

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS CRISTINA TIRADO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA INFLUÊNCIA DA SALIVA DE *Nyssomyia neivai* NO
POTENCIAL INFECTIVO DE ISOLADOS DE *Leishmania braziliensis* DO ESTADO
DO PARANÁ

CURITIBA

2018

THAIS CRISTINA TIRADO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA INFLUÊNCIA DA SALIVA DE *Nyssomyia neivai* NO
POTENCIAL INFECTIVO DE ISOLADOS DE *Leishmania braziliensis* DO ESTADO
DO PARANÁ

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial na obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr. Andrey José de Andrade¹
Co-orientador: Dr. Fabiano Borges Figueiredo²

¹Laboratório de Parasitologia Molecular, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Paraná).

CURITIBA

2018

A quem sempre esteve junto a mim, desde o momento em que nasci. Agradeço a Deus por ter me dado tamanho presente em minha vida. Obrigada meu irmão, **Junior**, por todos os dias em que você se dedicou para me ajudar a estudar, aconselhar, conversar e rir. É uma alegria tê-lo ao meu lado para comemorar essa conquista tão importante para mim. Você é um exemplo de ser humano e é a pessoa que mais admiro. É uma honra ser sua irmã. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, fonte diária de vida e de força.

Aos meus pais, **Antonio Carlos Tirado** e **Marcia Cristina Fávaro Tirado**, por todo o incentivo, apoio e dedicação ao longo de minha vida pessoal, acadêmica e profissional.

Ao meu irmão, **Antonio Carlos Tirado Junior**, por sempre ter me apoiado em minhas escolhas, ajudado em minhas dificuldades e por ter sido, além de tudo, um grande amigo.

Ao meu bem, **Lucas de Souza de Lacerda**, pelo carinho, compreensão e incentivo nesse último ano da graduação.

Aos meus queridos amigos, **Anelize Eurich**, **Suelen Silva** e **Thiago Amaral**, por todos esses anos de parceria e companheirismo.

Ao meu orientador, **Prof.º Dr. Andrey José de Andrade**, e meu co-orientador, **Dr. Fabiano Borges Figueiredo**, por todo o empenho dedicado neste trabalho, pelos ensinamentos e palavras de incentivo durante o período em que trabalhamos juntos. São verdadeiros exemplos de profissionais que desejo seguir.

À minha co-orientadora da Iniciação Científica, **Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros**, por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas a mim, e por sempre ter contribuído para meu conhecimento científico com ótimas críticas e sugestões.

À **Me. Beatriz Borges**, à **Dra. Alessandra Aguiar** e ao **Dr. Rafael Kessler**, pesquisadores do Instituto Carlos Chagas, por terem ajudado no manuseio e análises no equipamento Operetta.

À **Prof.ª Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro** do **Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná**, pelo isolamento e fornecimento das cepas P1, P2 e P5 de *L. braziliensis* que foram usadas neste estudo.

À **Universidade Federal do Paraná**, pela oportunidade de cursar a graduação e pelas bolsas concedidas nos períodos de Iniciação Científica e de Mobilidade Acadêmica.

Ao **Instituto Carlos Chagas**, por ter fornecido estrutura e recursos para os projetos de Iniciação Científica e Monografia.

Aos colegas do **Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas**, pelos ensinamentos durante o período de Iniciação Científica.

Aos colegas do **Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados** e do **Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas** da **Universidade Federal do Paraná**, pois foi onde tive a primeira experiência na pesquisa.

Aos colegas da Universidade, pela amizade e por toda a ajuda no decorrer da graduação.

À **Fundação Araucária** e ao **CNPq**, pelas bolsas de Iniciação Científica.

Aos **professores** que tive durante toda a minha vida, desde a educação infantil à superior, todos foram fundamentais para que eu concluísse esta etapa e conclua outras futuras.

"AO CIENTISTA, SOBRETUDO AO CIENTISTA CRISTÃO, CORRESPONDE A ATITUDE DE INTERROGAR-SE SOBRE O FUTURO DA HUMANIDADE E DA TERRA; DE CONSTRUIR UM MUNDO HUMANO PARA TODAS AS PESSOAS E NÃO PARA UM GRUPO OU UMA CLASSE DE PRIVILEGIADOS."

Papa Francisco

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por parasitos protistas do gênero *Leishmania*, amplamente distribuída em todo mundo e vem crescendo a cada ano. É uma patologia que está ligada a regiões onde o índice de pobreza é elevado e há poucas alternativas de tratamento, características que fazem dela uma doença negligenciada. A LTA é transmitida ao hospedeiro a partir do repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo, pertencente à subfamília Phlebotominae. A saliva dos flebotomíneos vem sendo muito estudada nos últimos anos a fim de desenvolver novas alternativas profiláticas ou terapêuticas. Os componentes salivares são dotados de muitas propriedades farmacológicas, as quais são muito importantes para as interações parasito-hospedeiro. Pacientes que são previamente imunizados com proteínas da saliva desses vetores tornam-se mais protegidos de infecção contra *Leishmania*. *Nyssomyia neivai* é um dos principais vetores de *Leishmania braziliensis* no estado do Paraná, portanto está envolvido na disseminação de grande parte dos casos de LTA no estado. A carência de estudos envolvendo essa espécie foi um dos fatores de incentivo para o desenvolvimento do presente estudo, pois é de interesse de saúde pública que esse vetor seja melhor conhecido pela população. No total, foram identificados e utilizados 130 espécimes fêmeas de *Nyssomyia neivai*. Foram feitas infecções *in vitro* em células THP-1 com 4 cepas de *Leishmania braziliensis* utilizando 4 diluições diferentes de glândula salivar, objetivando comparar diferenças entre as cepas e entre as concentrações. Os números de células e amastigotas foram contados automaticamente pelo equipamento Operetta, e os dados fornecidos pela leitura permitiu que fosse feito o cálculo do Índice de Infecção, que foi o fator de comparação entre os grupos e cepas. Em relação ao Controle sem saliva, apenas na cepa P5 foi observado diferença estatística. A concentração de 1 glândula por poço infectou significativamente mais, implicando que essa é uma diluição ideal e que favorece a entrada do parasito na célula. Curiosamente, a fêmea do flebotomíneo utiliza apenas o conteúdo de uma das duas glândulas no momento do repasto sanguíneo. Nesse contexto, o uso dessa diluição poderia ser considerada um ponto de partida para testes de imunização, tendo em vista que a produção de uma vacina para essa patologia é de grande interesse público.

Palavras-chave: Flebotomíneo. Infecção. Leishmaniose. Saliva.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a serious disease caused by protist parasites of the genus *Leishmania*, distributed worldwide and growing every year. It is a pathology that is linked to population where the poverty index is high and there are few treatment alternatives, characteristics that make it a neglected one. ACL is transmitted to the host through the blood meal of the female phlebotomine, belonging to the subfamily Phlebotominae. Saliva from sand flies has been much studied in recent years. The salivary components are endowed with high pharmacological properties, such as those very important for parasite-host interactions. Patients who are pre-immunized with the saliva proteins of the vectors become more protected from infection against *Leishmania*. *Nyssomyia neivai* is one of the main vectors of *Leishmania braziliensis* in the state of Paraná, so it is in the process of disseminating most of the cases of ACL in the state. The lack of studies was an issue of interest for the development of the present study. In total, 130 female specimens of *Nyssomyia neivai* were identified and analyzed. In vitro infections were made in THP-1 cells with 4 strains of *Leishmania braziliensis* using 4 different dilutions of the salivary gland, aiming at the differences between strains and between the concentrations. The numbers of cells and amastigotes were counted automatically by an equipment called Operetta, and the data provided by the reading allowed the calculation of the Infection Index, which was the comparison factor between the groups and strains. Regarding the Control without saliva, only in the P5 strain was observed statistical difference. The concentration of 1 gland per well infected more, implying that this is an ideal dilution and favors the entry of the parasite into the cell. Interestingly, the female sand fly uses only the contents of one of the two glands at the time of the blood meal. In this context, the use of this dilution could be a starting point for immunization tests, considering that producing vaccination to this pathology is a great public interest.

Key-words: Phlebotomine. Infection. Leishmaniasis. Saliva.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NO TERRITÓRIO NACIONAL ENTRE 1980 E 2014	15
FIGURA 2: INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL.....	16
FIGURA 3: CICLO DE VIDA DA <i>Leishmania</i>	18
FIGURA 4: FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DO MATERIAL E MÉTODOS	24
FIGURA 5: POTES CONTENDO LARVAS DOS FLEBOTOMÍNEOS NO INTERIOR DA CAIXA DE ISOPOR.....	26
FIGURA 6: POTES NUMERADOS CONTENDO AS LARVAS DE FLEBOTOMÍNEOS.	26
FIGURA 7: POTES CONTENDO LARVAS DOS FLEBOTOMÍNEOS NO INTERIOR DA CAIXA DE ISOPOR.....	26
FIGURA 8: TUBO FALCON CONTENDO A PREPARAÇÃO ALIMENTAR AUTOCLAVADA DAS LARVAS (GOULART et al 2017).....	26
FIGURA 9: ESTÁGIOS LARVAIS EM L3 (A) E L4 (B), PUPA JOVEM (C) E PUPA MADURA (D).....	27
FIGURA 10: LIBERAÇÃO DOS ADULTOS DA GAIOLA DE VOILE.....	28
FIGURA 11: A) MACHO B) FÊMEA.....	28
FIGURA 12: CABEÇA DO FLEBOTOMÍNEO EVIDENCIANDO O PAR DE GLÂNDULAS SALIVARES.....	28
FIGURA 13: DESENHO DO EXPERIMENTO NAS PLACAS DE 96 POÇOS. LEGENDA: C: CONTROLE; CC: CONTROLE COM A CABEÇA SEM GLÂNDULA; 2,1,0.5,0.25: NÚMERO DE GLÂNDULAS POR POÇO; REFERÊNCIA E PX: ISOLADOS DE <i>L. braziliensis</i>	33
FIGURA 14: OBSERVAÇÃO DE UM EXEMPLAR UTILIZADO NO TRABALHO. EM DESTAQUE, O PAR DE ESPERMATECAS EVIDENCIANDO QUE ESSE CONSISTE EM UM ESPÉCIME DE <i>Nyssomyia neivai</i>	34
FIGURA 15: IMAGEM FEITA PELO EQUIPAMENTO OPERETTA, EVIDENCIANDO OS NÚCLEOS DE THP-1 E DAS AMASTIGOTAS PELO CORANTE HOECHST E, EM LARANJA, O CITOPLASMA MARCADO PELO CORANTE NILE RED	35

FIGURA 16: UMA DAS REGIÕES DE 323 μ M X 323 μ M EVIDENCIANDO OS NÚCLEOS ENCONTRADOS. EM VERDE, OS NÚCLEOS QUE SERÃO CONSIDERADOS NA ANÁLISE. EM VERMELHO, NÚCLEOS QUE SERÃO DESCARTADOS POR ESTAREM EM DESACORDO COM OS PARÂMETROS CONFIGURADOS.	36
FIGURA 17: UMA DAS REGIÕES DE 323 μ M X 323 μ M EVIDENCIANDO AS CÉLULAS ENCONTRADAS. EM VERDE, CÉLULAS QUE SERÃO CONTABILIZADAS. EM VERMELHO, CÉLULAS QUE SERÃO DESCONSIDERADAS POR ESTAREM EM CONTATO COM A BORDA DA IMAGEM.....	37
FIGURA 18: A) SELEÇÃO DOS POÇOS PARA ANÁLISE; B) DISPOSIÇÃO DAS 25 REGIÕES QUE FORAM ANALISADAS NO POÇO; C) PLANOS DE LEITURA DA ANÁLISE DO POÇO	38
FIGURA 19: GRÁFICO REPRESENTANDO OS ÍNDICES DE INFECÇÃO OBTIDOS NAS DIFERENTES CEPAS E COMPARAÇÕES COM O GRUPO CONTROLE.....	39
FIGURA 20: GRÁFICO REPRESENTANDO OS ÍNDICES DE INFECÇÃO OBTIDOS NAS DIFERENTES CEPAS E COMPARAÇÕES COM O GRUPO CONTROLE + CABEÇA.....	40
FIGURA 21: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ÍNDICE DE INFECÇÃO ENTRE AS DILUIÇÕES DA SALIVA EM COMPARAÇÃO A: 2 GLÂNDULAS POR POÇO (A), 1 GLÂNDULA POR POÇO (B), 0,5 GLÂNDULA POR POÇO (C) E 0,25 GLÂNDULA POR POÇO (D)	41
FIGURA 22: REPRSENTAÇÃO DE UMA CÂMARA DE NEUBAUER.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA).....	13
1.2	AGENTES ETIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	16
1.3	BIOLOGIA E ETOLOGIA DOS VETORES	18
1.3.1	Fases do desenvolvimento de Flebotomíneos	18
1.3.1.1	Ovo	18
1.3.1.2	Larvas.....	19
1.3.1.3	Pupa	19
1.3.1.4	Adulto	20
1.4	SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	20
1.5	IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>Nyssomyia neivai</i>	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	23
3.2	ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	23
3.3	PROCEDÊNCIA E COLETA DOS FLEBOTOMÍNEOS	24
3.4	MANUTENÇÃO DOS INSETOS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DA PROLE.....	25
3.5	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	26
3.6	EXTRAÇÃO DA GLÂNDULA SALIVAR E OBTENÇÃO DO EXTRATO	27
3.7	PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS E IDENTIFICAÇÃO.....	29
3.8	MANUTENÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS ADERENTES.....	29
3.9	MANUTENÇÃO DE <i>Leishmania braziliensis</i>	30
3.10	DILUIÇÃO DO EXTRATO DA GLÂNDULA SALIVAR	30
3.11	INFECÇÃO DE CÉLULAS THP-1 COM <i>Leishmania braziliensis</i> E EXTRATO SALIVAR	31
3.12	FIXAÇÃO DAS CÉLULAS E PREPARO DA PLACA PARA ANÁLISE	31
3.13	DESENHO DO EXPERIMENTO.....	32

3.14	CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS NO EQUIPAMENTO OPERETTA.....	33
3.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Nyssomyia neivai</i>	34
4.2	PADRONIZAÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS E AMASTIGOTAS NO EQUIPAMENTO OPERETTA.....	35
4.3	INFECÇÃO COM A GLÂNDULA SALIVAR DE <i>Nyssomyia neivai</i>	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXO I - PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS	54
	ANEXO II - PREPARO DE MEIO SCHNEIDER PARA CULTIVO DE <i>Leishmania</i>	55
	ANEXO III - PREPARO DE MEIO RPMI 1640 PARA CULTIVO DE THP-1	56
	ANEXO IV - FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DE CÉLULAS E AMASTIGOTAS COM NILE RED E HOECHST	57
	ANEXO V - CONTAGEM DE <i>Leishmania</i> E CÉLULAS THP-1	58
	ANEXO VI - CONGELAMENTO DE <i>Leishmania</i> E THP-1	60
	ANEXO VII - DESCONGELAMENTO DE <i>Leishmania</i> E THP-1	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Mayrink et al. 2006; Pirajá e Lucheis 2014) e possui casos descritos em grande parte do mundo (Veloso et al. 2017). A LT é endêmica em mais de 80 países (Desjeux 2004; Kamhawi 2006; Pirajá e Lucheis 2014) e por haver poucas alternativas de tratamento e falta de controle, é considerada negligenciada (Duarte et al. 2012; Marcelino et al. 2017; Reithinger et al. 2007). Nas Américas é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) devido à algumas particularidades da epidemiologia da doença e dos parasitos com destaque para a *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. panamensis* (Gontijo e Carvalho 2003). O Brasil é o país de maior diversidade desses parasitos (Killick-Kendrick 2003), possui um alto número de casos e, nos casos mais severos, morbidade (Brasil 2017), o que justificaria a doença ser um grande problema de Saúde Pública no país. Sendo assim, está diretamente ligada a regiões de alto índice de pobreza; além de mudanças ambientais e migração da população (WHO 2018). Estima-se que a cada ano sejam reportados cerca de 60.000 casos de LT em todo o mundo e o tratamento torna-se mais complicado quando o paciente já possui doenças imunodeprimidas, como a AIDS, causada pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (WHO 2018). Uma vez com o sistema imune deficiente, a progressão da LT é facilitada (MS 2016).

