



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

Influência da saliva do vetor *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

JEFFERSON MESQUITA BRITO

SÃO LUÍS - MA

2022

JEFFERSON MESQUITA BRITO

Influência da saliva do vetor *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) em macrófagos M0, M1 e M2 infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

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

Orientador (a): Dra. Lucilene Amorim Silva

Coorientador: Dr. Francinaldo Soares Silva

SÃO LUÍS - MA

2022

JEFFERSON MESQUITA BRITO

Influência da saliva do vetor *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) em macrófagos M0, M1 e M2, infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

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

Data: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão

Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Aramys Silva dos Reis
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Bruno de Paulo Ribeiro
Secretaria de Estado de Segurança Pública do Maranhão

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Brito, Jefferson.

Influência da saliva do vetor *Nyssomyia whitmani*
Diptera: Psychodidae em macrófagos M0, M1 e M2, infectados
por *Leishmania amazonensis* Kinetoplastida:
Trypanosomatidae / Jefferson Brito. - 2022.
136 f.

Coorientador(a): Francinaldo Silva.

Orientador(a): Lucilene Silva.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2022.

1. Flebotomíneo. 2. *Leishmania*. 3. Macrófagos. 4.
Nyssomyia. 5. Polarização. I. Silva, Francinaldo. II.
Silva, Lucilene. III. Título.

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.”

(Chico Xavier)

Dedicatória

À Deus pelo presente da vida em seu amor infinito.

Aos meus pais, por toda dedicação e carinho.

Aos meus avós e bisavós, pelos ensinamentos sobre a vida.

À minha esposa, pelo seu amor, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, queria agradecer aos meus orientadores Dra. Lucilene Amorim Silva e Dr. Francinaldo Soares Silva pela orientação.

Agradeço professora Dra. Lucilene por ter aceitado o desafio de me orientar, por me aceitar em seu grupo e acreditar nas minhas capacidades. Uma professora que não mede esforços para ajudar seus orientados e consegue extrair o melhor de cada um. Agradeço pelo precioso conhecimento e conselhos fornecidos durante o doutorado, a pesquisa de mestrado e doutorado não teria avançado sem a sua disponibilidade para ensinar e buscar recursos. Muito obrigado professora!

Agradeço ao professor Dr. Francinaldo que sempre me incentivou a buscar conhecimento e aprimoramento. Aquele professor que sempre tem um conselho a mão para fornecer no momento certo. Pela grande ajuda em campo e ensinamentos no laboratório antes e durante o mestrado e doutorado. Foi o professor que me incentivou a buscar a pós-graduação, obrigado professor!

Sou grato pelos meus orientadores, tenho dois exemplos de grandes cientistas na minha vida!

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de estudar!

Agradeço as professoras Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra, duas renomadas cientistas que tenho grande admiração e carinho. Por todo incentivo e ajuda na realização do projeto, análise dos resultados e direcionamento científico. Muito obrigado professoras!

Ao professor Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira, um grande pesquisador, pelos ensinamentos sobre os ensaios e boas práticas no laboratório. Entre uma conversa e outra geravam resultados práticos importantes para a pesquisa. Muito obrigado professor!

À professora Dr. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, pelas conversas incentivadoras e ajuda durante a realização dos ensaios, permitindo a utilização do seu laboratório e equipamentos. Muito obrigado professora!

À professora Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva por sempre ajudar quando solicitada, por estar presente e nos ensinar quando necessário. Muito obrigado professora!

À todos os integrantes do Laboratório de Imunofisiologia (LIF), Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC), Laboratório de Entomologia Médica (LEME) e Laboratório de Imunoparasitologia (LPI) que me receberam de braços abertos, sempre me ajudaram quando foi preciso. Em especial ao Luís Douglas, Luana Pinheiro, Sulayne Guimarães, João Victor e Eder Fialho, obrigado por me ensinar humildade em aprender e ensinar.

Ao Sr. Benedito e família por ceder um espaço em sua propriedade para as coletas dos flebotomíneos.

À todos meus colegas de turma de doutorado 2018.1, professores e administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS).

Às instituições que forneceram os recursos necessários para a realização da pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvido Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço ao meu amor e parceira científica Benedita Costa-Neta pelo companheirismo, amor e incentivo. Sou grato por ter você em minha vida, sempre ao meu lado independente do momento, seu incentivo foi fundamental para a conclusão do meu doutorado, parte desta vitória é sua. Obrigado meu amor!

À minha mãe Úrcula Brito, meu exemplo de superação, força e amor. Não tenho como agradecer a minha mãe, sempre incentivou meus estudos, tenho muito orgulho da minha mãe e agradeço muito a Deus por ter ela em minha vida. Muito obrigado mãe. Ao meu pai José Brito pelo exemplo de humildade, perseverança e dedicação em tudo que faz, obrigado pai por tudo!

E a todos da minha família!

À todos que me ajudaram de forma direta ou indireta na realização da minha pesquisa e curso de doutorado!

