005), demonstraram que esse turnover, é promovido pela apoptose de macrófagos através do FasL que consequentemente induz o recrutamento de neutrófilos, essas células também sofrem apoptose e como consequência levam a aumento de parasitos

Quanto às células NK, foi demonstrado que em animais sensibilizados com a picada de *Phlebotomus papatasi*, ocorre um aumento na expressão de quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T e na ativação de células NK (TEIXEIRA et al., 2014). Os autores sugerem que exposições repetidas ao vetor pode induzir o recrutamento de células efetoras, tais como células NK, criando um ambiente hostil ao estabelecimento do parasita. Nesse trabalho, nós observamos um aumento na frequência de células NK, também no tempo de 24h após a inoculação, mas não houve diferença significativa entre os grupos que receberam ou não o SGS de *Lu. intermedia* juntamente com o parasito.

Com relação ao recrutamento induzido por *L. braziliensis* somente, animais infectados com 10^6 metacíclicas de *L. infantum*, por via intradérmica, apresentaram um pico no recrutamento de neutrófilos 6h após a inoculação enquanto que a frequência máxima de macrófagos ocorreu após 3 dias mas a frequência de células NK se manteve inalterada (THALHOFER et al., 2010). No estudo de Hurrel e colaboradores (2015), a inoculação de 10^6 formas metacíclicas de *Leishmania mexicana* promoveu um pico máximo no recrutamento de neutrófilos 12h após a inoculação. A inoculação de 2×10^5 formas metacíclicas de *L. major* também induziu um pico no recrutamento de neutrófilos 12h após a inoculação, mesmo tempo em que foi observada a maior frequência de monócitos inflamatórios (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). No nosso estudo, utilizamos 10^5 formas metacíclicas de *L. braziliensis* e também observamos um pico máximo no recrutamento de neutrófilos 12h após a inoculação, assim como no recrutamento de DCs e na frequência de monócitos. Vale ressaltar que a frequência de neutrófilos e macrófagos diminuiu 24h após a inoculação, mas essa última população volta a aumentar novamente em 72h enquanto que a frequência de DCs foi máxima em 72h.

As diferenças encontradas neste estudo comparando aos resultados já publicados sugerem que a dose inoculada, além da espécie da *Leishmania* podem modular diferentemente o recrutamento celular. Acreditamos que a utilização de uma dose menor de parasitas provavelmente dificultou a identificação de células infectadas GFP⁺ no sítio da infecção impossibilitando a identificação das primeiras células a serem infectadas pela *L. braziliensis*, e sobretudo, se a presença da saliva favorece essa infecção. Nesse sentido, foi mostrado que uma dose mais alta (10^6) de parasitas fluorescentes é essencial para detecção do sinal por citometria de fluxo (RIBEIRO-GOMES et al., 2014) A falta de padronização do painel de marcadores celulares utilizados para caracterização e as distintas estratégias de análise também dificultam a comparação entre os estudos. Aqui,

por exemplo, optamos por considerar as células viáveis e CD45⁺, o que não é consenso na literatura.

Um trabalho do nosso laboratório demonstrou que uma das características clínicas da leishmaniose é a linfadenopatia: os pacientes que apresentam linfonodos palpáveis têm uma resposta humoral anti-*Leishmania* mais forte assim como a resposta de hipersensibilidade tardia (BARRAL et al., 1992). Além disso, foi possível fazer o isolamento do parasita a partir da cultura de um aspirado do linfonodo. Um outro trabalho mostrou que pacientes recém-diagnosticados apresentam maior frequência de neutrófilos, eosinófilos e células T CD8⁺ nos linfonodos de drenagem enquanto que pacientes com maior tempo de doença apresentam maior frequência de linfócitos B e plasmócitos (BOMFIM et al., 2007). Nesse trabalho, não observamos nenhuma modulação significativa nas populações celulares presentes no linfonodo de drenagem, durante o período avaliado, na presença ou não de SGS de *Lu. intermedia*. Na verdade, a única população para a qual observamos mudanças significativas foi a de células dendríticas. Vinte e quatro horas após a inoculação, a frequência de células dendríticas foi significativamente menor em animais inoculados com *L. braziliensis* quando comparado aos animais inoculados com *L. braziliensis* +SGS. Nesse mesmo tempo, na orelha, a presença de SGS aumentou significativamente a frequência de células dendríticas. Podemos sugerir que a saliva de *Lu. intermedia* retém as células dendríticas no sítio de inoculação, por um tempo maior.