As espécies de *Leishmania* são transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada da fêmea do flebotomíneo (subfamília Phlebotominae) infectada com os parasitos durante o repasto sanguíneo (Lainson et al. 1994; Conceição-Silva e Alves 2014; Marcelino et al. 2017). Há aproximadamente 500 espécies de flebotomíneos conhecidas nas Américas, e cerca de 40 dessas podem ser transmissores de espécies de *Leishmania* (Jacques 2014; Pirajá e Lucheis 2014). A hematofagia é característica das fêmeas, uma vez que elas necessitam do sangue dos vertebrados para maturar seus ovários (Dias et al. 2003 e Tanure et al. 2015). O fato desse inseto participar da eco-epidemiologia da LT, além de suas picadas desencadearem uma série de reações alérgicas, designa a ele um grande interesse médico-veterinário (Sherlock 2003).

A manifestação da patologia pode se dar em diferentes graus de lesões cutâneas e/ou nas mucosas (Duarte et al. 2012; Conceição-Silva e Alves 2014; MS 2016), as quais se formam a partir do local da picada (Gontijo e Carvalho 2003). Enquanto a forma cutânea é caracterizada pela formação de lesões arredondadas com borda elevada, de base avermelhada, granulações e/ou secreções; a forma mucosa apresenta lesões mais destrutivas podendo haver complicações no decorrer da doença, e essas ocorrem quando o paciente não é tratado ou quando esse não responde bem aos tratamentos. Entre essas complicações, podem ser destacadas a sinusite, rinite e broncopneumonia, desencadeadas por lesões na mucosa nasal; sialorreia, dificuldade de deglutição com conseqüente desnutrição, causadas por lesões na boca e/ou faringe; e perda do olho ou distorções da fenda ocular como ocorrência de lesões conjuntivais. Como outras gravidades, ainda, podem ser desenvolvidos casos de miíase e meningite (MS 2016).

Entre os diagnósticos disponíveis no nosso país, estão inclusos os exames parasitológicos, nos quais verificam-se a presença de amastigotas em esfregaços de lesão; imunológicos, como a sorologia ou intradermorreação de Montenegro (IDRM); e molecular, no qual se procede a reação em cadeia da polimerase (PCR), verificando se há a existência de material genético parasitário na amostra a ser testada (MS 2016).

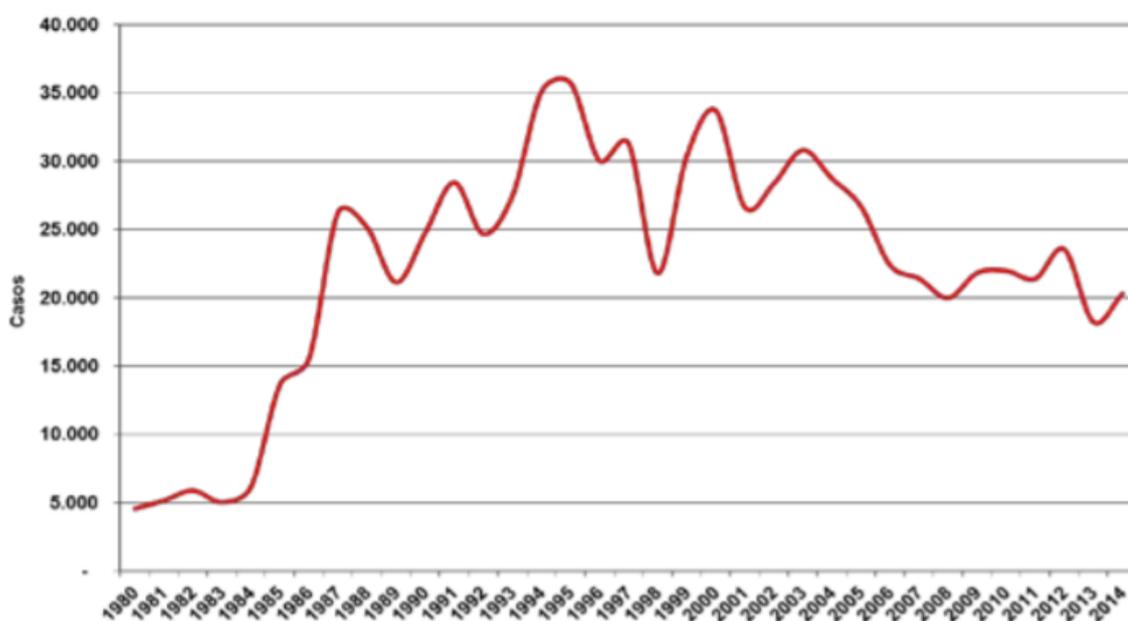
O tratamento de eleição para essa doença é o antimonial pentavalente (Ribeiro et al. 1999; Andersen et al. 2005), o qual é aplicado no paciente de forma endovenosa ou intramuscular. A duração do tratamento pode levar de 20 a 30 dias, dependendo da manifestação clínica. Após o tratamento, deve ser feito um acompanhamento no paciente por pelo menos 3 meses, objetivando avaliar uma possível reincidência da doença. Além desse tratamento, outros podem ser empregados quando o primeiro não surge efeito. O desoxicolato de anfotericina B, a anfotericina B lipossomal e o isotionato de pentamidina são exemplos (MS 2016).

O paciente é considerado como curado quando as lesões ulceradas são completamente epitelizadas em até 3 meses após o tratamento, podendo se estender por até 6 meses de acordo com o grau da lesão (MS 2016).

No Brasil, o início do controle epidemiológico deu-se a partir da década de 80. A progressão da LTA no território nacional não é linear, possui muitas oscilações ao longo dos anos (Figura 1). Não se sabe ao certo o motivo dessa variação, mas isso provavelmente se deve a mudanças climáticas e alterações etológicas do vetor,

o qual vem apresentando maior adaptação a ambientes antropizados (Andrade et al. 2007). Os casos vêm aumentando ao longo das décadas (Brazil e Brazil 2003; Sherlock 2003; Desjeux 2004; MS 2016), portanto o combate à doença é algo que deve ser persistente (Duarte et al. 2012). Ainda, a cada cinco anos percebe-se que ocorrem picos de transmissão. No período analisado, a maior incidência da doença no território nacional ocorreu em 1995, com mais de 35.000 casos confirmados (Brasil 2017).

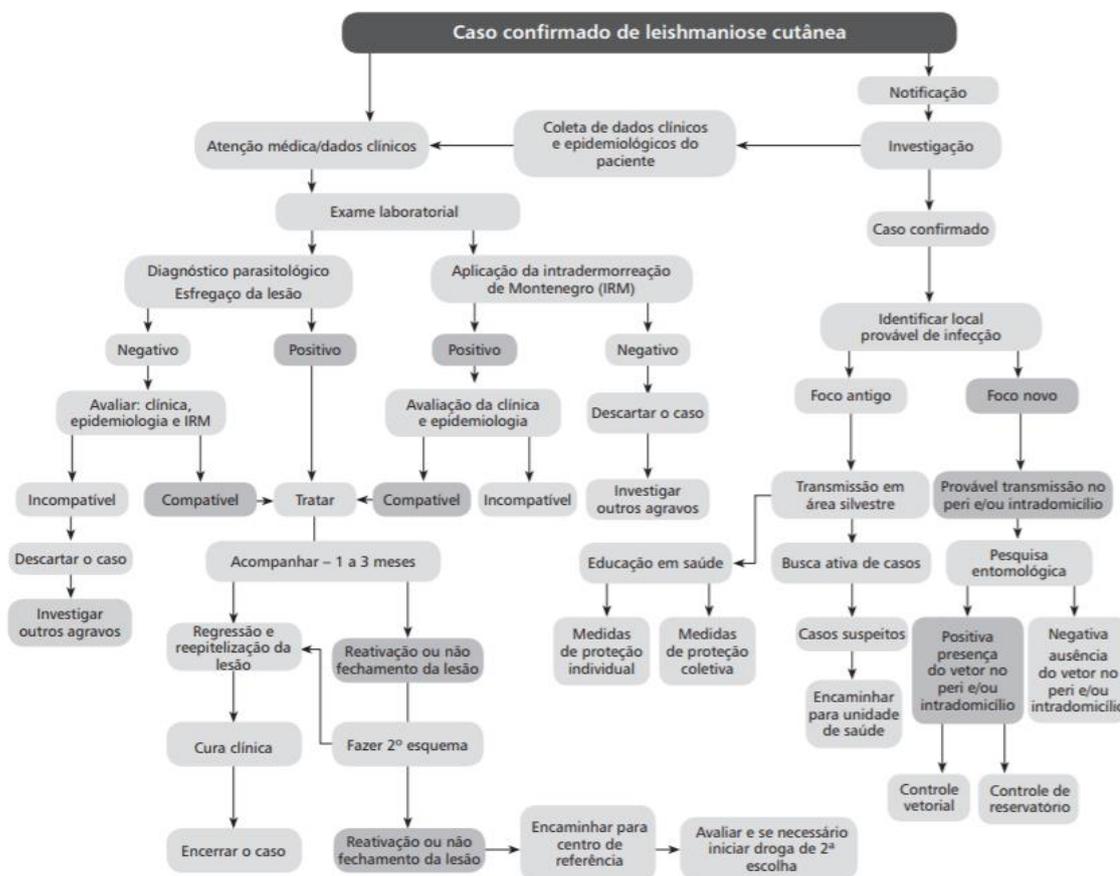
FIGURA 1: CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NO TERRITÓRIO NACIONAL ENTRE 1980 E 2014



FONTE: BRASIL (2017).

A Vigilância Epidemiológica nesse contexto faz-se essencial, uma vez que é através desse processo que são apontados os locais mais propícios a apresentarem casos da doença. Além disso, pacientes que não conhecem a doença podem ser diagnosticados e tratados. A investigação da LTA busca investigar áreas endêmicas, bem como adotar medidas preventivas e terapêuticas. Essa tarefa é feita conforme esquematizado na Figura 2.

FIGURA 2: INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL



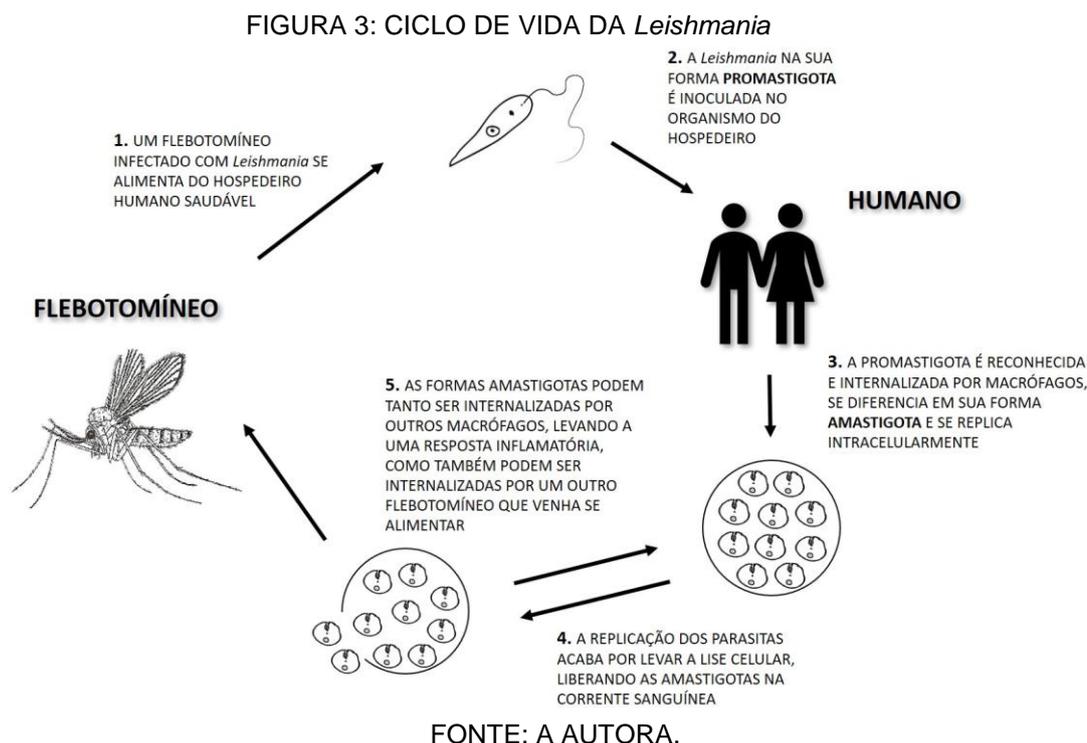
FONTE: BRASIL (2016).

1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

Os agentes causadores da Leishmaniose Tegumentar Americana são protistas do gênero *Leishmania*, o qual fora descrito pelo médico britânico Ronald Ross (1903). Esse parasito é heteroxênico (Mayrink et al. 2006), ou seja, alterna seu ciclo de vida em hospedeiros invertebrados e vertebrados (Kamhawi 2006; Conceição-Silva e Alves 2014). No hospedeiro vertebrado, o protozoário assume a forma de amastigota, haja vista que é a forma intracelular. Esse tipo de parasito possui atração mais específica por macrófagos (Handman e Bullen 2002), o qual é reconhecido e fagocitado por essas células (Brasil 2017). Essa forma é resistente à digestão pelos macrófagos, e uma vez dentro da célula do hospedeiro vertebrado, ele passará a se replicar, podendo levar à lise celular (Figura 3). Essas amastigotas liberadas podem ser novamente fagocitadas, desencadeando uma reação

inflamatória, principal responsável pelos sintomas. No hospedeiro invertebrado, assume a forma de promastigota. Esse estágio se altera proporcionalmente com a capacidade infectiva do parasito. No intestino médio do flebotomíneo, as formas amastigotas ingeridas a partir do repasto sanguíneo converter-se-ão em promastigotas procíclicas, características por apresentarem alto potencial replicativo, procedendo a metaciclogênese para tal finalidade (Sousa e Bou-Habib 2007). Entre dois e cinco dias após a infecção, essas formas darão origem a outros tipos de promastigotas, denominados nectomonas. Na porção abdominal do intestino, essas são capazes de aderir-se as microvilosidades com o auxílio do flagelo. Em seguida, os parasitos passam por uma nova mudança na morfologia, originando haptomonas e paramastigotas, as quais são encontradas na porção torácica do intestino (Tempone et al. 2014). Uma vez que ele atinge o grau de promastigota metacíclico, ele está com uma maior capacidade de infecção (Soares e Leon 2014), que ocorre em média cinco dias após o contato inicial com o hospedeiro invertebrado. Essas formas metacíclicas são caracterizadas pela redução do corpo celular, por um longo flagelo e alta motilidade (Kamhawi 2006); e uma vez assumida essa forma, não são mais capazes de se replicar. Os promastigotas metacíclicos ocupam a válvula estomodeal, fazendo com que o sangue não seja bombeado corretamente. Isso irá induzir o acúmulo de parasitos nas porções anteriores do intestino, o que vem a aumentar a capacidade de transmissão em próximos repastos sanguíneos (Tempone et al. 2014). O vetor possui glicoproteínas e outras moléculas em seu intestino que interagem com a superfície do parasito, permitindo permanecer nesse ambiente (Guimarães 2017).

Esses parasitos possuem em seu corpo celular uma estrutura presente unicamente nos organismos da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto. Trata-se de um DNA extranuclear (kDNA), o qual é formado por moléculas que constituem maxicírculos e minicírculos. Esses, ainda, possuem sua própria maquinaria de replicação. Essa estrutura está localizada próxima ao corpo basal, sendo que alguns são responsáveis por codificar para RNA ribossomais (Morris et al. 2001).



1.3 BIOLOGIA E ETOLOGIA DOS VETORES

Os vetores dos parasitos causadores da LTA pertencem à família Psychodidae e a subfamília Phlebotominae. São vulgarmente chamados de flebotomíneos, mosquito palha, tatuquira, birigui, cangalhinha (Mayrink et al. 2006), de acordo com a região em que se encontram (MS 2016). Reproduzem-se em locais com acúmulo de matéria orgânica, e tendem a se concentrar onde há presença de animais domésticos (Teodoro et al. 2001; Souza et al. 2014). Trata-se de pequenos insetos medindo de dois a três milímetros de comprimento (Tempone et al. 2014). São insetos holometábolos, compreendendo um ciclo vital com presença de ovo, quatro estádios larvais, formação de pupa, seguido pelo adulto, macho e fêmea (Brazil e Brazil 2003; Tempone et al. 2014). O processo de desenvolvimento desses animais, do ovo ao adulto, leva em média 40 dias (Brazil e Brazil 2003).

