

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**LINHAGEM DE CÉLULAS DE CARRAPATO COMO  
MODELO PARA ESTUDO NA INTERAÇÃO ENTRE  
CARRAPATO e *LEISHMANIA SPP***

**BEATRIZ FILGUEIRAS SILVESTRE**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE  
JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**LINHAGEM DE CÉLULAS DE CARRAPATO COMO  
MODELO PARA ESTUDO NA INTERAÇÃO ENTRE  
CARRAPATO e *LEISHMANIA SPP***

**Beatriz Filgueiras Silvestre**

Sob a Orientação da Prof.<sup>a</sup>

**Dra. Lucia Helena Pinto da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Mestre em Ciências  
Veterinárias**, no Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Dezembro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S5871      Silvestre, Beatriz Filgueiras , 1996-  
LINHAGEM DE CÉLULAS DE CARRAPATO COMO MODELO PARA  
ESTUDO NA INTERAÇÃO ENTRE CARRAPATO e LEISHMANIA SPP  
/ Beatriz Filgueiras Silvestre. - Rio de Janeiro,  
2021.  
76 f.: il.

Orientadora: Lucia Helena Pinto da Silva.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2021.

1. células de linhagem de carrapato. 2.  
Leishmania infantum. 3. leishmaniose canina. 4.  
metabolismo lipídico de carrapato. I. Silva, Lucia  
Helena Pinto da , 1975-, orient. II Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Ciências  
Veterinárias III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 5652/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.089130/2021-49

Seropédica-RJ, 09 de dezembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
  
**BEATRIZ FILGUEIRAS SILVESTRE**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/12/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

*(Assinado digitalmente em 09/12/2021 17:12)*

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DESP (12.28.01.00.00.00.00.52)

Matrícula: ###58#7

*(Assinado digitalmente em 09/12/2021 16:35)*

LUCIA HELENA PINTO DA SILVA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DMIV (12.28.01.00.00.00.00.54)

Matrícula: ###458#0

*(Assinado digitalmente em 09/12/2021 16:17)*

EVELIZE FOLLY DAS CHAGAS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.717-##

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. <b>Tabela 1.</b> Relação de espécie / localização / manifestação clínica das principais espécies de <i>Leishmania</i> .....	17
2. <b>Figura 1.</b> Evolução de uma lesão de LC durante aproximadamente 6 meses,( <b>E</b> ) Lesão de LC e ( <b>F</b> ) Deformidade no pavilhão auricular com uma lesão de LC .....	20
3. <b>Figura 2.</b> (A) Lesões múltiplas de leishmaniose cutânea disseminada; (B) Lesões múltiplas e placas crostosas de leishmaniose difusa; (C - E) Lesões graves na mucosa oronasal de leishmaniose mucosa/mucocutânea.....	21
4. <b>Figura 3.</b> (A e B) Hepatoesplenomegalia em 2 pacientes com leishmaniose visceral; (C) Lesão de LDPC.....	22
5. <b>Figura 4.</b> Micrografia das formas (A) promastigotas e (B) amastigota observada no microscópio eletrônico de varredura.....	23
6. <b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> dentro do vetor flebotomíneo com suas respectivas fases de diferenciação, exceto retroleptomonas.....	24
7. <b>Figura 6.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> completo.....	26
8. <b>Figura 7.</b> Estrutura de moléculas de triacilglicerol, colesterol e ácidos graxos.....	28
9. <b>Figura 8.</b> Cães e gatos com sinais clínicos de leishmaniose.....	32
10. <b>Figura 9.</b> Comparação entre os sistemas digestórios de flebotomíneo e carrapato.....	35
11. <b>Tabela 2.</b> Principais eventos no desenvolvimento de culturas de células e tecidos na primeira metade do século XX.....	37
12. <b>Figura 10.</b> Aplicações para técnica de cultivo celular.....	37
13. <b>Figura 11.</b> Esfregaço em citocentrífuga corado com Giemsa de linhagem celulares contínuos de carrapato. ....	40
14. <b>Figura 12.</b> Interação IDE8 e <i>Leishmania amazonensis</i> .....	47
15. <b>Figura 13.</b> Interação entre IDE8 <i>Leishmania amazonensis</i> .....	48
16. <b>Figura 14.</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura de linhagem celular IDE8 incubadas com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por 2 horas a 34°C.....	49
17. <b>Figura 15.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de linhagem celular IDE8 e formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após (A, B, C) 24h e (D) 48h de interação .....	49
18. <b>Figura 16.</b> Interação IDE8 e <i>Leishmania infantum</i> .....	51
19. <b>Figura 17.</b> Sobrevivência dos parasitos após interação de 48h.....	52
20. <b>Figura 18.</b> Viabilidade de Membrana celular pelo método de exclusão azul de Trypan.....	53
21. <b>Figura 19.</b> Atividade de LDH após interação de 48h com células IDE8 e <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	53
22. <b>Figura 20.</b> Análise da produção de peróxido de hidrogênio total em células IDE8.....	54
23. <b>Figura 21.</b> Análise do perfil de lipídeos neutros totais (LNT) de células IDE8.....	55
24. <b>Figura 22.</b> Lipídeos totais marcados com ácido palmítico- <sup>3</sup> H em IDE8 infectados com <i>Leishmania infantum</i> .....	56
25. <b>Figura 23.</b> Lipídeos totais marcados com ácido palmítico- <sup>3</sup> H em IDE8 infectados com <i>Leishmania infantum</i> .....	58
26. <b>Figura 24.</b> Via de síntese de TAG.....	64