Dados do nosso grupo demonstraram, anteriormente, a capacidade de neutrófilos murinos e *L. braziliensis* em induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e a apoptose (FALCÃO et al., 2015). De maneira similar, a *L. braziliensis* também induziu a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos, assim como a produção de quimiocinas, como CXCL8 e CXCL9 (CONCEIÇÃO et al., 2016). Uma vez que demonstramos que essas células persistem no sítio da infecção na presença de *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*, investigamos então, os prováveis efeitos da presença da saliva do vetor em neutrófilos murinos. A saliva de *Lu. intermedia* não interferiu na taxa de infecção dos neutrófilos, o que foi um dado surpreendente porque já havia sido mostrado que a saliva de *Lu. longipalpis* aumenta a carga parasitária em neutrófilos (PRATES et al., 2011). Uma possível explicação seria o fato de termos empregado parasitas metacíclicos e, possivelmente, a dose de saliva empregada. Aqui, utilizamos uma dose de SGS equivalente a 1 par por inoculação, dose essa baseada em trabalhos anteriores do grupo (DE MOURA et al., 2007; DE MOURA et al., 2013),

diferentemente da utilizada no estudo com a saliva de *Lu. longipalpis* (0,5 par Ensaios futuros serão necessários para avaliar efeitos dose-resposta na co-inoculação de *L. braziliensis* (metacíclicos), na presença de saliva.

Em nosso trabalho, observamos um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos estimulados com *L. braziliensis*, corroborando nosso trabalho anterior (FALCÃO et al., 2015). Tavares e colaboradores (2014) correlacionaram a produção de espécies reativas de oxigênio na infecção de neutrófilos com *L. amazonensis* com o mediador pró-inflamatório, Leucotrieno B4, e mostraram que esse o tratamento das células com um inibidor de produção de Leucotrieno B4 aumenta a infecção dos neutrófilos. Por outro lado, Carregaro e colaboradores (2015), mostraram que a saliva de *Phlebotomus papatasi* aumenta a produção de Prostaglandina E2 e de IL-10. Os autores sugerem que a saliva desse vetor pode inibir a resposta inflamatória e poderia atuar de forma terapêutica. Assim, observa-se que a saliva de diferentes vetores podem ter atuação distinta sobre células da resposta imune.

Com relação à apoptose, nosso trabalho anterior mostrou que a exposição de neutrófilos a *L. braziliensis* não atrasa a apoptose (FALCÃO et al., 2015). A infecção de neutrófilos murinos com *L. infantum* induziu apoptose e esse efeito foi potencializado na presença da saliva de *Lu. longipalpis* (PRATES et al., 2011). De maneira similar identificamos que a presença da saliva de *Lu. intermedia* não modificou a taxa de apoptose dos neutrófilos expostos a *L. braziliensis*, embora tenhamos observado um pequeno acréscimo.

O desenvolvimento de um modelo experimental para leishmaniose cutânea foi de extrema importância para compreendermos melhor os fenômenos que ocorrem pós-infecção (DE MOURA et al., 2005). Juntamente com o parasita, durante o repasto sanguíneo, a saliva do vetor é obrigatoriamente inoculada e, frente a isso, diversos grupos se propuseram a elucidar melhor o papel da saliva co-inoculada juntamente com a *Leishmania*. A co-inoculação e SGS de *Lu. longipalpis* + *L. amazonensis* exacerbou a lesão refletindo também na carga parasitária (NORSWORTHY et al., 2004). Apesar dessa exacerbção, Laurenti e colaboradores (2009) destacaram diferenças entre saliva de *Lu. longipalpis* de flebotomos capturados do ambiente comparados com os criados em colônias. Nos animais co-inoculados com SGS de *Lu. longipalpis* capturados do ambiente posteriormente infectados com *L. amazonensis*, observou-se um desenvolvimento da lesão e parasitismo mais brando.