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, que são transmitidas aos animais e ao homem durante o repasto sanguíneo realizado por uma fêmea de flebotomíneo infectada. O gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) constitui o agente etiológico das leishmanioses que é inoculado juntamente com a saliva do inseto na derme do hospedeiro. A saliva contém moléculas farmacologicamente ativas que possuem propriedades anti-hemostática, anti-inflamatória e imunomoduladora. A resposta quimiotática no mamífero, causa um infiltrado inflamatório intenso composto principalmente por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. O macrófago é uma célula leucocitária especializada na remodelação tecidual e na resposta imune a patógenos, como o protozoário *Leishmania*. Podem ser modulados para o perfil M1 e destruir o parasito internalizado ou para o perfil M2 fornecer um microambiente favorável para a proliferação do patógeno. Baseado na premissa de que a saliva dos vetores das leishmanioses modula o macrófago, foi avaliado o papel da saliva de *Nyssomyia whitmani* na modulação de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*. Primeiramente, foi realizada uma revisão narrativa sobre a atividade imunomoduladora da saliva das diferentes espécies dos vetores das leishmanioses em macrófagos sem infecção ou infectados por *Leishmania* spp. No segundo capítulo, foi avaliado a influência da saliva de *N. whitmani* na modulação de macrófagos estimulados em diferentes momentos na infecção por *L. amazonensis*. E como terceiro capítulo, foi investigado influência da saliva de *N. whitmani* em macrófagos polarizados para M1 e M2 na infecção por *L. amazonensis*. Os resultados obtidos demonstraram que alguns mecanismos da resposta imunológica dos macrófagos podem ser bloqueados pela saliva dos vetores em geral, como a inibição da produção de Óxido Nítrico (NO) através da diminuição da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) e a apresentação de antígenos pelos macrófagos aos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), visto que inibe a apresentação de antígenos pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, quando estimulados concomitantemente a infecção. Foi observado que a saliva de *N. whitmani* induz a proliferação exacerbada da promastigota de *L. amazonensis* nas primeiras 24 horas de contato, o que pode acarretar em uma rápida expansão do parasito. Os momentos de estímulo antes, durante e pós à infecção por *L. amazonensis* podem influenciar na resposta imune dos macrófagos, como a produção de citocinas inflamatórias, o que acarreta na modulação dos macrófagos e na produção de NO. Quanto aos macrófagos polarizados, a saliva é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos com o perfil M1 e altera alguns receptores de superfície e enzimas intracelulares, o que evidencia a modulação de macrófagos previamente ativados. A saliva também induz o aumento da viabilidade dos macrófagos, mesmo na presença do parasito, o aumento da sobrevivência da célula pode possibilitar o desenvolvimento da leishmaniose e prolongar a expansão do parasito internalizado. Logo, é evidente a grande relevância da saliva do vetor no estabelecimento do parasito *Leishmania* em macrófagos.

Palavras-chave: *Nyssomyia*; flebotomíneo; *Leishmania*; macrófagos, polarização; óxido nítrico; infecção.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases transmitted to animals and humans by the bite of an infected female sand fly. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) are the causative agents of leishmaniasis inoculated with sandfly saliva into the host skin. Saliva contains pharmacologically active compounds with antihemostatic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. In mammals, the chemotactic response elicits an intense inflammatory cell infiltrate containing mainly neutrophils, eosinophils, and macrophages. Macrophages are leukocytic cells specialized in tissue remodeling and in the immune response to pathogens, like *Leishmania* parasites. These cells may respond to infection in a resistant manner, destroying the internalized parasites or providing an ideal microenvironment for pathogen proliferation, relying on the macrophage phenotypes. Some mechanisms of the immunological response of macrophages may be prevented by the insect vector saliva, such as the inhibition of NO production by the decrease of iNOS expression and the antigen presentation by macrophages to T CD4⁺ lymphocytes since it inhibits the antigen-presenting capacity of macrophages through class II MHC pathway. Based on the premise that vector saliva modulates the macrophage immune response, the goal of this study was to evaluate the macrophage immune response, polarized or not, stimulated with *Nyssomyia whitmani* saliva during *Leishmania amazonensis* infection. It was observed that vector saliva induces intense proliferation of promastigotes during the first 24 hours after contact, which can lead to a rapid expansion of the parasite. The earlier contact between macrophage and saliva increases the parasite burden differently from what occurs in the following exposure to infection, and the cytokine production, which leads to macrophage modulation, and metabolite production, e.g., hydrogen peroxide and NO, both known as leishmanicidal agents. As for the polarized macrophages, saliva inhibits NO production in M1 macrophages and affects the expression of some surface receptors and intracellular enzymes, showing a modulation to an anti-inflammatory phenotype, even in preactivated macrophages. Saliva also induces an increase in stimulated macrophage viability, even in the presence of *Leishmania*. The increase in cell survival can enable leishmaniasis development and the extension of the internalized parasite expansion. From the presents results, it can be seen the great relevance of vectors in the establishment of *Leishmania* in macrophages.

Key-words: *Nyssomyia*; sandfly, *Leishmania*; macrophages; polarization; nitric oxide; infection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVO	39
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5 RESULTADOS	45
5.1 Capítulo 1 - MODULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS PELO ESTIMULO DA SALIVA DOS VETORES DAS LEISHMANIOSES: o papel da saliva na polarização dos macrófagos infectados por <i>Leishmania</i>	45
5.2 Capítulo 2 - MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM SALIVA DE <i>Nyssomyia whitmani</i> APRESENTAM VIABILIDADE AUMENTADA E SÃO INDUZIDOS PARA o PERFIL m2 NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania amazonensis</i>	70
5.3 Capítulo 3 – A SALIVA DE <i>Nyssomyia whitmani</i> INFLUENCIA NA ATIVAÇÃO, RESPOSTA IMUNE E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS M1 E M2 INFECTADOS POR <i>Leishmania amazonensis</i>	100
REFERÊNCIAS	124
ANEXO	134