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CHO- Colesterol

CHOE- Colesterol esterificado

DAG- Diacilglicerol

EROS - Espécies reativas de oxigênio

FA ou Ác. Graxo - Ácidos graxos = *fatty acids*

HPTLC- Cromatografia de camada fina de alto desempenho

LC- Leishmaniose cutânea

LCan- Leishmaniose canina

LD- *Lipid droplets* ou gotículas lipídicas

LDH- Lactato desidrogenase

LDPC- Leishmaniose dérmica pós- calazar

LNT- Lipídeos neutros totais

LV- Leishmaniose visceral

MAG- Monoacilglicerol

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

OXY- Oxiesterol

PL- Fosfolípídeo

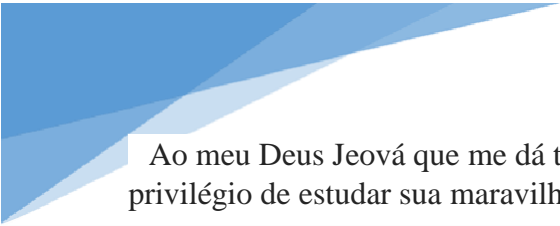
TAG- Triacilglicerol

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	15
2.	Revisão de Literatura .....	15
2.1.	Epidemiologia da Leishmaniose .....	15
2.2.	A doença .....	17
2.3.	O ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no vetor.....	23
2.4.	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no hospedeiro mamífero.....	26
2.5.	Lipídeos: Importantes moléculas biológicas.....	28
2.6.	Reservatórios e a Zoonose .....	30
2.7.	Carrapatos e a transmissão da Leishmaniose.....	33
2.8.	Cultivo Celular como ferramenta de estudos biológicos .....	37
3.	Objetivo .....	42
3.1.	Objetivos específicos; .....	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
4.1.	Parasitas .....	42
4.2.	Células de carrapato .....	43
4.3.	Interação de células de carrapato com <i>Leishmanias</i> .....	43
4.4.	Sobrevivência dos parasitos após a interação .....	43
4.5.	Coloração com azul de trypan (“trypan blue”).....	43
4.6.	Atividade de LDH.....	43
4.7.	Microscopia eletrônica de varredura.....	44
4.8.	Microscopia eletrônica de transmissão .....	44
4.9.	Dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	45
4.10.	Efeito da interação sobre perfil lipídico das células de linhagem.....	45
4.11.	Extração de lipídeos .....	45
4.12.	Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HP TLC) .....	45
4.13.	Incubação com precursor lipídico ácido palmítico <sup>3</sup> h .....	46
4.14.	Análise por cintilação de lipídeos derivados de ácidos graxos com ácido palmítico <sup>3</sup> h.....	46
4.15.	Análise estatística.....	47
5.	RESULTADOS .....	47
5.1.	Interação carrapato x <i>Leishmania amazonensis</i> .....	47
5.2.	Microscopias Eletrônicas da interação de Células de linhagem IDE8 com <i>Leishmania</i> .....	49