Na LCL, a exacerbação da lesão também foi observada após a co-inoculação SGS de *Lu. longipalpis* + *L. major* por via subcutânea (TITUS; RIBEIRO, 1988). De maneira similar, por via intradérmica, a co-inoculação de SGS de *Ph. papatasi* + *L. major* aumentou o tamanho da lesão e a carga parasitária (BELKAID et al., 1988). A exacerbação promovida pela saliva foi relacionada com a inibição da resposta Th1, IFN- γ , IL-12 e óxido nítrico, e a elevação da resposta Th2 (IL4) (MBOW et al., 1998). A quantidade de saliva inoculada juntamente com o parasita também influencia no desenvolvimento da lesão (CARREGARO et al., 2013). Em nosso estudo, observamos que a inoculação intradérmica de *L. braziliensis* + a saliva de *Lu. intermedia* não exacerba a lesão e também não aumenta a carga parasitária. Esses resultados são diferentes dos descritos acima assim como são diferentes dos descritos por Bezerra e Teixeira (2001) no qual observou-se que SGS de *Lu. whitmani* co-inoculado com *L. braziliensis* aumentou o tamanho da lesão. Uma possível explicação seria a dose de SGS utilizada frente à quantidade de parasitas (10^5 metacíclicos). Como descrito anteriormente com relação ao recrutamento, é possível que os efeitos da saliva sobre o recrutamento celular e/ou infecção sejam melhor mimetizados em doses menores de parasitas. Além disso, há outros fatores que podem explicar nossos achados tais como a inexistência de Maxadilan na saliva de *Lu. intermedia* (DE MOURA et al., 2013), molécula essa encontrada na saliva de *Lu. longipalpis*. De fato, o estudo de LIMA e TITUS (1996) elucida isso, ao demonstrar a capacidade da saliva de *Lu. longipalpis* exacerbar a infecção por *L. braziliensis*.

A sensibilização prévia com a saliva também é capaz de levar a efeitos protetores ou exacerbadores. A sensibilização com SGS de *P. papatasi* ou através da picada desse vetor, promoveu um efeito protetor em animais posteriormente desafiados com *L. major* (BELKAID et al., 1988, KAMHAWI et al., 2000). Animais imunizados com a saliva de *Lu. intermedia* desafiados com *L. braziliensis* desenvolvem uma lesão mais grave com persistência de parasitas na orelha e no linfonodo, estes associados com a baixa produção de IFN- γ em relação a IL-4 (MOURA, 2013). De fato, indivíduos residentes em área endêmica e expostos à picada de *Lu. intermedia* têm maior risco de desenvolver leishmaniose cutânea, mostrando que a constante exposição aos componentes do vetor pode influenciar negativamente no desfecho da doença (CARVALHO et al., 2015). Portanto, é possível que os efeitos que vimos nesse trabalho, em relação aos momentos iniciais da infecção, influenciem nesse resultado final, em pessoas continuamente expostas.

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho avaliamos o perfil de recrutamento celular induzido pela co-inoculação de formas metacíclicas de *L. braziliensis* + saliva do vetor *Lu. intermedia*. Observamos que a saliva foi capaz de aumentar a frequência de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, comparado à presença do parasito somente. No entanto, a saliva de *Lu. intermedia* não aumentou a taxa de infecção de neutrófilos ou a taxa de apoptose ou a lesão de animais infectados com *L. braziliensis*. Nossos dados mostram que a saliva pode modificar o recrutamento celular no momento da inoculação de *L. braziliensis* mas não exerce papel direto na exacerbação da infecção.

REFERÊNCIAS

ABI ABDALLAH, D.S., et al. *Listeria monocytogenes*-based vaccine that secretes sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p.2736-2745, 2014.

BARRAL, A. et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 5, p.587-592, 1992.