1.3.1 Fases do desenvolvimento de Flebotomíneos

1.3.1.1 Ovo

Os ovos de flebotomíneos apresentam formas elipsoides, possuem cor esbranquiçada no momento da postura e torna-se escura depois de algumas horas. Medem de 300-500 µm de comprimento por 70-150µm de largura, variando com a espécie (Tempone et al. 2014). Uma fêmea é capaz de realizar a postura de até 40 ovos, os quais ficam aderentes ao substrato devido a uma substância produzida pelas glândulas acessórias. Essa substância confere impermeabilização à água e pode agir como feromônio da oviposição (Brazil e Brazil 2003). Esse processo geralmente é traumático para as fêmeas, considerando o tamanho dos ovos em relação ao tamanho do adulto. Assim, muitas fêmeas morrem após fazê-lo (Volf e Volfova 2011).

1.3.1.2 Larvas

A divisão do corpo é feita em cabeça, tórax e abdome, formando 13 segmentos: 1 referente à cabeça, 3 referentes ao tórax e 9 referentes ao abdômen (Brazil e Brazil 2003).

Possuem aparência vermiforme e cor hialina, sendo que com a evolução dos estádios, tornam-se sutilmente mais escuras. São dotadas de cerdas táteis na porção posterior, as quais são responsáveis pela percepção do ambiente. O primeiro estágio larval possui um par dessas cerdas, enquanto os demais possuem dois pares. Esses estão localizados no nono segmento, o qual é responsável pela fixação da larva ao substrato para dar início à formação da pupa (Brazil e Brazil 2003).

O corpo é dotado de “falsas pernas” na região ventral, responsável pela locomoção, bem como de cerdas laterais. Possuem antenas na região anterior, e o aparelho bucal é do tipo triturador (Brazil e Brazil 2003).

Alimentam-se naturalmente da casca dos ovos e de matérias orgânicas em decomposição (incluindo adultos e larvas mortas). (Brazil e Brazil 2003; Tempone et al. 2014).

1.3.1.3 Pupa

As pupas recém-formadas possuem aspecto hialino, o qual torna-se mais escuro a medida que vai envelhecendo. Quando o adulto está prestes a emergir, tornam-se escurecidas.

A cabeça funde-se ao tórax, formando um cefalotórax de quatro segmentos e o abdômen persistem com 9 segmentos.

As pupas permanecem fixadas ao substrato a partir da exúvia do quarto estágio larvar, e são capazes de realizar movimentos de extensão e flexão do corpo. (Brazil e Brazil 2003).

1.3.1.4 Adulto

Os machos geralmente emergem mais cedo que as fêmeas (Oliveira et al. 2010). Os adultos são pouco ativos ao emergirem da pupa. Ao nascer, os machos necessitam de um período de 24 horas para poder proceder a cópula, uma vez que os seus apêndices genitais se encontram dobrados, necessitando de uma rotação de 180° para tornarem-se sexualmente maduros. Votýpka e seus colaboradores (2015) demonstraram que esse período pode variar de 12 a 33 horas.

Machos e fêmeas possuem dimorfismo sexual. A probóscide da fêmea é mais longa e adaptada para picada e sucção, já que possuem hábitos hematófagos. Elas apresentam, ainda, um conjunto de estruturas quitinizadas chamadas cibário (Brazil e Brazil 2003; Tempone et al. 2014), localizado no interior da cabeça. Essas estruturas estão ligadas à hematofagia.

Os adultos são mais ativos que as larvas, pois exercem atividades de voo, acasalamento e postura. Por isso, precisam de uma fonte constante de carboidratos, encontrada principalmente na seiva de vegetais. A hematofagia é praticada exclusivamente pelas fêmeas, uma vez que é necessário para que ocorra a maturação dos ovários (Dias et al. 2003; Tanure et al. 2015). As peças bucais não permitem uma penetração profunda na pele dos hospedeiros, mas leva à laceração da pele e ao desencadeamento de uma pequena hemorragia subcutânea, através da qual conseguem sugar o sangue. Os flebotomíneos são atraídos a sugar o sangue do hospedeiro devido à sua temperatura e odor. São mais ativos nos períodos de crepúsculo e noturno, e durante o dia permanecem em seus abrigos (Brazil e Brazil 2003).

1.4 SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Muitos estudos, envolvendo várias doenças transmitidas por insetos, investigam a possibilidade de a saliva influenciar na capacidade de infecção de agentes patogênicos, bem como de provocar alterações na resposta imune (Gomes et al. 2012, 2016) e fisiológicas (Tempone et al. 2014) do hospedeiro vertebrado.

A saliva dos flebotomíneos é dotada de muitas propriedades farmacológicas que têm a capacidade de alterar a forma como o sistema imunológico dos hospedeiros responde ao parasito (Gomes et al. 2012) e à lesão provocada pela picada (Mendes de Souza 2012), levando a produção de anticorpos anti-saliva (Volf; Rohoušova 2001). Ela contém moléculas com propriedades anticoagulantes, as quais inibem a agregação plaquetária e vasodilatadoras, garantindo a manutenção do fluxo sanguíneo para propiciar uma alimentação mais eficiente ao inseto (Brazil e Brazil 2003). Assim, a saliva é capaz de gerar um microambiente ideal para que ocorra a alimentação do vetor e a infecção pelo parasito (Tempone et al. 2014).

Os componentes salivares de diversas espécies de flebotomíneos e seus efeitos vêm sendo muito estudados nos últimos anos (Volf e Rohoušova 2001; Vilela et al. 2006; Gomes et al. 2012, 2016), sendo que esses podem atuar em diversas etapas da disseminação da doença, sua manutenção, e até no desenvolvimento de uma vacina para prevenir essa enfermidade. Vale salientar que uma eventual vacina provinda de saliva provavelmente seria específica para um tipo de *Leishmania*, uma vez que os vetores são espécie-específicos (Volf e Rohoušova 2001). O modo de ação da saliva no organismo do hospedeiro se faz presente desde o início da interação até a progressão da doença, portanto faz-se necessário uma investigação mais aprofundada dos componentes da saliva, incluindo sua caracterização (Tempone et al. 2014).

Já foi demonstrado anteriormente que uma imunização prévia com saliva de *Nyssomyia whitmani* gera uma resposta imune que confere proteção à infecção contra *Leishmania braziliensis*. Os autores destacaram que quando é feita uma co-inoculação de saliva junto com os parasitos após a imunização, a infecção desenvolvida é menos grave do que aquela feita sem a imunização. O mesmo estudo evidenciou que pacientes moradores de áreas endêmicas para LTA, locais onde se encontra o vetor, são naturalmente mais resistentes à infecção, por apresentarem maior carga de anticorpos anti-saliva (Gomes et al. 2016). Estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes de áreas não endêmicas são mais propícios a desenvolverem formas mais severas da doença do que aqueles

pertencentes a áreas endêmicas. Isso se justifica pelo fato de os primeiros não estarem expostos a picadas de flebotomíneos (Tempone et al. 2014). Também já foi comprovado que flebotomíneos que picam hospedeiros já previamente imunizados com a saliva podem vir a desenvolver alguns problemas como diminuição da oviposição e mortalidade precoce, devido a internalização de anticorpos anti-saliva (Vilela et al. 2006).

1.5 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE *Nyssomyia neivai*.

Atualmente, a espécie mais estudada para o estudo dos constituintes salivares é a *Lutzomyia longipalpis* (Brazil e Brazil 2003; Gomes et al. 2012; Cunha et al. 2018) , sendo que um dos componentes isolados da saliva desta espécie é um vasodilatador, nomeado, portanto de Maxadilan (Lerner et al. 1991). O reconhecimento de um péptido Max-símile por anticorpos específicos confirmou a expressão de uma sequência Max em *N. neivai* coletados em Mogi Guaçu, São Paulo. Segundo os autores, níveis séricos elevados de anti-Max não protegeram pacientes contra a LTA, mas confirmou a exposição natural a picada de *N. neivai* nesta região endêmica de ATL. Assim, o estudo com *Nyssomyia neivai* se faz necessário devido à sua ampla presença em grande porção do estado do Paraná (Andrade-Filho et al. 2007).

A espécie *Nyssomyia neivai* é um dos vetores responsáveis pela transmissão *L. braziliensis*, causadora da Leishmaniose Cutânea na América do Sul (Souza et al. 2015; Goulart et al. 2017), sendo encontrada nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (Andrade-Filho et al. 2007). Está amplamente distribuída no estado do Paraná (Teodoro et al. 2001, 2007), e é mais adaptada a regiões de clima frio e seco (Marcondes et al. 1998), bem como a regiões com maior índice de antropia (Teodoro et al. 2003).

No período compreendido entre 1990 e 2016, foram reportados 687.780 casos de LTA no território brasileiro. Desses casos, 14.967 pertenciam à região Sul, a qual possui menor registro de casos no país, compreendendo apenas um pouco acima de 2% do número total das ocorrências. No entanto, dentro da região Sul, o estado do Paraná confirmou 14.217 casos, compreendendo quase 95% de toda a região Brasil (2017). Tendo em vista a sua distribuição, há uma grande possibilidade de essa espécie estar vinculada aos casos de epidemiologia de LTA no estado do

Paraná. Assim, é de interesse da saúde pública que o vetor seja bem conhecido pela população, destacando a importância do aprofundamento dos estudos sobre essa espécie, os quais ainda são escassos.

2 OBJETIVOS

Avaliar a influência da saliva do flebotômíneo da espécie *Nyssomyia neivai* sobre a capacidade infectiva de isolados humanos de *Leishmania braziliensis* do estado do Paraná.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Avaliar a influência da saliva do flebotômíneo da espécie *Nyssomyia neivai* sobre a capacidade infectiva de isolados humanos de *Leishmania braziliensis* em comparação com a cepa Referência.

2.1.2 Avaliar diferentes diluições da saliva flebotômíneo da espécie *Nyssomyia neivai* sobre a capacidade infectiva dos isolados humanos e a cepa Referência de *Leishmania braziliensis*.

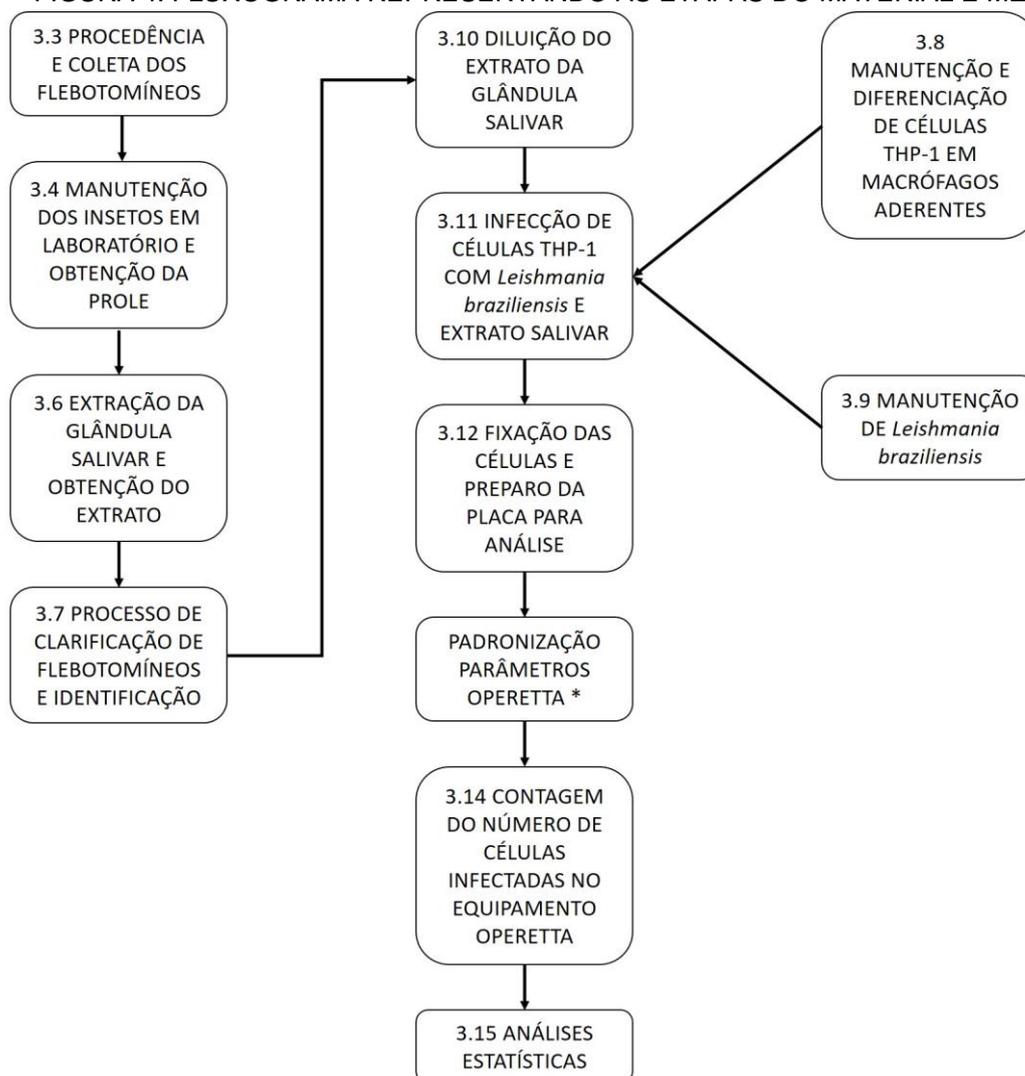
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

A partir da extração de glândulas salivares de flebotômíneos da espécie *Nyssomyia neivai* e o preparo de quatro diluições dessas, foram realizados ensaios de infecção *in vitro* em células THP-1 por 4 cepas diferentes de *Leishmania braziliensis*, procedendo posteriormente uma análise do potencial dessa saliva na inibição ou favorecimento da infecção por esses parasitos nas diferentes cepas e concentrações.

3.2 ETAPAS PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

FIGURA 4: FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DO MATERIAL E MÉTODOS



* A padronização dos parâmetros do equipamento Operetta está descrita no item 4.2 dos Resultados

3.3 PROCEDÊNCIA E COLETA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os espécimes de *Nyssomyia neivai* foram procedentes do município de Itaperuçu (25° 13' 12" S, 49° 20' 52" O), localizado na região do Vale da Ribeira do estado do Paraná.

A coleta da espécie foi realizada por meio armadilhas luminosas do tipo CDC durante o ano de 2018, as quais foram instaladas em peridomicílio de unidades domiciliares (UD), sempre na altura de 1m ou 1,5m do solo (altura entre a base da armadilha e o chão), priorizando canis ou galinheiros. Em lotes arborizados, sombreados, com folhas e frutos no chão, as armadilhas foram instaladas no quintal ou jardim, próximo a potenciais criadouros. As armadilhas foram ligadas entre 17-

18h e desligadas às 7 - 8h da manhã seguinte. O material entomológico foi levado com os insetos vivos para o Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.4 MANUTENÇÃO DOS INSETOS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DA PROLE

O estabelecimento da criação dos insetos foi realizado no Insetário do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná. Os insetos coletados em campo foram transportados para o laboratório em gaiolas entomológicas de voile cobertas com panos umedecidos para manter as condições de umidade e permitir a sobrevivência dos mesmos. Todos os espécimes foram transferidos para outra gaiola por meio de aspiração bucal (capturador de Castro).

Após esse procedimento, somente os flebotomíneos foram aspirados e acondicionados em uma nova gaiola, levando em conta a morfologia externa e a posição de pouso dos mesmos.