5.3.	Interação célula de carrapato x <i>Leishmania infantum</i> .....	51
5.4.	Sobrevivência de <i>Leishmania</i> após a interação com células de carrapato .....	52
5.5.	Viabilidade celular de linhagem celular de carrapato infectada com <i>Leishmania</i> 53	
5.6.	Estresse oxidativo de células de carrapato IDE8 infectadas com <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> 55	
5.7.	Análise do perfil lipídico de células IDE8 infectadas com <i>Leishmania infantum</i> 55	
6.	DISCUSSÃO .....	60
7.	CONCLUSÕES .....	67
8.	Referências bibliográficas.....	68



A decorative graphic element consisting of several overlapping blue triangles and polygons, creating a layered, geometric effect. It is positioned on the left side of the page, partially behind the first line of text.

Ao meu Deus Jeová que me dá todos os dias o  
privilégio de estudar sua maravilhosa criação

Aos meus pais e marido por todo o apoio e amor  
incondicionais.

“As suas qualidades invisíveis — isto é, seu poder  
eterno e Divindade — são claramente vistas desde a  
criação do mundo, porque são percebidas por meio das  
coisas feitas, de modo que eles não têm desculpa. ”

Romanos 1:20

# Agradecimentos

Ao ser mais importante da minha vida, que me acompanha em todas as minhas decisões e me derrama mais bênçãos do que eu mereço, meu maravilhoso e amoroso Deus Jeová. Dele provém todas as outras bênçãos que me permitiram terminar esse trabalho.

Ele me deu pais perfeitos. Eu agradeço por cada vez que me ajudaram a não desistir, cada vez que acordaram comigo para me fazer café da manhã e as milhares de vezes que deixaram de lado seus compromissos para me ajudar nos meus, em especial durante a pandemia.

Jeová também me deu um marido maravilhoso, que me apoia mais do que eu poderia esperar e me ajuda com minhas responsabilidades mais do que eu já tenha visto qualquer marido fazer. Você é minha dádiva perfeita, meu melhor amigo e meu avaliador de seminário preferido. Obrigada por tudo.

Agradeço também por toda a minha família com tios, primos, avós que sempre me apoiam nesse sonho, nem sempre muito fácil, de fazer ciência.

Agradeço também por ter em minha vida profissional pessoas tão boas e especiais que com sua generosidade imensa em ensinaram tanto. Lúcia, como orientadora, foi minha primeira oportunidade de contato com esse universo tão delicioso de se estudar. Obrigada por tudo o que você me permitiu aprender, aprimorar e descobrir. Obrigada também pelo apoio nos momentos difíceis, em que encontramos em nossa trajetória pessoas de pouca luz. Com certeza o futuro nos espera coisas muito melhores por vir. Raissa e Alice, meus presentes do lab, que eu amo e sinto saudades todos os dias. Infelizmente não posso mais estar com vocês diariamente, mas continuo aqui para o que vocês precisarem. Nosso trio nunca vai acabar.

Quero agradecer também a outros amigos fora do mundo acadêmico. Nat, obrigada por me escutar, assistir meus treinos de apresentação, comparecer aos eventos on-line só para ajudar na assistência, dar apoio a todas os projetos que eu resolvo embarcar e por tantas outras coisas que só nós sabemos o quanto são importantes. Te amo. Agradeço também a Bruna e Tayná, que através da nossa amizade por meio da dança me ensinaram e ainda ensinam de tantas formas diferentes a ter mais confiança, controlar a timidez, me arriscar mais e me superar todos os dias, sem pré-conceitos, um degrau de cada vez.

Agradeço também a minha psicóloga Isabele. Em meio a pandemia, esse trabalho só foi possível porque você é uma profissional excepcional. Você cuidou da minha saúde mental da melhor forma possível e tornou possível que eu continuasse fazendo essa pesquisa.