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**, v. 188, n. 10, p. 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 349-351, 2001.

BITTENCOURT, A. L. Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL): histological and ultrastructural aspects. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n.3, p. 45-51, 2009.

BOMFIM, G. et al. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.5, p 854-859, 2007.

CARREGARO, V. et al. 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, n. 1, p.102-113, 2013.

CARREGARO, V. et al. Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunossuppression and Promote the Infection Establishment. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003600, 2015.

CARVALHO, A. M. et al. Interleukin 10-dominant immune response and increased risk of cutaneous leishmaniasis after natural exposure to *Lutzomyia intermedia* sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 1, p.157-165, 2015.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 96, n. 26, p.15155-15160, 1999

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3 p. 175-182, 2001.

CONCEIÇÃO, J. et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p.0004715-1, 2016.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, n.3, p.70-83, 2009.

DONNELLY, K. B.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 1, p.97-103, 1998.

FALCÃO, S. A. et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p.0003601-0, 10, 2015.

GOMES, R. et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of The National Academy of Sciences of United States of America**, v. 105, n. 22, p.7845-7850, 2008.

GOMES, R. et al. Immunity to *Lutzomyia whitmani* saliva protects against experimental *Leishmania braziliensis* infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p.1-15, 2016.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.

GUIMARÃES, L. H. et al. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 66-74, 2005.

LAURENTI, M. D. et al. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 4, p.389-395, 2009.

KAMHAWI, S. et al. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290 n.5495, p. 1351–1354, 2000.

KATEBI, A. et al. *Leishmania tarentolae* secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against *Leishmania major* infection in a susceptible BALB/c mice model. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p.501-511, 2015.

LIMA, H. C.; TITUS R, G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p.5442-5445, dez. 1996.

MARCONDES, C.B.A. Redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz e Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 457-462, 1996.

MBOW, M. L. et al. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 10, p. 5571-5577, 1998.

- 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**, v.76, n.1, p. 88-94, 2007.
- MORRIS, R. V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p.5226-5230, 2001.
- MOURA, T. R. de et al. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2007.
- MOURA, T. R. de 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**, v. 7, n. 5, p. e2242, 2013.
- MOURA, T. R. de et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* Saliva Modulates the Inflammatory Environment Induced by *Leishmania braziliensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e712, 2010.
- MOURA, T. R. de et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.
- NORSWORTHY, N. B. et al. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.
- OLIVEIRA M.A. et al. **Leishmania sp.:** comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Experimental Parasitology**, v.95, n.2, p. 96-105, 2000.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p.970-974, 2008.
- PETERS, N, C. et al. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. **PloS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000484, 2009.
- PRATES, D. B. et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p.575-582, 2011.
- RIBEIRO, J, M. C.; SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: Salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 2, p.292-297, 1986.
- RIBEIRO, J, M. C. Vector salivation and parasite transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p.1-3, 1987.
- RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Disease**, v. 4, n. 3, p.143-152, 1995.

- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.6 n. 192, p.1127-34, 2005.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PloS Pathogens**, v. 8, n. 2, p.1002536-1, 2012.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p.2713-2727, 2014.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
- SAMUELSON, J. et al. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p.49-54, 1991.
- TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p.656-666, 2014.
- THALHOFER, C.J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p.108-117, 2010.
- TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p.8346-8353, 2005.
- TEIXEIRA, C. R. et al. Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 18-23, 2005.
- TEIXEIRA, C. et al. Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted *Leishmania major* by exposure to uninfected bites. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.4, p. e2781, 2014.
- THIAKAKI, M. et al. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Microbes and Infection**, v. 7, n.4, p.760-766, 2005.
- TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, n. 4845, p. 1306-1308, 1988.
- TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitology Today**, v. 6, n. 5, p.157-160, 1990.

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**, v. 194, n.3, p.331-342, 2001.

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**, v. 56, n. 1, p.21-27, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2010. (WHO Technical Report Series, 949)

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A., 1994. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, Florida: Associated, 1994. (Memoirs of the American Entomological Institute no. 54)