Nessas foram introduzidas uma alimentação à base de solução açucarada a 10% durante as primeiras 24 horas. Posteriormente, camundongos anestesiados foram colocados no interior da gaiola (Comitê de ética nº 1029) onde permaneceram por no máximo 1 hora para obtenção de fêmeas ingurgitadas. As fêmeas alimentadas foram transferidas para potes contendo gesso umedecido no fundo com tampa perfurada para que houvesse trocas gasosas (Figura 5), e vedados com uma malha de tecido "nylon" até a oviposição. Esses potes foram numerados (Figura 6) e colocados em uma caixa úmida de isopor (Figura 7). Essas condições são necessárias para que as fêmeas consigam ovipor. Esses recipientes foram checados a cada dois dias, geralmente as segundas, quartas e sextas (Goulart et al. 2017). A cada observação foram feitas anotações relatando a situação dos espécimes em cada pote. Os potes foram mantidos a, aproximadamente, uma temperatura e umidade de 25°C e 70%, respectivamente (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick 1991) e acompanhadas até a emergência dos adultos.

Após a oviposição, os ovos que estão na parede do recipiente foram cuidadosamente retirados com um pincel e colocados sobre o gesso, de modo a evitar o ressecamento.

Após o rompimento dos ovos, foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das larvas L1, L2, L3 e L4, da pupa e por fim, do adulto (Figura 9).

As larvas foram alimentadas com uma mistura autoclavada de ração de coelho, ração de peixe, restos de vegetais e fezes de coelho triturados e liofilizados (Figura 8). Esse alimento otimiza o crescimento das larvas e diminui o desenvolvimento de fungos (Goulart et al. 2015). O alimento então foi colocado nos potes, sendo repostos conforme a progressão dos estádios larvais.

FIGURA 5: POTE ONDE É FEITA A CRIAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS.



FIGURA 6: POTES NUMERADOS CONTENDO AS LARVAS DE FLEBOTOMÍNEOS.



FIGURA 7: POTES CONTENDO LARVAS DOS FLEBOTOMÍNEOS NO INTERIOR DA CAIXA DE ISOPOR.

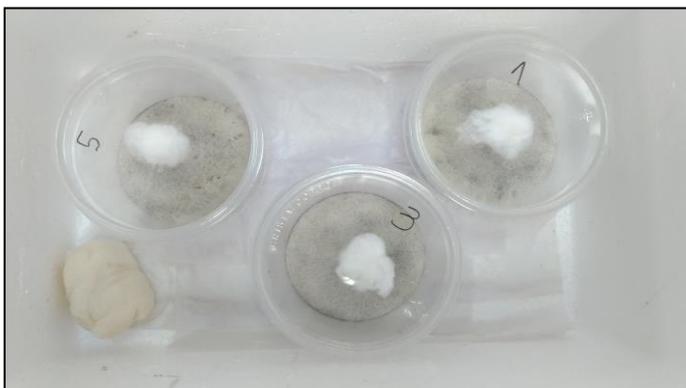


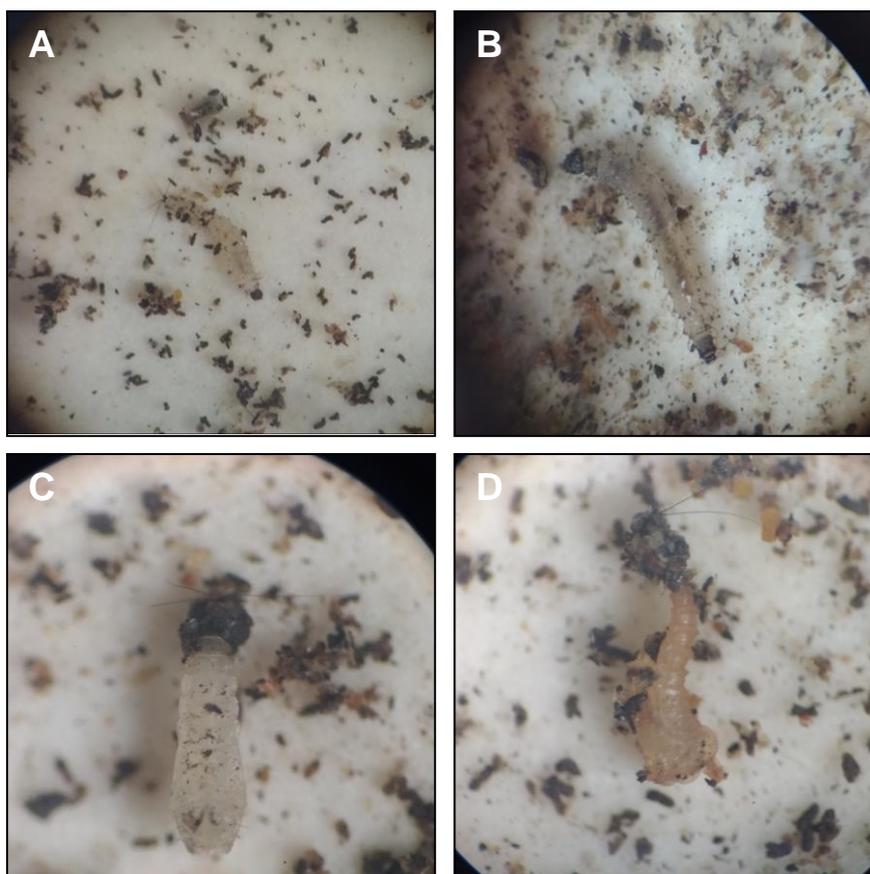
FIGURA 8: TUBO FALCON CONTENDO A PREPARAÇÃO ALIMENTAR AUTOCLAVADA DAS LARVAS (Goulart et al 2017).



3.5 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O uso de animais em laboratório para alimentação dos flebotomíneos foi aprovado (n° 1029) pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) sob número do processo 23075.158670/2016-11.

FIGURA 9: ESTÁGIOS LARVAIS EM L3 (A) E L4 (B), PUPA JOVEM (C) E PUPA MADURA (D)



3.6 EXTRAÇÃO DA GLÂNDULA SALIVAR E OBTENÇÃO DO EXTRATO

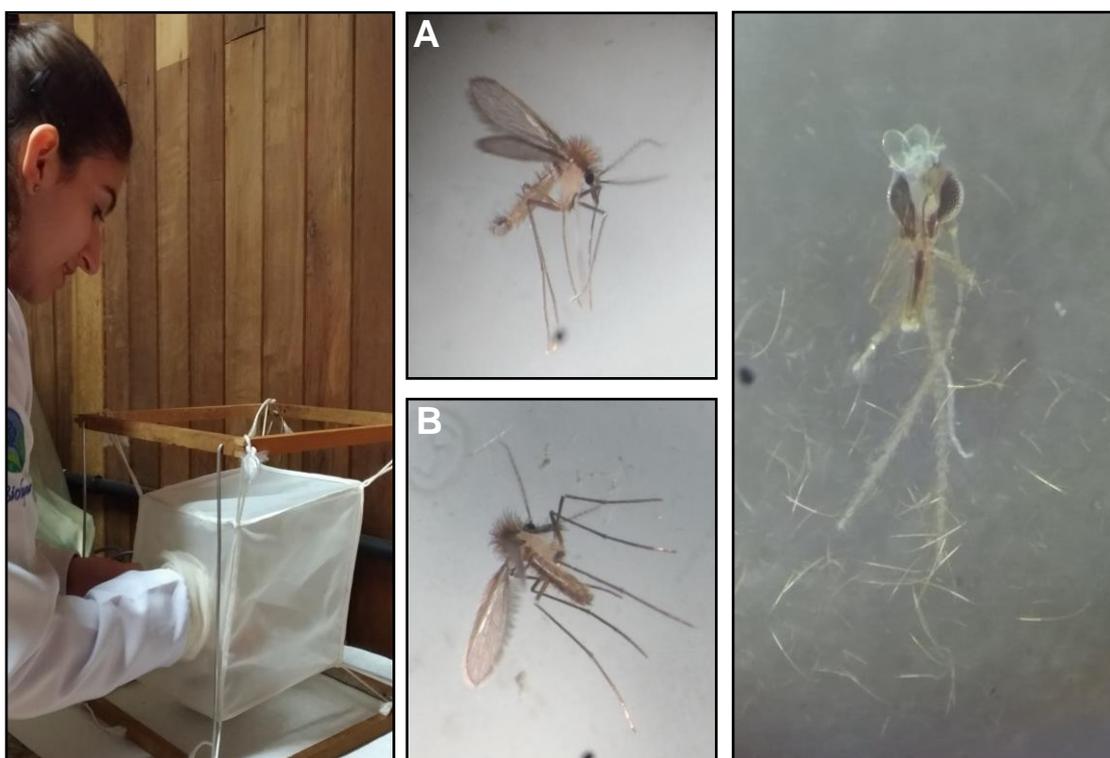
A geração parental não foi utilizada para a extração da glândula, pois não se sabe se o flebotômíneo está infectado com algum microorganismo (p ex. *Leishmania*). Como não há transmissão transovariana nesses insetos, a primeira geração (F1) pôde ser utilizada com segurança para este fim.

Após a emergência dos adultos, os mesmos foram colocados em gaiolas e alimentados com solução açucarada embebida em algodão por um período de 3 a 5 dias conforme descrito por Bezerra e Teixeira (2001). Os flebotômíneos foram soltos no interior da gaiola de voile (Figura 10) e posteriormente aspirados por um capturador de Oliveira Castro. Eles foram anestesiados à temperatura de -20°C , para seleção das fêmeas (Figura 11B) e posterior dissecação. Para tal processo, com o auxílio de uma lupa, foi utilizado um par de estiletes entomológicos: um para a fixação do inseto pelo tórax e o outro para remoção da cabeça (Francesquini 2013). As glândulas salivares são transparentes e de difícil manuseio, sendo que se corre o

risco de haver o rompimento durante a manipulação dessas. Sendo assim, cada par de glândulas foi retirado juntamente com a cabeça do flebotomíneo (Figura 12), seguindo o proposto por Hosseini-Vasoukolaei et al. (2016), acondicionados em 200 μ l de meio RPMI e levados para armazenamento em freezer a -80°C , com um código específico. Tendo em vista que este trabalho visava a análise exclusiva das glândulas salivares, esse método foi repetido para a remoção da cabeça sem as glândulas salivares, para posterior análise em um grupo controle.

O corpo daquele espécime (tórax e abdômen) foi armazenado em álcool 70% e passou por um processo de clarificação conforme descrito no item 3.5. Posteriormente, foi feita a montagem entre lâmina e lamínula para identificação específica em microscópio ótico (Galati 2017). Após a determinação da espécie, a mesma recebeu o código correspondente àquele da glândula + cabeça determinando a espécie *N. neivai*, alvo do estudo.

DA ESQUERDA PARA A DIREITA: FIGURA 10: LIBERAÇÃO DOS ADULTOS NA GAIOLA DE VOILE; FIGURA 11: A) MACHO B) FÊMEA; FIGURA 12: CABEÇA DO FLEBOTOMÍNEO EVIDENCIANDO O PAR DE GLÂNDULAS SALIVARES.



3.7 PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS E IDENTIFICAÇÃO

As fêmeas de flebotomíneos foram submetidas ao processo de clarificação descrito por Forattini et al. (1973) (ANEXO I). Os insetos, que estavam preservados em álcool 70%, foram colocados em poços de uma placa de toque de porcelana, material que não reage com as soluções utilizadas no processo.

Primeiramente, foi adicionada uma solução de Hidróxido de Potássio 10%, popularmente chamada de Potassa. Essa solução clarifica e amolece a quitina, material que compõe o exoesqueleto dos insetos. Essa solução agiu por 24h.

Em seguida, a Potassa foi retirada e foi adicionada uma solução de ácido acético 10%, seguida de ácido acético 100%. Essa etapa consistiu na interrupção da reação da Potassa, e o uso de duas concentrações se fez necessário para que não tenha ocorrido deformação do material.

Feito isso, deu-se início ao processo de desidratação seriada do material. Essa etapa foi feita através de uma lavagem seriada com álcool em diferentes concentrações, partindo-se de 70%, passando por 80% e 90%, e encerrando com 100%. Em cada lavagem, o álcool ficou agindo por 10 minutos.

Finalizando, o álcool foi retirado dos poços e foi adicionado Eugenol sobre os Flebotomíneos. Essa última etapa consistiu em uma técnica de diafanização, a qual permite uma melhor visualização interna do material que está sendo estudado. Trata-se de uma substância que clarifica e conserva o espécime.

Em seguida, o material foi montado em uma lâmina para observação ao microscópio e posterior identificação. Para isso, foi utilizado um meio de montagem chamado NC, e em seguida foi colocada uma lamínula sobre o espécime.

3.8 MANUTENÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS ADERENTES

As células THP-1 são células humanas pertencentes a uma linhagem de monócitos derivados de pacientes portadores de leucemia.

Essas células foram mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO₂, tendo sido cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma-Aldrich) (ANEXO III) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) e antibiótico.

Os repiques foram feitos de 3 em 3 dias, de modo a garantir a viabilidade e a integridade das células.

Para proceder a diferenciação dessas células em macrófagos aderentes, essas foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma densidade de 5×10^4 células por poço (Contagem - ANEXO V) com meio RPMI junto de 100nM de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), um reagente que ativa proteínas Quinases C (PKC).

Foi feita uma incubação nas mesmas condições do cultivo por 48h. Após esse período, o meio de cultura das placas foi trocado por um meio RPMI novo, sem a presença do PMA, e foi feita outra incubação por 72h, período chamado de Resting.

3.9 MANUTENÇÃO DE *Leishmania braziliensis*

As cepas de *Leishmania braziliensis* que foram utilizadas no presente projeto pertencem aos isolados P1, P2 e P5, os quais foram coletados no município de Cerro Azul (24° 49' 25" S, 49° 15' 40" O); e a cepa Referência do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR). Esses parasitos serão incubados a 25°C e cultivados com meio ágar Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e meio Schneider's Insect (Sigma-Aldrich) (ANEXO II), portanto um meio bifásico. Os repiques serão semanais e feitos em uma densidade de 1×10^6 parasitos/mL.

As leishmanias foram mantidas nessa cultura de 6 a 7 dias para que elas sejam diferenciadas em suas formas promastigotas metacíclicas, as quais possuem maior capacidade de infecção e não mais se replicam.

As cepas P1, P2 e P5 foram isoladas e cedidas gentilmente pela Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR para colaboração com este estudo.

3.10 DILUIÇÃO DO EXTRATO DA GLÂNDULA SALIVAR

Como descrito no item 3.6, as glândulas foram retiradas e colocadas em meio RPMI. O protocolo de diluição foi adaptado do descrito por Araújo-Santos et al. (2010). Elas foram posteriormente armazenadas em freezer a -80°C. No momento de uso, foram submetidas a sonicação de 10.000g por 4 minutos, colhendo o

sobrenadante ao fim do processo. Foram feitas diluições de 2, 1, 0.5 e 0.25 glândulas por poço, ou seja, por 200ul de RPMI (equivalendo a 10, 5, 2.5 e 1.25 glândulas/mL, respectivamente), que é o volume que foi adicionado nos poços da placa de 96. Essas diluições foram adicionadas à quantidade de leishmanias colocadas por poço, a ser explicada no item 3.11 do presente trabalho.

3.11 INFECÇÃO DE CÉLULAS THP-1 COM *Leishmania braziliensis* E EXTRATO SALIVAR

Na placa de 96 poços onde as células THP-1 foram plaqueadas e diferenciadas, foram colocadas as leishmanias em meio RPMI de todos os isolados em um Multiplicity of Infection (MOI) de 10:1, ou seja, foram adicionados 10 parasitos por célula plaqueada, o que resulta em 5×10^5 parasitos por poço. As promastigotas foram colocadas em cultura juntamente com o extrato da glândula salivar nas concentrações explicadas no item anterior, na tentativa de mimetizar uma infecção natural pelo Flebotomíneo.

Além da infecção com o extrato das glândulas salivares junto da cabeça do flebotomíneo, foi criado um grupo controle testando apenas a infecção junto da cabeça, no objetivo de verificar a interferência de algum componente da cabeça no potencial de infecção da *Leishmania*.

3.12 FIXAÇÃO DAS CÉLULAS E PREPARO DA PLACA PARA ANÁLISE

Após 24h da infecção, a placa foi lavada 4 vezes com PBS para retirar o excesso de promastigotas que não infectaram, e que, portanto, estavam fora da célula.

Em seguida, as células foram fixadas (ANEXO IV). Para isso, foi adicionado metanol absoluto, o qual agiu por 5 minutos para preservar a morfologia das células.