Obrigada a todos os outros profissionais que eu encontrei no meu caminho. Professor Dr. Adivaldo Fonseca e suas alunas Juliana, Priscila, Jaqueline e Alexandra que me ajudaram tanto. A Professora Dra. Daniele Cosentino, que disponibilizou seu tempo em meio a pandemia para me ajudar a realizar meus experimentos, A professora Dra. Geórgia Atella e Prof. Dr. Célio Freire de Lima que me cederam seu espaço e recursos para que eu realizasse etapas importantes da minha pesquisa. Aqui também agradeço especialmente a aluna de mestrado Karoline Lima, que foi IMPRESCINDÍVEL para realização desse trabalho. Realmente, não tem palavras que possam te agradecer por tanta generosidade comigo.

Obrigada também as Instituições de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

## RESUMO

A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que afetam homens e animais. A leishmaniose canina é uma doença de grande importância na saúde pública, pois os cães são o principal reservatório do parasito. A maioria dos cães infectados vem de áreas pobres, onde há ectoparasitos, como o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Sua presença levantou a hipótese de que este poderia ser um vetor do parasito. O objetivo deste trabalho foi propor um modelo *in vitro* de estudo da interação entre *Leishmania spp.* e carrapatos Ixodídeos, usando a linhagem celular do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8). Para esta análise, células IDE8 foram incubadas com promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* durante: 2, 24 e 48 h a 34 ° C. Resultados mostraram que as formas promastigotas se ligam, interagem com a membrana das células de carrapato, são endocitadas e permanecem dentro de um vacúolo justaposto, como mostrado por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. O índice de associação entre IDE8 e *L. amazonensis* não se alterou, mas entre IDE8 e *L. infantum* aumentou em cerca de 7 vezes em 48h. Os ensaios de viabilidade através da atividade de LDH mostraram que as células permanecem viáveis durante incubação com os parasitas. Além disso, *L. infantum* apresentou uma sobrevivência 13 vezes maior do que *L. amazonensis* após a interação com IDE8 em 48h. As células IDE8 apresentaram aumento de 2 vezes na produção de ROS e de 8 vezes da produção de oxisterol após a interação com *L. infantum*. Os lipídeos triacilglicerol, 1,2 e 1,3 diacilgliceróis, monoacilglicerol e colesterol esterificado, todos derivados dos ácidos graxos, também apresentaram aumento após a interação. Assim, nossos dados indicam a capacidade de *Leishmania spp.* interagir com células de carrapato *in vitro*, sobreviver a essa interação e modular reações metabólicas na célula hospedeira.

Palavras-chave: leishmaniose canina, células de carrapatos, *Leishmania spp.*, metabolismo lipídico de carrapato.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* that affect humans and animals. Canine leishmaniasis is a disease of great public health importance, since dogs are the main reservoir of the parasite. Most infected dogs come from poor areas where there are ectoparasites, such as the *Rhipicephalus sanguineus* tick. Its presence raised the hypothesis that this could be a vector of the parasite. The aim of this work was to propose an in vitro model to study the interaction between *Leishmania* spp. and Ixodid ticks, using the cell line from the *Ixodes scapularis* tick (IDE8). For this analysis, IDE8 tick cells were incubated with *L. amazonensis* or *L. infantum* promastigotes during: 2, 24 and 48 h at 34 ° C. The results showed that promastigotes bind, interact with the tick cell membrane, are endocytosed, and remain within a juxtaposed vacuole, as shown by transmission and scanning electron microscopy. The association index between IDE8 and *L. amazonensis* did not change, but between IDE8 and *L. infantum* it increased approximately 7 times up to 48 h. Viability assay through LDH activity demonstrated that IDE8 tick cell remain viable during infection with parasites. Furthermore, *L. infantum* showed a survival 13 times higher than *L. amazonensis* after interaction with IDE8. IDE8 tick cells infected with *L. infantum* also showed a 2-fold increase in ROS production and an 8-fold increase in oxysterol production. The lipids triacylglycerol, 1,2 and 1,3 diacylglycerols, monoacylglycerol and esterified cholesterol, derived from fatty acids, also showed an increase after the interaction. Therefore, our data indicate that *Leishmania* spp. are able to interact with tick cells in vitro, survive, and modulate metabolic reactions in tick cells.

Key words: canine leishmaniasis, tick cells, *Leishmania* spp, tick lipid metabolism.

## **1. Introdução**

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais causadas por diversas espécies de parasitas do gênero *Leishmania*, que acometem principalmente pessoas em situação de vulnerabilidade sócio econômica. São transmitidos por insetos chamados de flebotômíneos, conhecido popularmente por mosquito-palha.

As leishmanioses possuem formas tegumentares e visceral, sendo essa última a forma mais grave da doença. Além de acometer humanos, as leishmanioses também são encontradas em outros mamíferos, sendo o cão o principal reservatório do parasito no ambiente urbano. Muitas vezes esses animais são assintomáticos, mas têm a capacidade de manter o parasita no meio natural durante certo tempo. Associado aos cães encontramos muitos outros ectoparasitos hematófagos, como carrapatos e pulgas, que por sua íntima e constante associação muitas vezes são considerados potenciais vetores do parasito *Leishmania*. Alguns estudos vêm tentando elucidar se os carrapatos podem ser vetores biológicos desse parasito. Baseado nisso, o objetivo do nosso trabalho foi propor um modelo de estudo *in vitro*, usando células de linhagem embrionárias de carrapato para avaliar como elas interagem com diferentes espécies de *Leishmania*. Avaliamos a capacidade de associação entre as células e os parasitos, a sobrevivência de ambos após o período de associação, se houve algum tipo de estresse oxidativo causado a célula hospedeira pela interação com o parasito e como o metabolismo lipídico foi modulado pela presença do parasita *Leishmania*.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Epidemiologia da Leishmaniose**

As leishmanioses são um espectro de doenças negligenciadas causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* e transmitidas por 2 gêneros de vetores da família *Phlebotominae*, os gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Esse conjunto de doenças afeta populações em condições de vulnerabilidade econômica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo poucas opções de tratamento, com alto custo, alta desistência devido a forma de administração (injetável e dolorosa, requerendo internação), muitos efeitos colaterais e baixa efetividade

(Soares-Bezerra, 2004). A maioria dos casos de leishmaniose são agravados por condições de desnutrição, deslocamento de populações, moradias precárias e o tipo de resposta imune por parte dos hospedeiros. A doença afeta hoje cerca de 12 milhões de pessoas, com aproximadamente 350 milhões em constante risco de infecção (Okwor e Uzonna, 2016). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2018 estimou que cerca de 30.000 e 1 milhão de novos casos ocorram todo ano no mundo, de leishmaniose visceral e tegumentar, respectivamente (OPS, 2019 ;WHO<sup>1</sup>,2020). Apesar desses dados, ainda acredita-se haver uma grande subnotificação devido as dificuldades de diagnóstico da leishmaniose, alguns sintomas inespecíficos nos quadros subclínicos e a presença de assintomáticos na população, muito comum em áreas endêmicas (Elmahallawy *et al*, 2014, Burza,Croft & Boelaert, 2018). Outros desafios também aumentam a subnotificação, como erros e/ou dificuldade nos registros de pacientes infectados. Um exemplo dessa dificuldade é o caso de Bihar, na Índia, onde um estudo mostrou que a subnotificação nesse local é oito vezes maior que a prevalência real da doença, devido ao fato que as estimativas do país são feitas baseadas no número de pacientes, que usam o sistema de saúde público, ignorando uma parcela considerável da população que faz uso do sistema de saúde privado (Okwor e Uzonna, 2016, Singh *et al*, 2006).

Apesar desses números alarmantes, a perspectiva é que os casos aumentem cada vez mais, pois a leishmaniose também é largamente influenciada por eventos antrópicos como desmatamento, construção de barragens, urbanização descontrolada e guerras. Esses fatores têm efeitos epidemiológicos intensos sobre as populações de vetores, reservatórios da doença e no deslocamento de pessoas não imunes para regiões endêmicas. (Wilhelm, 2019; WHO<sup>2</sup>, 2020).