Foi feita uma nova lavagem com água ultrapura após a retirada do metanol, pois alguns reagentes que foram utilizados são diluídos em PBS, e os cristais poderiam ser precipitados por resquícios do fixador e parcialmente corados pelos corantes que foram usados no processo. Isso danificaria a imagem que foi observada posteriormente e também acabaria por prejudicar a eficiência da contagem.

A próxima etapa consistiu na adição de um corante chamado Nile Red (ou Vermelho Nilo), o qual têm afinidade por lipídeos, portanto age na identificação do citoplasma da célula, que contém muitos corpos lipídicos (Greenspan et al. 1985). O corante foi diluído em uma proporção de 1:1000 em PBS, foi adicionado sobre as células e agiu por 30 minutos no escuro, por ser fluorescente. A delimitação do citoplasma é importante na etapa de contagem de células (Item 3.11).

O Nile Red tem um comprimento de onda de excitação de 552nm (verde) e de emissão, 636nm (vermelho) (ThermoFisher).

Uma nova lavagem com PBS foi necessária para que o excesso do corante fosse retirado. Em seguida, foi feita a marcação do núcleo, para que a contagem das células e das amastigotas intracelulares fosse realizada. Para tanto, usou-se um corante denominado Hoechst, o qual tem afinidade por DNA (Hanners et al. 2016). Esse corante agiu de 5 a 10 minutos, e foi retirado após esse tempo. Uma vez ligado a dsDNA (fita dupla – double strand), o corante emite fluorescência, a qual, assim como a do Nile Red, pôde ser observada por um microscópio de fluorescência.

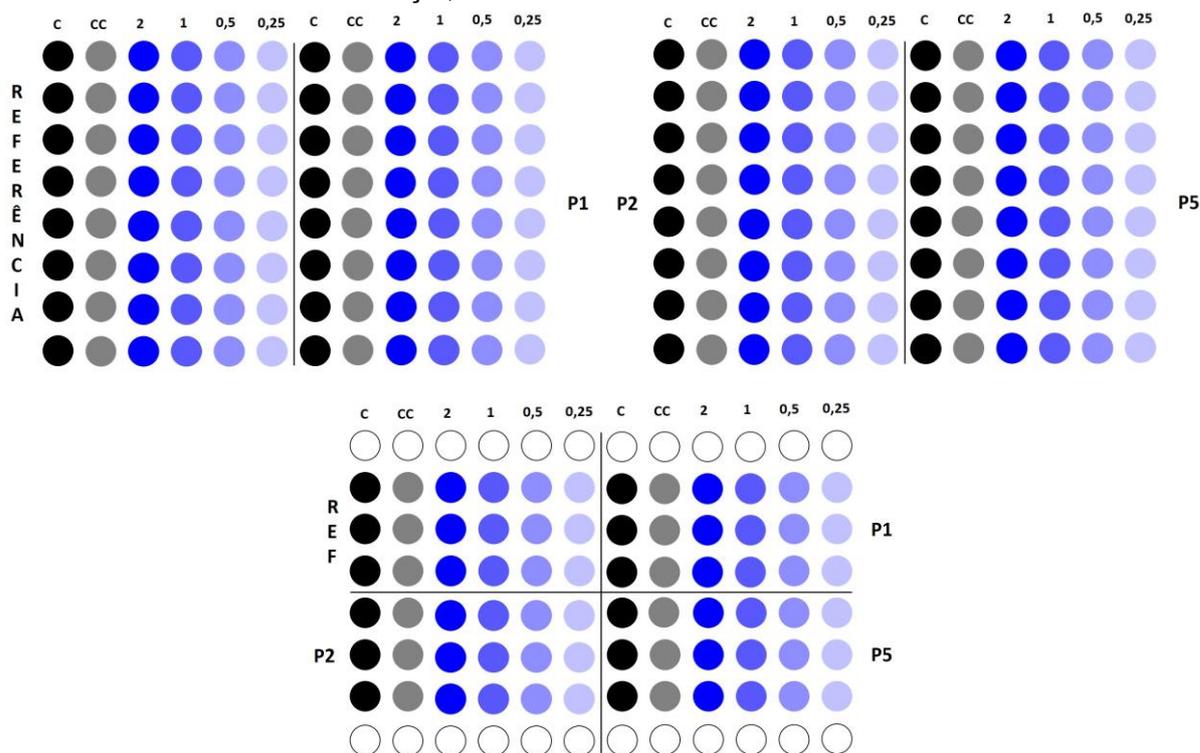
O Hoechst tem um comprimento de onda de excitação de 350nm (ultravioleta) e de emissão, 461nm (azul) (ThermoFisher).

Finalmente, foi colocado PBS nos poços para que as células não sequem e sua morfologia não seja danificada. Caso não a leitura da placa não seja feita imediatamente, deve ser armazenada em geladeira.

3.13 DESENHO DO EXPERIMENTO

As placas de 96 poços foram organizadas de maneira a realizar uma repetição de 11 poços por grupo, que foi o número máximo de repetições de acordo com a quantidade de glândulas salivares disponíveis. Assim, puderam ser analisados os 4 isolados de *L. braziliensis* nas placas. O experimento foi montado da seguinte forma:

FIGURA 13: DESENHO DO EXPERIMENTO NAS PLACAS DE 96 POÇOS. LEGENDA: C: CONTROLE; CC: CONTROLE COM A CABEÇA SEM GLÂNDULA; 2,1,0,5,0,25: NÚMERO DE GLÂNDULAS POR POÇO; REFERÊNCIA E PX: ISOLADOS DE *L. braziliensis*.



3.14 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS NO EQUIPAMENTO OPERETTA

O Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer) é um equipamento que está disponível no Instituto Carlos Chagas (ICC). Possui lentes objetivas acopladas, e, portanto, é capaz de realizar a leitura de placas de cultivo celular, bem como lâminas. O software a ele vinculado é capaz de analisar a aquisição das imagens, e após configuração das especificações da placa e dimensões das células, é capaz de realizar a contagem das mesmas, bem como das amastigotas intracelulares. Após termos procedido as etapas descritas nos itens acima, as placas de 96 poços foram submetidas à leitura pelo equipamento. Após a contagem, nos foi fornecido os dados para procedermos a análise. Com esse equipamento, foi possível comparar com mais acurácia a interferência da saliva do flebotômíneo no número de células THP-1 infectadas.

3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas no software de análises estatísticas GraphPad (Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). O presente trabalho objetiva comparar a ação da saliva em diferentes concentrações com o Controle, além de comparar entre a cepa Referência e os isolados. Portanto, foi utilizada a análise Two Way ANOVA, seguida de Bonferroni.

Foi utilizado o cálculo de intervalo de confiança (IC: 95-99%) para a desconsideração dos valores mais discrepantes.

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Nyssomyia neivai*

A identificação da espécie *Nyssomyia neivai* foi feita através da observação e morfologia da espermateca (Figura 14), a qual consiste em um par de estruturas que pode apresentar de 6 a 11 anéis. No total, 130 espécimes foram observados, e foi constatado que todos pertenciam àquela espécie. Todos os 130 espécimes tiveram suas genitálias montadas de forma permanente e os *vouchers* estão acondicionadas em caixas de lâminas no Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR.

FIGURA 14: OBSERVAÇÃO DE UM EXEMPLAR UTILIZADO NO TRABALHO. EM DESTAQUE, O PAR DE ESPERMATECAS EVIDENCIANDO QUE ESSE CONSISTE EM UM ESPÉCIME DE *Nyssomyia neivai*

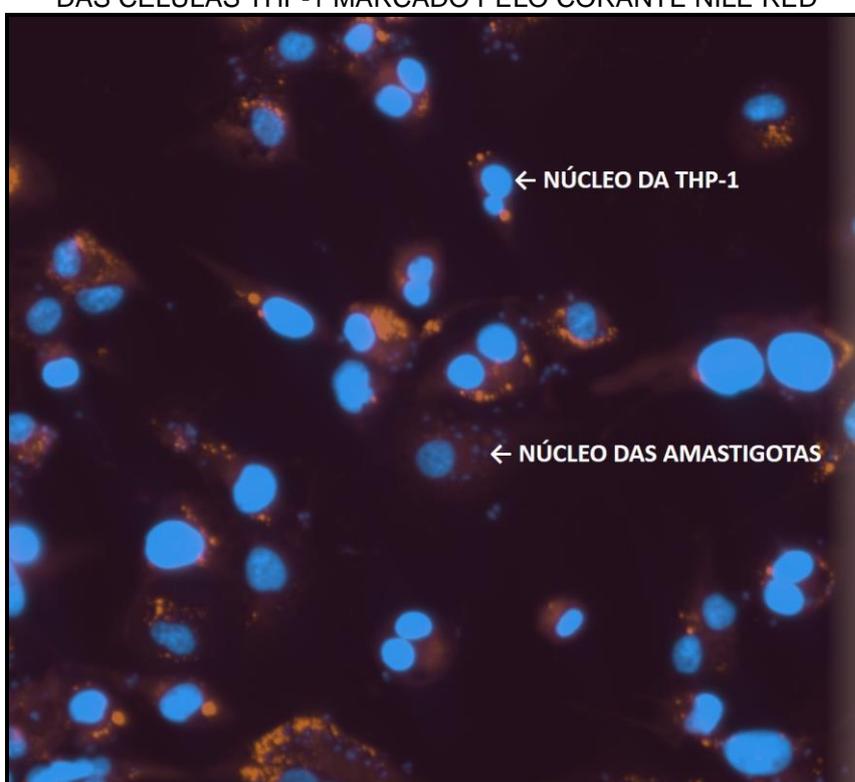


4.2 PADRONIZAÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS E AMASTIGOTAS NO EQUIPAMENTO OPERETTA

Como explicado no item 3.14, o Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer) é um equipamento que possibilita realizar a contagem de células de forma muito mais rápida e eficiente se comparado à contagem manual.

Ele permite a aquisição de imagens como um microscópio convencional, seguida pela contagem de células e amastigotas a partir destas (Figura 15).

FIGURA 15: IMAGEM FEITA PELO EQUIPAMENTO OPERETTA, EVIDENCIANDO OS NÚCLEOS DE THP-1 E DAS AMASTIGOTAS PELO CORANTE HOECHST. EM LARANJA, O CITOPLASMA DAS CÉLULAS THP-1 MARCADO PELO CORANTE NILE RED

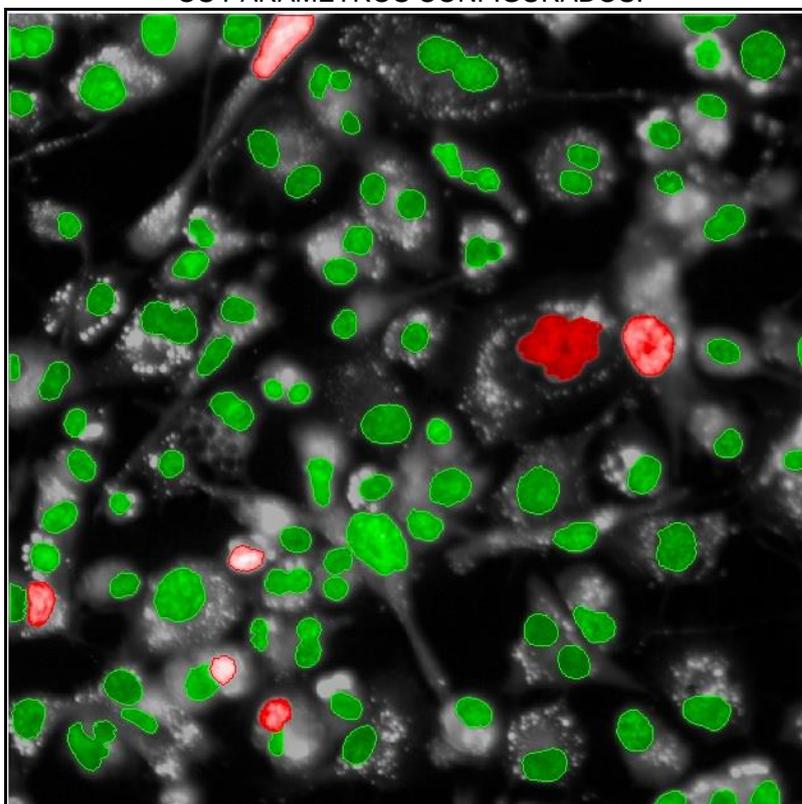


Antes da operação do equipamento, é fundamental fazer a configuração da placa de cultura que será analisada, fornecendo ao equipamento medidas como altura, largura, distância entre os poços e profundidade dos poços, as quais podem mudar consideravelmente de uma marca para a outra. Adequando essas medidas, a placa foi posicionada corretamente no interior do equipamento, o qual é totalmente automatizado. Assim, o conteúdo de cada poço foi analisado com maior confiabilidade.

Em seguida, uma série de parâmetros relacionados com as amostras biológicas foram configurados no software do equipamento. Informações como o tamanho médio e morfologia do núcleo, delimitação do citoplasma, tamanho médio e morfologia das amastigotas foram fornecidas, uma vez que o software se baseou nesses valores para fazer a análise em todos os poços. A configuração desses parâmetros foi adaptada para este trabalho com auxílio do Dr. Rafael Kessler.

O tamanho médio da área do núcleo considerado foi de $40 \mu\text{m}^3$ a $450 \mu\text{m}^3$, com uma intensidade média de fluorescência do Hoechst de 18000 (Figura 16).

FIGURA 16: UMA DAS REGIÕES DE $323 \mu\text{m} \times 323 \mu\text{m}$ EVIDENCIANDO OS NÚCLEOS ENCONTRADOS. EM VERDE, OS NÚCLEOS QUE SERÃO CONSIDERADOS NA ANÁLISE. EM VERMELHO, NÚCLEOS QUE SERÃO DESCARTADOS POR ESTAREM EM DESACORDO COM OS PARÂMETROS CONFIGURADOS.



A localização do núcleo e das amastigotas, assim como a do citoplasma, foi feita através dos filtros de fluorescência do Hoechst e Nile Red, respectivamente.

Foi possível também delimitar áreas de análise no interior do poço, dispensando a varredura dele por completo. Devido à atração do líquido do poço pelas bordas da placa, explicada pelas propriedades de adesão da água, muitas células tendem a ser atraídas para a periferia, dificultando o reconhecimento dos

limites entre uma célula e outra, haja vista que essas áreas acabam se tornando muito confluentes. Assim, foi determinado que 25 regiões no centro de cada poço seriam analisadas, onde as células encontram-se mais homoganeamente distribuídas. Cada região analisada consistiu em um quadrado com dimensões de $323\ \mu\text{m} \times 323\ \mu\text{m}$ (Figura 18 B).

Na separação dessas regiões, nem sempre as células estarão completamente acomodadas no seu interior. Quando isso ocorre, é possível que partes de uma mesma célula estejam presentes em mais do que uma região. Sendo assim, um outro parâmetro configurado foi a retirada das células localizadas nas bordas dessas regiões da análise (Figura 17), independentemente de estarem infectadas ou não.

Considerando o aspecto tridimensional de uma célula, muita informação seria perdida se apenas uma dimensão fosse considerada na análise. Sendo assim, foi programado que a leitura seria realizada em três planos (Figura 18 C), formando uma imagem única resultante da combinação desses a qual seria então submetida a análise.