Apesar de ocorrer em todos os continentes e em quase 100 territórios ao redor do mundo, o Brasil ocupa uma posição de destaque na epidemiologia global de leishmaniose, sendo um país altamente endêmico para a doença. Em 2018 o Brasil representava 97% dos casos de leishmaniose visceral das Américas e estava entre os 10 países mais endêmicos do mundo para as formas visceral e cutânea da doença. Dessa forma, fica claro porque a leishmaniose é e deve ser considerada como um assunto de grande preocupação na saúde pública. Isso levou ao ministério da saúde classificar essa doença dentre as que possuem caráter de notificação obrigatório em qualquer caso suspeito e/ou

confirmado no território nacional, seja a forma canina ou a forma humana da doença (Guia de vigilância em Saúde, 2019).

## 2.2. A doença

As leishmanioses são causadas por cerca de 20 diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, sendo um parasito intracelular obrigatório transmitido para seus hospedeiros pela picada de fêmeas de flebotomíneo, conhecido popularmente como mosquito-palha (Burza, Croft & Boelaert, 2018). Esses insetos têm uma grande variedade de hospedeiros mamíferos como canídeos, roedores, marsupiais e o ser humano. Dessa forma, a doença pode ter uma transmissão zoonótica ou antroponótica (Steverding, 2017). São admitidos hoje 4 subgêneros para o grupo: *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*. Apenas o gênero *Sauroleishmania* não apresenta representantes que infectam o homem. O gênero *Mundinia* foi descrito recentemente, e apesar disso há indicativos de que esse seria um grupo mais primitivo do que os outros subgêneros já conhecidos, tendo se separado de seus grupos-irmãos antes da divisão de Gondwana (Butenko *et al*, 2019). Infelizmente seus representantes ainda não foram extensamente estudados. Os hospedeiros humanos identificados como infectados por espécies desse grupo eram imunocomprometidos, indicando que talvez ele possa se adaptar a um outro nicho de hospedeiros disponíveis. Além disso, o principal inseto que vem sendo discutido como vetor para esse subgênero é um díptero do gênero *Ceratopogonidae*, o diferenciando consideravelmente dos outros subgêneros conhecidos (Dougall *et al*, 2011; Seblová *et al*, 2015, Butenko *et al*, 2019)

Os subgêneros de *Leishmania* de maior importância no contexto de saúde pública são *Viannia* e *Leishmania*, que causam sinais clínicos das leishmanioses. Esses subgêneros se diferenciam pela região preferencial de colonização no trato digestivo do inseto vetor; *Viannia* são parasitas chamados de peripilares, colonizam todo intestino (anterior, médio e posterior) e *Leishmania* são parasitas suprapilares, colonizam apenas a porção anterior e média do intestino. As diferentes espécies de parasitas estão relacionadas a distintas manifestações clínicas da doença, variando a severidade e a localização das lesões (**Tabela 1**).



Subgênero	Espécie	Novo mundo/ Velho Mundo	Manifestação clínica	Reservatório
<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	NM	CL, DCL, MCL	Mamífero/ Humano
	<i>L. donovani</i>	VM	VL, PKDL	Mamífero/ Humano
	<i>L. infantum</i>	NM	VL, CL	Mamífero/ Humano
	<i>L. major</i>	VM	CL	Mamífero/ Humano
	<i>L. mexicana</i>	NM	CL, DCL	Mamífero/ Humano
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	CL	Mamífero/ Humano
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	CL, MCL	Mamífero/ Humano
	<i>L. guyanensis</i>	NM	CL, MCL	Mamífero/ Humano
	<i>L. panamensis</i>	NM	CL, MCL	Mamífero/ Humano

**Tabela 2.** Relação de espécie / localização / manifestação clínica das principais espécies de *Leishmania*. Fonte: Modificado de Akhoundi *et al*, 2016.

As manifestações clínicas da leishmaniose humana se dividem entre tegumentares e viscerais. As principais formas tegumentares são leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucocutânea. A lesão cutânea localizada aparece na pele em geral no local da picada do inseto, e que após um período de incubação, que pode variar de 2 semanas a 2 meses, gera uma pápula avermelhada e indolor, que pode aumentar ulcerar com o tempo. A lesão pode ter aspecto purulento e arredondado com bordas altas regulares bem avermelhadas e o centro granuloso mais claro (**Figura 1A - D**). Essa ferida oferece um ambiente propício a colonização de patógenos secundários, que podem aumentar a inflamação local e gerar secreções, dor e inchaço da região. Quando essa lesão é formada em locais apenas cartilagosos, como o pavilhão auricular, pode haver graves danos ao tecido e até a mutilação do mesmo (**Figura 1E e F**). A LC pode curar-se espontaneamente ou se tornar crônica.