FIGURA 17: UMA DAS REGIÕES DE $323\ \mu\text{m} \times 323\ \mu\text{m}$ EVIDENCIANDO AS CÉLULAS ENCONTRADAS. EM VERDE, CÉLULAS QUE SERÃO CONTABILIZADAS. EM VERMELHO, CÉLULAS QUE SERÃO DESCONSIDERADAS POR ESTAREM EM CONTATO COM A BORDA DA IMAGEM

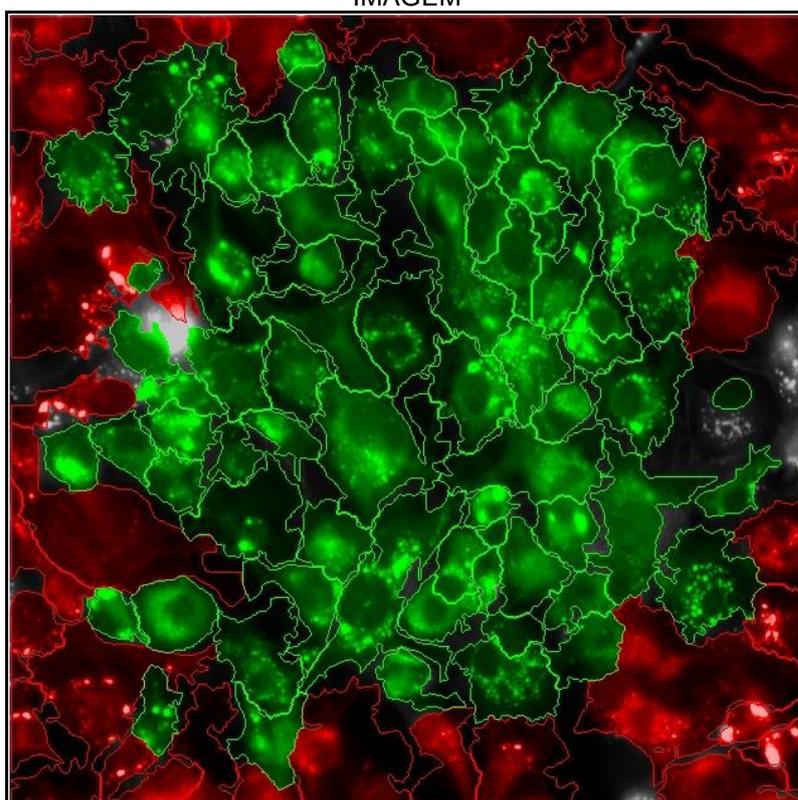
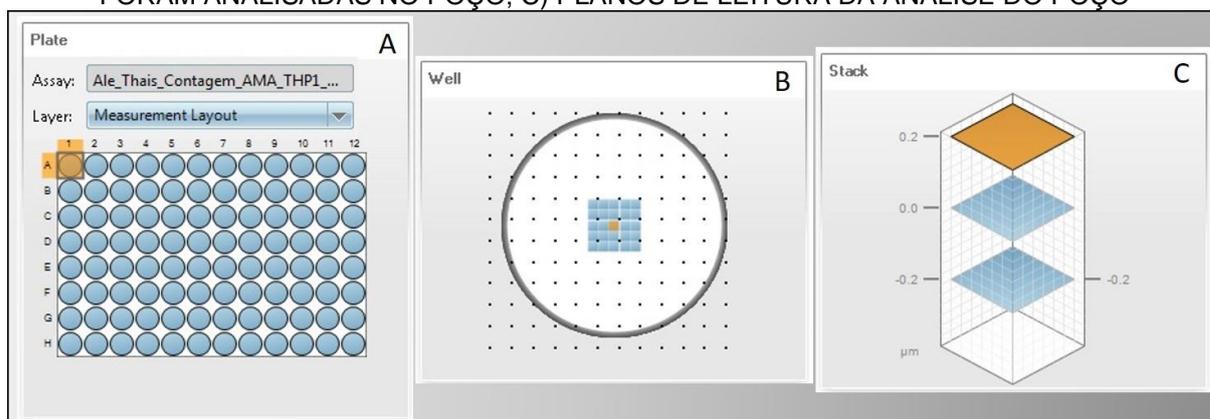


FIGURA 18: A) SELEÇÃO DOS POÇOS PARA ANÁLISE; B) DISPOSIÇÃO DAS 25 REGIÕES QUE FORAM ANALISADAS NO POÇO; C) PLANOS DE LEITURA DA ANÁLISE DO POÇO



Após configurar as informações das amostras, houve uma etapa em que foi feito o desenho da placa, com a separação dos grupos experimentais, números de células plaqueadas por poço e número de promastigotas colocadas por poço no experimento de infecção (MOI). Assim, os valores obtidos pela contagem foram alocados em uma tabela de acordo com o seu respectivo grupo experimental e cepa de *Leishmania*.

Após a leitura da placa, que leva cerca de 1h 30 min quando todos os poços estão ocupados, o software forneceu uma tabela que pode ser aberta no Excel. Essa tabela mostrou todos os valores obtidos de acordo com os parâmetros configurados antes da leitura. A partir do número total de poços, o programa também desenvolveu o cálculo da percentagem de células infectadas, o número total de amastigotas e a média de amastigotas por célula infectada.

Tendo essa tabela em mãos, foi então calculado o Índice de Infecção (IF) por poço. Esse índice é obtido através da multiplicação da média de amastigotas por célula infectada pela percentagem de células infectadas.

$$IF = \bar{\chi} \text{ (amastigotas/célula)} \times \% \text{ Células Infectadas}$$

Esse índice foi calculado para obter um equilíbrio entre situações com uma alta média de amastigotas por célula, mas baixo número de células infectadas; e o oposto, situações com baixa média de amastigotas por célula e alto número de células infectadas.

O IF é o valor que foi utilizado na realização das análises estatísticas. Cada poço analisado gerou uma média de amastigotas por célula e uma percentagem de

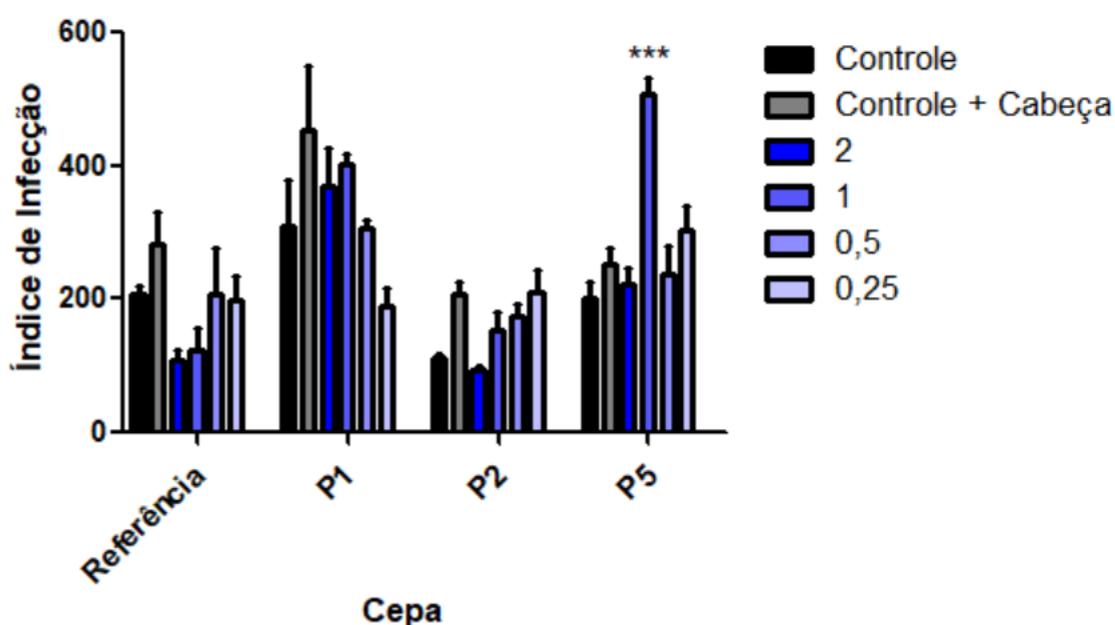
células infectadas, calculados a partir das 25 regiões do centro desse. Assim, obteve-se um Índice de Infecção por poço.

Tratando-se de uma análise totalmente automatizada após a configuração dos parâmetros, foi aceitável uma taxa de erro de aproximadamente 10% em alguns fatores como reconhecimento de amastigotas e núcleos celulares, por exemplo.

4.3 INFECÇÃO COM A GLÂNDULA SALIVAR DE *Nyssomyia neivai*

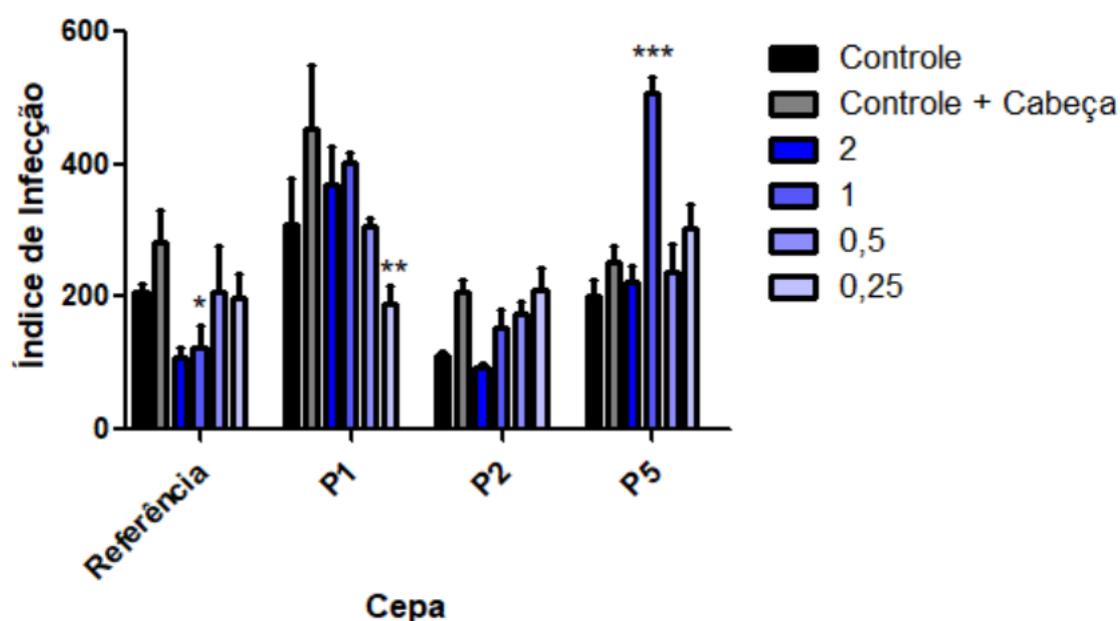
Levando em conta que no grupo Controle (infecção sem a presença de glândula salivar ou cabeça do flebotômíneo) observou-se que o índice de infecção foi maior na P1 quando havia por poço somente a cabeça (sem glândula), 1 e 2 glândulas. Essa mesma observação pôde ser feita para a P2, embora não demonstrada estatisticamente, exceto para aquela com 2 glândulas, como perfil de infectividade semelhante para a P5, na qual somente a com 1 glândula foi estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,001$) (Figura 19). Observando a Figura 19 ainda pôde-se notar que a presença da cabeça, mesmo sem a glândula (Controle + cabeça), parece interferir na infecção por *L. braziliensis* na células THP-1.

FIGURA 19: GRÁFICO REPRESENTANDO OS ÍNDICES DE INFECÇÃO OBTIDOS NAS DIFERENTES CEPAS E COMPARAÇÕES COM O GRUPO CONTROLE (**= $p < 0,001$).



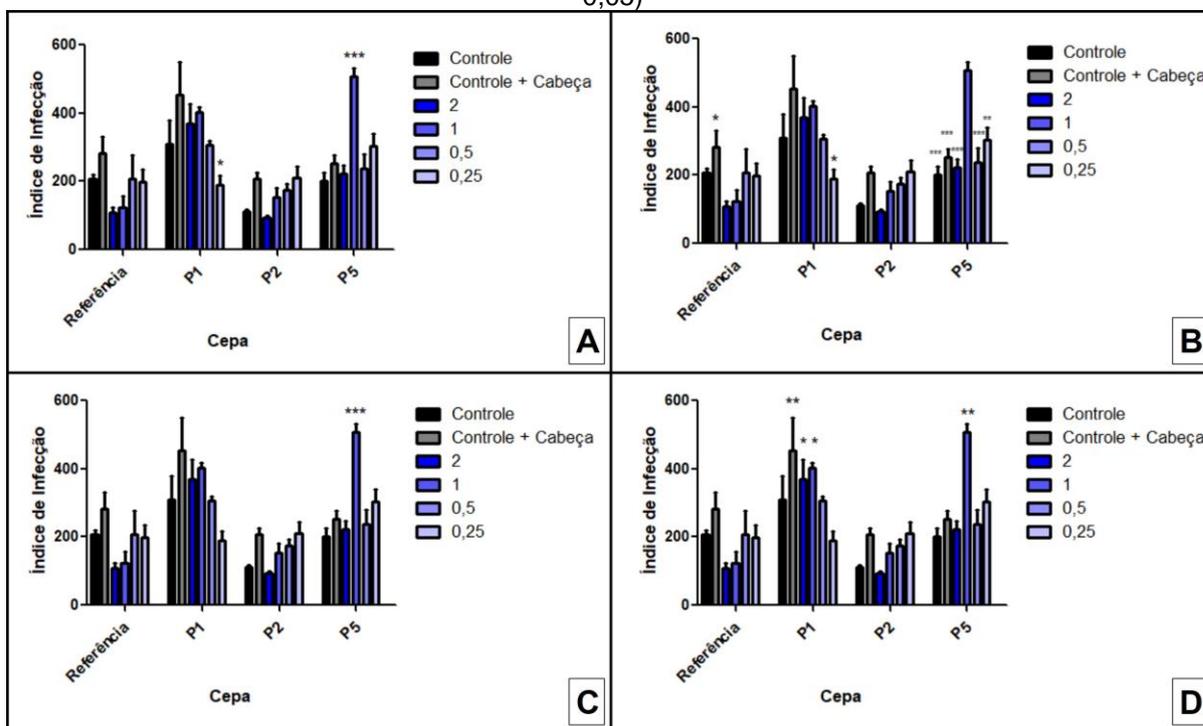
A Figura 20 ilustra os índices de infecção obtidos nas diferentes cepas quando comparados ao grupo Controle com a presença da cabeça. Assim como na Figura 19, onde se comparou com o controle, o isolado P5 apresentou diferença significativa (ANOVA, $p < 0,001$) em relação a presença da cabeça sem a glândula. No isolado P1 as concentrações de 1 glândula por poço e de 0,25 glândula por poço apresentaram menor taxa infectiva pelos parasitos, sendo observada diferença estatística naquela de menor concentração (ANOVA, $p < 0,01$). Já em relação à cepa Referência, a infecção na presença da cabeça sem a glândula foi significativamente maior do que aquela com 1 glândula por poço (ANOVA $p < 0,05$).

FIGURA 20: GRÁFICO REPRESENTANDO OS ÍNDICES DE INFECÇÃO OBTIDOS NAS DIFERENTES CEPAS E COMPARAÇÕES COM O GRUPO CONTROLE + CABEÇA (**= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$).



Em comparação entre as quatro diluições da saliva, também houveram diferenças quanto ao Índice de Infecção, demonstradas na Figura 21.

FIGURA 21: DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ÍNDICE DE INFECÇÃO ENTRE AS DILUIÇÕES DA SALIVA EM COMPARAÇÃO A: 2 GLÂNDULAS POR POÇO (A), 1 GLÂNDULA POR POÇO (B), 0,5 GLÂNDULA POR POÇO (C) E 0,25 GLÂNDULA POR POÇO (D) (**= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$)



Em comparação ao grupo de 2 glândulas por poço (Figura 21 A), em P1 a infecção causada pela concentração de 0,25 glândula por poço foi menor (ANOVA, $p < 0,05$), embora, mesmo sem diferença estatística, tenha sido menor, também, que as demais concentrações. Em P5, o grupo de 1 glândula por poço apresentou infectividade importantemente maior (ANOVA, $p < 0,001$).

Ao observar o gráfico referente as diferenças em comparação ao grupo de 1 glândula por poço (Figura 21 B), pode-se perceber que o grupo de Controle com a cabeça infectou significativamente mais na cepa Referência, enquanto que o grupo de 0,25 glândula por poço infectou significativamente menos na P1 (ANOVA, $p < 0,05$). Em P5, todos os grupos experimentais infectaram menos que 1 glândula por poço (ANOVA, $p < 0,01$ e $p < 0,001$).

A comparação com o grupo de 0,5 glândula por poço (Figura 21 C) apresentou o mesmo comportamento da comparação com o grupo Controle: esse grupo infectou consideravelmente menos que a concentração de 1 glândula por poço (ANOVA, $p < 0,001$).

P1 apresentou diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,01$ e $p < 0,05$) de infecção em comparação ao grupo de 0,25 glândula por poço (Figura 21 D). Os

grupos Controle com cabeça, 2 glândulas por poço e 1 glândula por poço obtiveram índices de infecção maior. Em P5, assim como em comparação a todas as diluições, o grupo de 1 glândula por poço infectou mais que o de 0,25 glândula por poço (ANOVA, $p < 0,01$).