A forma disseminada da doença é incomum e se caracteriza por várias lesões papulares, semelhantes a acnes, espalhadas pelo corpo. Está bem relacionada com algumas espécies de *Leishmania* como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana*. Após a formação das lesões primárias, há a migração do parasita pelo sistema circulatório e linfático do indivíduo levando o parasita a se estabelecer em regiões mais distantes da lesão primária e assim se formam lesões em

múltiplas partes do corpo (**Figura 2A**). A forma difusa da doença pode ser muito difícil de distinguir de outras doenças infecciosas, pois pode ser resultado de um tratamento malsucedido da forma cutânea localizada, devido a ação direta do parasita ou pode se relacionar com algum comprometimento imunológico por parte do paciente, que dificulta uma resposta adequada do hospedeiro. As lesões aparecem de forma espalhada por todo o corpo, formando nódulos grandes e/ou placas, possui uma evolução lenta com poucas opções de tratamento e frequentes recaídas (**Figura 2B**). (Teixeira *et al*, 2013; Handler *et al*, 2015, Steverding, 2017; OPS, 2019).

A forma mucocutânea, ou mucosa, ocorre apenas na América Latina, e é uma forma da doença especialmente grave (**Figura 2C - E**). Pode ser causada por tratamento inadequado ou progressão da forma cutânea de forma que o parasita alcança a via linfática ou sanguínea e atinge as mucosas. São observados sérios danos ao tecido oro-nasal do paciente, destruindo septo nasal, palato, columela nasal e até lábios, levando a desfiguração e mutilação facial. Além disso, pode afetar o palato mole prejudicando a capacidade comunicativa do indivíduo (OPS, 2019), o que causa muitos problemas socioeconômico e psicológico devido à estigmatização do indivíduo (Teixeira *et al*, 2013; Handler *et al*, 2015, Steverding, 2017; OPS, 2019).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença, podendo levar a morte, se o indivíduo infectado não receber tratamento adequado, principalmente idosos e crianças. As principais espécies envolvidas com essa manifestação é a *L. infantum* (Novo mundo) e *L. donovani* (Velho mundo). Essas espécies têm um alto tropismo por órgãos com funções imunes e hematopoiéticas como fígado, baço, medula óssea e linfonodos. O acometimento desses órgãos pode causar, anemia, pancitopenia e a hepatoesplenomegalia, bem característica da doença (Teixeira *et al*, 2013; Steverding, 2017). Após o início dos sintomas, se o indivíduo não receber tratamento adequado, o mesmo pode vir a óbito num prazo aproximado de 2 anos por insuficiência hepática, sangramentos, sepse bacteriana ou anemia extrema (Teixeira *et al*, 2013; Wilhelm, 2019). Mesmo com tratamento, pode existir uma taxa de mortalidade de mais de 10%, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV ou em condições de saúde debilitadas (Delgado *et al*, 1999; Abongomera *et al*, 2020). Infelizmente, um dos primeiros sinais clínicos é a febre, que pode ser intermitente ou não, sendo um sintoma comum a uma infinidade de doenças infecciosas, dificultando muito o diagnóstico prematuro (**Figura 3A e B**).

Uma condição rara no Brasil que acomete mais frequentemente pacientes imunossuprimidos, é a leishmaniose dérmica pós- Calazar (LDPC) (**Figura 3C**). Ocorre após o tratamento da LV, quando há a persistência do patógeno na pele e o organismo produz uma resposta imune mediada por interferon- $\gamma$  contra esses parasitas. Esta forma da doença é caracterizada pela formação de pápulas na pele por todo o corpo. Há fatores que aumentam o risco de desenvolvimento dessa forma da doença como tratamento incompleto e exposição à luz ultravioleta. A prevalência desses casos na população mundial é bem variável, podendo ser de 5-10% na Ásia e chegar a 50% na África. Apesar de poucos pacientes manifestarem sintomas graves, que levem a morte na LDPC, é importante lembrar que as lesões são fontes infecção para os vetores do ambiente e podem permanecer assim por muitos anos, de forma que em epidemias intensas de leishmaniose, as pessoas não tratadas podem se converter em reservatórios em meio à população saudável (Burza, Croft & Boelaert, 2018; Wilhelm, 2019).