Em P2, houve uma resposta dose-dependente entre os diferentes números de glândulas por poço, embora sem diferença significativa entre elas.

5 DISCUSSÃO

Biologicamente, pôde ser observado que a presença da cabeça do flebotomíneo, sem a glândula salivar ou a com a presença dessa estrutura, interferiu de alguma forma na infectividade dos isolados de *L. braziliensis* nas células THP-1. Em relação ao Controle e Controle com cabeça, a concentração de 1 glândula por poço infectou mais no isolado P5, sugerindo que essa pode ser uma diluição ideal e que favoreceria a entrada do parasito na célula.

Diversos estudos avaliaram a influência da saliva de flebotomíneos na capacidade infectiva de parasitos do gênero *Leishmania* (Gomes et al. 2012; Ockenfels et al. 2014; Tempone et al. 2014; Gomes et al. 2016). Entretanto, há estudos que fazem uso do material salivar desses insetos para outros fins. A exemplo, um trabalho envolvendo o estudo da saliva do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi* (Marzouki et al. 2015), um dos principais vetores de *Leishmania* no Velho Mundo, identificou uma proteína salivar denominada rPpSP32 que pode ser detectada por sorologia de pacientes que vivem em áreas endêmicas com a presença do vetor. Assim, todos os indivíduos que já tiveram contato com o inseto possuem anticorpos contra essa proteína, o que é muito útil para rastrear a sua distribuição espacial e controlar a dispersão da doença, bem como monitorar a exposição de pacientes em áreas endêmicas.

O primeiro estudo publicado com avaliação do efeito de glândula salivar de flebotomíneo em células humanas *in vitro* foi feito por Rogers e Titus em 2003. Tratou-se de um estudo com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano, as quais foram estimuladas pela saliva de *Phlebotomus papatasi*. Os resultados demonstraram que a saliva inibe a produção de IFN- γ , citocina responsável por induzir a ativação de macrófagos, e aumenta a de IL-6, importante para a ativação da resposta inflamatória. No entanto, a grande maioria dos trabalhos

publicados sobre este assunto são em modelos *in vivo* (Vilela et al. 2006; Gomes et al. 2016) o que limita as ferramentas para estudos *in vitro*. Curiosamente, um outro trabalho propôs que a presença da saliva aumentaria a expressão de IFN- γ , mas trata-se de um modelo *in vivo* em *Lutzomyia longipalpis* (Cunha et al. 2018). Uma possível justificativa para essa diferença é a presença de adenosina, um nucleosídeo supressor do sistema imune, na saliva de *P. papatasi* e a ausência deste em *L. longipalpis* (Gomes e Oliveira 2012).

Assim, uma das propostas deste presente trabalho foi adaptar os procedimentos de análise de infecção, a partir de diversos protocolos disponíveis para estudos *in vivo* para *in vitro*, para que se ampliasse as possibilidades de avaliação desses compostos salivares sob diferentes condições e fazendo uso de ferramentas disponíveis. Os estudos *in vitro* de glândula salivar, embora não forneçam informações precisas sobre a modulação do sistema imune, permitem obter informações através de análises mais simples e rápidas.

A extração das glândulas salivares juntamente com a cabeça do flebotômico já havia sido realizada anteriormente (Hosseini-Vasoukolaei et al. 2016), e se fez necessária pois elas são extremamente frágeis e rompem-se com facilidade. O presente estudo levou em conta essa metodologia visto que não havia muitos exemplares disponíveis devido a época do ano em que foram coletadas (Outono/2018). Esse foi o motivo que levou à elaboração de um grupo de Controle com a cabeça. Porém, esse grupo mostrou-se de grande e interessante importância. Há uma tendência, embora não demonstrada estatisticamente, em todos os grupos que o Controle com a cabeça do flebotômico tenha infectado mais do que o Controle (Figuras 19 e 20), provavelmente porque algumas proteínas ou mesmo hidrocarbonetos cuticulares (HCs), presentes na cabeça, poderiam estar interferindo de alguma forma. Seria interessante, em um estudo futuro, fazer a caracterização das proteínas ou HCs da cabeça de *Nyssomyia neivai* e verificar se há de fato essa influência e, se houver, identificar qual (is) é (são). A retirada das glândulas salivares da cabeça foi feita a partir de armazenamento em álcool 70%, e não há estudos comprovando a interferência deste solvente na composição proteica da cabeça do inseto.

Os isolados P1, P2 e P5 são originários de pacientes de Leishmaniose Tegumentar Americana do Paraná, enquanto que a cepa Referência não. Isso pode ter sido um fator para que os isolados do Paraná, com exceção de P2, tenham

tendência à uma infecção um pouco maior, já que provavelmente tenham sido transmitidos por *Nyssomyia neivai*, que é a espécie predominante de flebotomíneo no estado (Dias-Sversutti et al. 2007; Santos et al. 2018) e na área de coleta dos espécimes (AJA, comunicação pessoal). Por isso, era esperado que as 3 cepas do Paraná apresentassem comportamentos semelhantes.

Com exceção da cepa P1, observou-se que há uma tendência de que a concentração de 2 glândulas por poço tenha infectado menos que as demais concentrações. Talvez essa concentração tenha sido muito alta, prejudicando o metabolismo das leishmanias. Também em P1, verifica-se que a concentração de 0,25 foi a que menos infectou dentre todos os grupos, sugerindo que essa diluição pode ser muito baixa para provocar uma sensibilização da célula ou maior potencial infectivo pela *Leishmania*. Há estudos comprovando que a saliva aumenta a infectividade de *Leishmania* (Titus e Ribeiro 1988; Norsworthy et al. 2004).

Muitas pesquisas também avaliam o estudo da saliva como futuros agentes vacinais (Oliveira et al. 2015; Gomes et al. 2016; Wheat et al. 2017). Nesse contexto, os resultados de P5 chamam muito a atenção pois evidenciam uma grande diferença no índice de infecção entre a concentração de 1 glândula por poço e os demais grupos. Para essa cepa, foi demonstrado que uma concentração intermediária de saliva dentre as analisadas foi ideal para aumentar o potencial infectivo desses parasitos, podendo ser considerado um ponto de partida para se dar início a testes de imunização. Sabendo que durante o repasto a fêmea utiliza o volume de apenas 1 das duas glândulas que possui (Nascimento 2011), esse resultado indica que quantidades superiores ou inferiores as que são utilizadas no repasto não seriam tão eficazes. Esse isolado tem grandes possibilidades de ter sido transmitido por *Nyssomyia neivai*. A saliva é dotada de muitas substâncias farmacológicas que favorecem o repasto sanguíneo pelo inseto vetor, incluindo vasodilatadores e supressores do sistema imune (Wheat et al. 2017), bem como propriedades hemolíticas que impedem a ação do sistema complemento no dado ao intestino dos flebotomíneos (Mendes de Souza 2012). Portanto, quando o flebotomíneo se alimenta de um hospedeiro imune contra essas substâncias, ele pode sofrer perda de sua capacidade vetorial por ter suas características fisiológicas alteradas, incluindo o comprometimento da fertilidade (Vilela et al. 2006), dificultando indiretamente a transmissão dos parasitos. A imunidade contra proteínas da saliva previne infecções contra parasitos do gênero *Leishmania* (Gomes et al. 2012, 2016).

Uma das vias de aquisição da imunidade foi comprovado por Ockenfels e seus colaboradores (2014), onde demonstraram que proteínas da saliva ativam resposta imune Th1 no hospedeiro, muito importante para o combate aos patógenos.

Após serem extraídas, as glândulas foram colocadas em meio de cultura com antibiótico e armazenadas em -80°C . Antes de usar no experimento, foi feito um teste de contaminação com 5 amostras de glândulas, procedendo normalmente o protocolo de sonicação e centrifugação a 4°C . Em nenhum deles houve contaminação bacteriana. Há muitos fatores que podem estar envolvidos nisso: o antibiótico pode ter contido a replicação desses microrganismos, o congelamento pode ter matado possíveis bactérias e/ou fungos por não ter sido adicionado nenhum crioprotetor como é feito no congelamento de cultura celular, e tanto a sonicação quanto a centrifugação podem ter rompido mecanicamente a membrana desses. No entanto, mesmo sem a interferência direta de uma contaminação bacteriana nas glândulas, pode haver presença de LPS, o lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias gram-negativas, o que pode também estar interferindo nos resultados, uma vez que ele é um ativador de monócitos (Rogers e Titus 2003), os quais se diferenciam em macrófagos.

6 CONCLUSÃO

A saliva de *Nyssomyia neivai* interfere na infecção *in vitro* de *Leishmania braziliensis*, e isso pode ser observado nos resultados da cepa P5. Foi visto que essa interferência está diretamente relacionada à concentração do extrato das glândulas salivares, uma vez que altas e baixas diluições não aumentaram a infecção de forma significativa. Também foi observado que houve diferenças entre as cepas do parasito, onde isolados humanos do Paraná compreenderam maiores taxas de infecção (com exceção de P2) em comparação com a cepa Referência. Componentes estruturais da cabeça do flebotomíneo podem estar influenciando de uma forma ainda desconhecida na infecção, portanto mais estudos envolvendo essas estruturas são necessários.

Diante do exposto, o presente trabalho abre novas possibilidades para investigações futuras avaliando diversos parâmetros da presença de saliva de *N. neivai* bem como sua caracterização molecular, e sua interferência na infecção de células por *L. braziliensis*. Como estudos com essa espécie são escassos, toda

informação acrescida ao conhecimento da espécie trazem resultados de grande valia para que as pesquisas sobre esse vetor sejam ampliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, E. M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVARRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J. D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 133–137, 2005.

ANDRADE-FILHO, J. D.; GALATI, E. A B.; FALCÃO, A. L.; ANDRADE FILHO, J. D. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 481–487, 2007.

ANDRADE, A. J.; ANDRADE, M. R.; BARATA, R. A.; PINTO, M. C; DIAS, E. S; EIRAS, A. E. Quatro novos registros da fauna flebotomínica do gênero *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) do distrito rural de Brejo do Mutambal, Varzelândia, MG. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 980–983, 2007.

BRASIL, M. DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 2017.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia. **Flebotomíneos do Brasil**. p.257–265, 2003.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. Leishmanioses: uma apresentação. **Leishmanioses do Continente Americano**. p.17–24, 2014.

CUNHA, J. M.; ABBEHUSEN, M.; SUAREZ, M.; VALENZUELA, J; TEIXEIRA, C. R.; BRODSKYN, C. I. Immunization with LJM11 salivary protein protects against infection with *Leishmania braziliensis* in the presence of *Lutzomyia longipalpis* saliva. **Acta Tropica**, v. 177, p. 164–170, 2018.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAS-SVERSUTTI. Estudo Preliminar da Preferência Alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em Área Rural do Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 953–959, 2007.

DIAS, F. D. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373–1380, 2003.

COELHO-NETO, G. T.; RODRIGUES, F. M. D.; MENEZES, J. G. P. B;

GAMA, M. E. A.; GONÇALVES, E. G. R.; SILVA, A. R.; LAURENTI, M. D.; SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C. E. P.; GOMES, C. M. C. Estudo epidemiológico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana em Buriticupu, Pré-amazônia Maranhense, **Ciência e Saúde**. v.14, n.2, p. 133–138, 2012.

FERREIRA MENDES DE SOUZA, A. **Ação da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) sobre o sistema complemento de cães (*Canis familiaris*), galinhas (*Gallus gallus*) e cobaias (*Cavia porcellus*)**. 74 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de são paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 7, p. 477–52, 1973.

FRANCESQUINI, F. DE C. **Avaliação da especificidade do efeito da saliva do flebotômíneo vetor sobre a infectividade da espécie de *Leishmania*: infecção experimental de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania* (V.) *braziliensis* com a saliva de *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexus* em camundongo BALB/c**. 107 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2013.

GALATI, E. A. B. **Classificação de Phlebotominae e morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América**. 35 p. (<http://www.fsp.usp.br/egalati>). 2017

GOMES, R.; CAVALCANTI, K.; TEIXEIRA, C.; CARVALHO, A. M.; MATTOS, P. S.; CRISTAL, J. R.; MUNIZ, A. C.; MIRANDA, J. C.; OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.. Immunity to *Lutzomyia whitmani* Saliva Protects against Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2016.

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

GOMES, R.; OLIVEIRA, F.; TEIXEIRA, C.; MENESES, C.; GILMORE, D.C.; ELNAIEM, D. E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted *Leishmania* conferring ulcer-free protection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 12, p. 2735–2743, 2012.

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

GOULART, T. M.; DE CASTRO, C. F.; MACHADO, V. E.; DA ROCHA SILVA, F. B.; PINTO, M. C. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2015.

GOULART, T. M.; DA ROCHA SILVA, F. B.; MACHADO, V. E.; OLIVEIRA, W. H. C.; CASTRO, C. F.; RODRIGUES, M. V. N.; PINTO, M. C. Breeding protocol for the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. **Acta Tropica**, v. 174, p. 102–105, 2017.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile Red A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. **Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 10, p. 965–973, 1985.

GUIMARÃES, A. C. **Polimorfismos de lipofosfoglicanos (LPGs) de *Leishmania (Leishmania) major*-like isoladas no Brasil e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi***. 67f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HANNERS, N. W.; EITSON, J. L.; USUI, N.; RICHARDSON, R. B.; WEXLER, E. M.; KONOPKA, G.; SCHOGGINS, J. W. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects Report Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2315–2322, 2016.

HOSSEINI-VASOUKOLAEI, N.; IDALI, F.; KHAMESIPOUR, A.; YAGHOOB-ERSHADI, M. R.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; EDALATKHAH, H.; ARANDIAN, M. H.; MIRHENDI, H.; EMAMI, S.; JAFARI, R.; SAEIDI, Z.; JEDDI-TEHRANI, M.; AKHAVAN, A. A. Differential expression profiles of the salivary proteins SP15 and SP44 from *Phlebotomus papatasi*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1–10, 2016. Parasites & Vectors.

JACQUES, C. F. **Biologia e ecologia de flebotomíneos, vetores das leishmanioses no estado de São Paulo**. 123 f. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R. The initial establishment of sandfly colonies. **Parasitologia**, v. 33, p. 315–320, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. Prefácio. **Flebotomíneos do Brasil**. p.11–12, 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p. 435-443, 1994.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly

Lutzomyia longipalpis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266(17):11234–11236, 1991.

MARCELINO, A. P.; NOGUEIRA, P. M.; BATISTA, A. P.; FERREIRA, T. C.; AVELAR, D. M.; SANTOS, J. S. C.; MELO, M. N.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; LECLERCQ, S. Y. Desenvolvimento de produtos para o diagnóstico, o controle e o tratamento das Leishmanioses no Estado de Minas Gerais. **Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 1, n. 1, p. 31–32, 2017.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; VILELA, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 51–58, 1998.

MARZOUKI, S.; KAMMOUN-REBAI, W.; BETTAIEB, J. ABDELADHIM, M.; KACEM, S. H.; ABDELKADER, R.; GRITLI, S.; CHEMKHI, J.; ASLAN, H.; KAMHAWI, S.; SALAH, A. B.; LOUZIR, H.; VALENZUELA, J. G.; AHMED, M. B. Validation of Recombinant Salivary Protein PpSP32 as a Suitable Marker of Human Exposure to *Phlebotomus papatasi*, the Vector of *Leishmania major* in Tunisia. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1–10, 2015.

MAYRINK, W.; DE CARVALHO BOTELHO, A. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W. T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Hantavirose**. 2016.

MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; KLINGBEIL, M. M.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T.. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 453–458, 2001.

NASCIMENTO, A. A. D. S. Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae). 78f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.

OCKENFELS, B.; MICHAEL, E.; MCDOWELL, M. A. Meta-analysis of the Effects of Insect Vector Saliva on Host Immune Responses and Infection of Vector-Transmitted Pathogens: A Focus on Leishmaniasis. **Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2014.

OLIVEIRA, F.; ROWTON, E.; ASLAN, H.; GOMES, R.; CASTROVINCI, P.

A.; ALVARENGA, P. H.; ABDELADHIM, M.; TEIXEIRA, C. MENESES, C.; KLEEMAN, L. T.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; ROWLAND, T. E.; GILMORE, D.; DOUMBIA, S.; REED, S. G.; LAWYER, P. G.; ANDERSEN, J. F.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. **Science**, v. 7, n. 290, 2015.

OLIVEIRA, G. M. G. DE; FILHO, E. A. F.; ANDRADE, G. M. C.; ARAÚJO, L. A.; OLIVEIRA, M. L. G.; CUNHA, R. V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 83–94, 2010.

PRISM VERSION 5.00 FOR WINDOWS, GRAPHPAD SOFTWARE, LA JOLLA CALIFORNIA, USA. Disponível em: <www.graphpad.com>

PIRAJÁ, G. V.; LUCHEIS, S. B. A vigilância epidemiológica de flebotomíneos no planejamento de ações de controle nas leishmanioses. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 503–515, 2014.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RIBEIRO, A. L. P.; DRUMMOND, J. B.; VOLPINI, A. C.; ANDRADE, A. C.; PASSOS, V. M. A. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p. 297–301, 1999.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**, v. 25, n. February, p. 127–134, 2003.

ROSS, M. R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

DA S 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.

SANTOS, B. A.; CRISTÓVÃO, E. C.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Predominance of *Nyssomyia neivai* (Pinto) on the Islands of the Paraná River, Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 55, p. 1349–1353, 2018.

SHERLOCK, Í. A. Importância Médico-Veterinária. **Flebotomíneos do Brasil**. p.15–21, 2003.

SOARES, R. O. A.; LEON, L. Modelos de Estudo para o desenvolvimento de drogas Anti-*Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F; ALVES, C. R. **Leishmanioses**

do Continente Americano. p.413–430, 2014.

SOUSA, C. B. P. DE; BOU-HABIB, E. M. S. C. **Composição compreendendo frações ou sub-frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* denominadas Fucose Mannose Ligand (FML) e saponina, composição para preparar vacinas bloqueadoras da transmissão de leishmaniose em humanos e animais compreendendo frações ou sub-frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* (FML) e saponina, uso da composição na preparação de vacinas bloqueadoras para impedir a transmissão de leishmaniose visceral humana ou animal, uso da composição na preparação de reagentes consistindo na administração de frações ou sub-frações de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* denominadas Fucose Mannose Ligand (FML) e saponina**, n. 11, 2007.

SOUZA, G. D.; FLÔRES, C. F.; BELLO, M. I. M. R. Estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do bairro Belém Velho - Porto Alegre - RS. **Boletim epidemiológico**. p.5–8, 2015.

SOUZA, T. L.; FIGUEIREDO, F. B.; ALMEIDA, A. B.; BENIGNO, C.V.; PONTES, C. S.; SOUZA, M. B. Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 136, n. 1, p. 104–107, 2014.

TANURE, A.; PEIXOTO, J. C.; AFONSO, M. M. S.; DUARTE, R.; PINHEIRO, A. C.; COELHO, S. V. B.; BARATA, R. A. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic Leishmaniasis area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 321–324, 2015.

TEMPONE, A. J.; PITALUGA, A. N.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. Aspectos moleculares da interação Flebotomíneo-*Leishmania*. **Leishmanioses do Continente Americano**. p.159–182, 2014.

TEODORO, U.; SANTOS, D. R. S; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; KÜHL, J. B.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; NEITZKE, H. C. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2597–2604, 2007.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V.; SANTOS, D. R.; OLIVEIRA, O; POIANI, L. P.; KÜHL, J. B.; LONARDONI, M. V. C.; MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no Município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1801–1813, 2003.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J. B. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo – estado do Paraná – Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, n. 2, p. 209–233, 2001.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. **Science**, v. 9537, p. 4–6, 1988.

VELOSO, F.; FREITAS, R. A.; FIGUEIRA, L. P.; FRANCO, A. M. R. Vetores de Tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em Tabatinga, Amazonas, Brasil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p. 23–28, 2017.

VILELA, M. L.; SOUZA, N. A.; OLIVEIRA, S. M. P.; COSTA-PINTO, D.; CABELLO, P. H.; RANGEL, E. F.; TRAUB-SCEKI, Y. M. Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1A, p. 175–183, 2006.

VOLF, P.; ROHOŮŠOVA, I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 37–41, 2001.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, p. S1–S9, 2011.

VOTÝPKA, J.; PAVLASOVA, M.; VOLFOVA, V.; VOLF, P. Rotation of male genitalia in various species of phlebotomine sandfly. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 29, n. 4, p. 355–360, 2015.

WHEAT, W. H.; ARTHUN, E. N.; SPENCER, J. S.; REGAN, D. P.; TITUS, R. G.; DOW, S. W. Immunization against full-length protein and peptides from the *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary component maxadilan protects against *Leishmania major* infection in a murine model. **Vaccine**, v. 35, n. 48, p. 6611–6619, 2017.

WHO. Información general: Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.paho.org/HQ/INDEX.PHP?OPTION=COM_CONTENT&VIEW=ARTICLE&ID=9417&ITEMID=40250&LANG=EN>. Acesso em: 24/5/2018.

ANEXO I - PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS
- Adaptado de Forratini 1973 -
(METODOLOGIA UTILIZADA NA FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA – USP)

1. Com auxílio de uma pipeta pasteur, preencher os poços de uma placa de toque de porcelana com Hidróxido de Potássio 10%.
2. Colocar os flebotomíneos sobre a solução e deixar agir por 24h.
3. Retirar o Hidróxido de Potássio e colocar a solução de Ácido Acético 10%
4. Retirar o Ácido Acético 10% e colocar o Ácido Acético 100%.
5. Fazer uma lavagem seriada com álcoois 70%, 80%, 90% e 100%, deixando cada concentração agir por 10 minutos.
6. Retirar o Álcool 100%, limpar as beiradas dos poços da placa e colocar Eugenol.
7. Colocar uma gota de meio NC sobre uma lâmina limpa e posicionar adequadamente o flebotomíneo com auxílio de uma lupa.
8. Colocar uma lamínula sobre o material.
9. Deixar secar e armazenar em uma caixa de lâminas.

Para o preparo de 1L de uma solução de 10% de Hidróxido de Potássio (Potassa):
- 100g de Hidróxido de Potássio para 900 mL de água destilada.

Para o preparo de 100mL de Ácido Acético 10%:
- 10mL de Ácido Acético para 90mL de água destilada.

Para o preparo de 100mL de Álcool 70%:
- 70mL de Álcool Absoluto em 30mL de água destilada.

Para o preparo de 100mL de Álcool 80%:
- 80mL de Álcool Absoluto em 20mL de água destilada.

Para o preparo de 100mL de Álcool 90%:
- 90mL de Álcool Absoluto em 10mL de água destilada.

ANEXO II - PREPARO DE MEIO SCHNEIDER PARA CULTIVO DE *Leishmania*

Preparo de 1L a partir do meio em pó comercializado pela marca Sigma, com L-Glutamina:

1. Medir aproximadamente 800mL do volume final do meio a ser preparado com água ultrapura, entre 15°C a 20°C.
2. Adicionar o pó lentamente sobre a água, em agitação.
3. Acrescentar 0,4g de Bicarbonato de Sódio por litro de meio.
4. Deixar agitar até completa solubilização.
5. Ainda sob agitação, ajustar o pH para 9,2 utilizando uma solução de NaOH 5M.
6. Deixar agitar por 10 minutos. Nesse tempo, a solução ficará mais turva devido a mudança do pH.
7. Ajustar o pH para 6,7 +- 0,2, utilizando HCl. A solução tornar-se-á mais límpida.
8. Para cada litro de meio, preparar uma solução de Cloreto de Cálcio dissolvendo 0,6g de CaCl₂ anidro em 50mL de água ultrapura. Essa solução deve ser adicionada lentamente, sendo gotejada ao meio sob agitação para que não precipite.
9. Ajustar o meio 0,1 – 0,3 unidades abaixo de 7,2, que é o pH ideal, pois a filtração pode subir o pH.
10. Completar o volume até 1L de água purificada e filtrar utilizando sistema a vácuo, em membrana 0,22um

Antes do uso, deve ser feita a suplementação com os seguintes reagentes, que devem estar estéreis:

- 10% SFB inativado*
- 2% Urina de criança do sexo masculino
- 1% Antibiótico

* Inativação do SFB: Deixar em banho Maria a 56°C durante 30 minutos.

Em seguida, armazenar no congelador

ANEXO III - PREPARO DE MEIO RPMI 1640 PARA CULTIVO DE THP-1

Preparo de 1L a partir do meio em pó comercializado pela marca Gibco.

1. Medir 900mL do volume final do meio a ser preparado com água ultrapura.
2. Sob agitação, dissolver o conteúdo do sachê na água.
3. Acrescentar os seguintes itens e deixar até completa solubilização:
 - a. 2,5g de Glicose
 - b. 1,5g de Bicarbonato de Sódio
 - c. 2,38g de HEPES (ou 2,6g de HEPES-sódio)
 - d. 0,11g de Piruvato se Sódio
4. Ajustar o pH entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl 5M.
5. Filtrar o meio utilizando sistema a vácuo, em membrana 0,22um.
6. Adicionar 10% de SFB estéril inativado, ou seja, 100mL, completando 1L de meio.

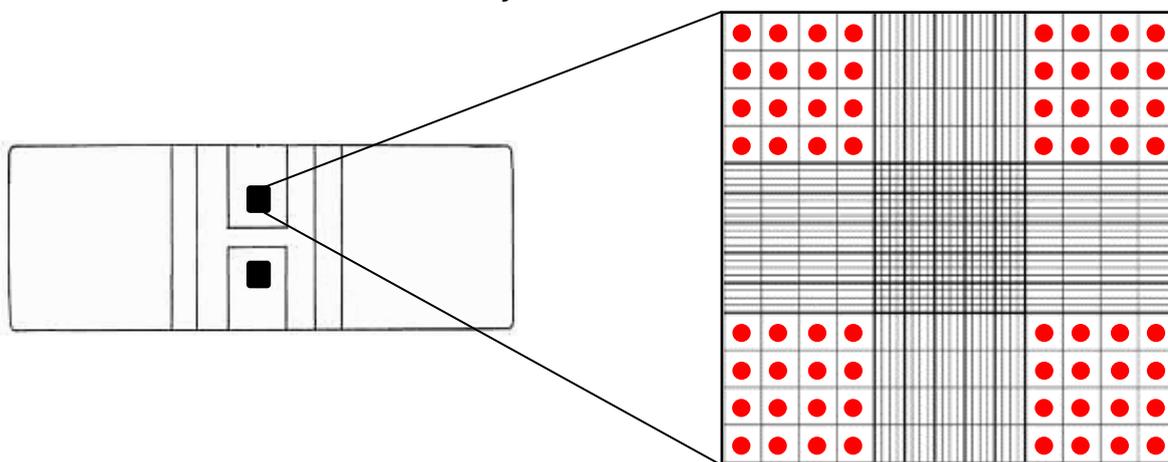
ANEXO IV - FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DE CÉLULAS E AMASTIGOTAS COM NILE RED E HOECHST

1. Retirar o meio de cultura da placa de cultura.
2. Lavar 3X com 100ul de PBS estéril [1X] por poço.
3. Adicionar 50ul de metanol por poço e deixar por 5 minutos.
4. Lavar 1X com 100ul de água ultrapura.
5. Adicionar 100ul por poço de Nile Red diluído 1:1000 em PBS [1X] e deixar agir por 30 minutos abrigado da luz.
6. Lavar 1X com 100ul de PBS [1X].
7. Adicionar 100ul de Hoechst por poço e deixar por 10 minutos.
8. Retirar o Hoechst e colocar 100ul de PBS [1X].
9. Proceder a leitura em microscópio de fluorescência ou armazenar em geladeira.

ANEXO V - CONTAGEM DE *Leishmania* E CÉLULAS THP-1

1. Ter em mãos uma câmara de Neubauer, uma lâmina fabricada com a finalidade de contagem de inúmeras linhagens celulares.
2. Colocar a lamínula sobre a câmara, de modo a cobrir as marcações que formam quadrantes na lâmina.
3. O preparo da amostra varia de acordo com a linhagem:
 - a. *Leishmania*: diluir a amostra em uma solução de paraformaldeído (PFA) 4%, de modo a facilitar a contagem dos parasitos. Essa diluição pode ser feita na proporção 1:100, colocando 990ul de PFA + 10ul de cultura.
 - b. THP-1: não é necessário diluir, a menos que a cultura esteja muito confluenta. Homogeneizar bem a cultura, pois a THP-1 é uma linhagem semi-aderente, portanto pode se aderir à garrafa de cultura e as outras células.
4. Colocar 10ul da amostra a ser contada em um dos dois quadrantes da câmara, como ilustrada na figura abaixo:

FIGURA 22: REPRESENTAÇÃO DE UMA CÂMARA DE NEUBAUER



5. Contar os 16 quadrados de cada um dos quatro quadrantes (em vermelho). O valor obtido deve ser dividido por quatro e multiplicado por 10^4 , que é o fator da câmara.
6. As diluições devem ser consideradas nesse cálculo, multiplicando-se o valor do cálculo anterior pela diluição. Ex.: se for feita uma diluição 1:10, multiplica-

se por 10^1 , se for feita uma diluição 1:100, multiplica-se por 10^2 , e assim por diante.

7. O valor obtido nesse cálculo é equivalente ao número de células encontrado em 1mL de cultura. Para se saber o volume requerido da cultura, é necessário fazer uma regra de três, como exemplificado abaixo

$$\begin{array}{l} \text{(Nº células/4) x } 10^4 \text{ x Fator de diluição ----- 1mL} \\ \text{Nº de células requeridas ----- x} \end{array}$$

ANEXO VI - CONGELAMENTO DE *Leishmania* E THP-1

1. As células devem estar em fase *log* de crescimento. Culturas antigas não devem ser congeladas.
2. Os criotubos devem conter sempre 1mL de suspensão celular.
3. Para as THP-1, a quantidade a ser congelada deve ser de 1×10^6 células/mL, enquanto para *Leishmania* a quantidade deve ser 1×10^7 células/mL.
4. Realizar a contagem das células (ver protocolo de Contagem de Células) e, com uma pipeta sorológica estéril, coletar a cultura e dispensar em um tubo Falcon.
5. Centrifugar a cultura conforme o adequado para cada linhagem:
 - a. *Leishmania*: 1300g por 10 minutos.
 - b. THP-1: 200g por 8 minutos.
6. Ressuspender o pellet em seu respectivo meio de cultura (Schneider para *Leishmania* e RPMI 1640 para THP-1).
7. Ajustar o volume final da suspensão celular, de modo que a densidade de células fique correta e contabilizando o acréscimo de 5% em volume de DMSO estéril.
8. Identificar os criotubos com o tipo celular, data e nome do responsável.
9. Homogeneizar a suspensão com uma pipeta e distribuir 1mL por criotubo.
10. Colocar os criotubos em gelo seco ou freezer -80°C por 2h.
11. Transferir os criotubos para o nitrogênio líquido* em caixas apropriadas.

* Usar luvas próprias para retirar e manusear o rack e as caixas criogênicas, além de usar protetor de rosto.

* Retirar e colocar o rack no Nitrogênio lentamente.

ANEXO VII - DESCONGELAMENTO DE *Leishmania* E THP-1

1. Colocar gelo seco em uma caixa de isopor e buscar a amostra em um container de nitrogênio.
2. Colocar o criotubo no gelo seco e transportar até o Laboratório
3. Colocar 10 ml de meio apropriado em um tubo Falcon (Schneider para *Leishmania* e RPMI 1640 para THP-1).
4. Abrir o criotubo em fluxo laminar e pipetar aproximadamente 500ul de meio de cultura sobre as células congeladas (pegar o meio dos 10mL já aliquoteados no tubo Falcon).
5. Com uma micropipeta, aspirar e soltar o volume de meio lentamente, repetidas vezes, para as células irem descongelando.
6. Conforme for descongelando, aspirar o volume do líquido e colocar no tubo Falcon contendo meio de cultura.
7. Repetir os passos de 4 a 6 até que todo o conteúdo do criotubo tenha sido descongelado.
8. Transferir o conteúdo do Falcon para uma garrafa de cultura contendo 4mL de ágar Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)*.
9. Acompanhar a cultura diariamente, observando em microscópio óptico.

* Ágar NNN: 90% volume de ágar-ágar + 10% volume de sangue de coelho.