Apesar dos graves quadros sintomatológicos conhecidos, uma grande parte dos indivíduos infectados por *Leishmania* são assintomáticos, e podem permanecer assim por meses ou até anos, até que haja uma condição de queda da imunidade, como por exemplo em pacientes soropositivos para HIV ou transplantados. Estima-se que até 20% dos pacientes com leishmaniose sejam soropositivos, o que aumenta grandemente as chances de desenvolverem as formas mais fatais da doença, uma vez que a modulação do sistema imune por parte das células T auxiliares fica gravemente comprometido. Já os indivíduos transplantados podem ser infectados por meio do próprio órgão transplantado ou podem se encontrar infectados antes, porém em latência. Ao fazer uso das drogas imunossupressoras para garantir o sucesso do transplante, há a quebra dessa latência e os parasitos podem se manifestar de forma intensa no organismo (Wilhelm, 2019).



**Figura 1.** (A – D) Evolução de uma lesão de LC durante aproximadamente 6 meses. (E) Lesão de LC e (F) Deformidade no pavilhão auricular com uma lesão de LC. Fonte: Burza, Croft & Boelaert, 2018 e OPS, Manual de procedimientos para vigilancia y control de las Leishmaniasis en las Américas, 2019.



**Figura 2.** (A) Lesões múltiplas de leishmaniose cutânea disseminada; (B) Lesões múltiplas e placas crostosas de leishmaniose difusa; (C - E) Lesões graves na mucosa oronasal de leishmaniose mucosa/mucocutânea. Fonte: Burza, Croft & Boelaert, 2018 e OPS, Manual de procedimientos para vigilancia y control de las Leishmaniasis en las Américas, 2019.

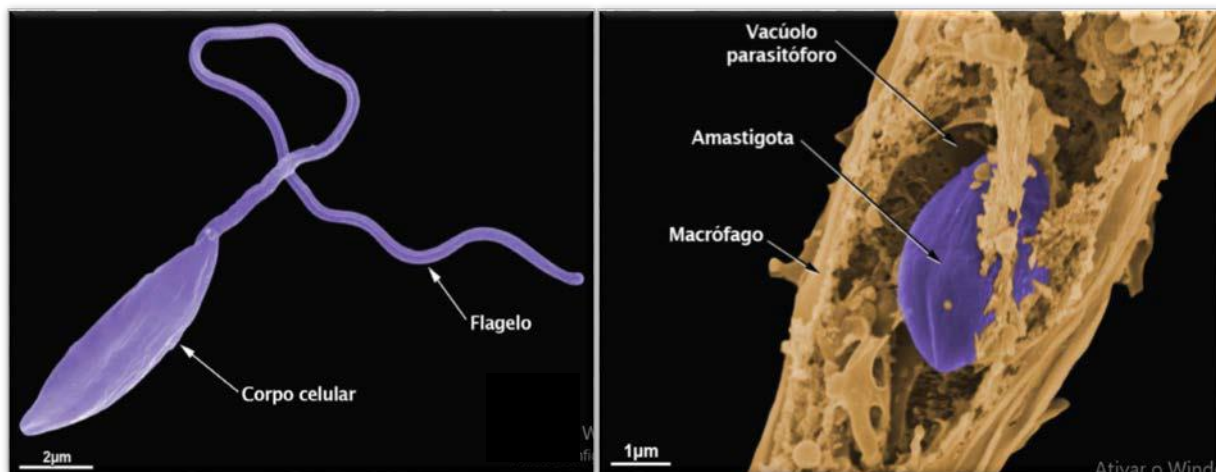


**Figura 3.** (A e B) Hepatoesplenomegalia em 2 pacientes com leishmaniose visceral; (C) Lesão de LDPC. Fonte: Burza, Croft & Boelaert, 2018 e OPS, Manual de procedimentos para vigilancia y control de las Leishmaniasis en las Américas, 2019.

### 2.3. O ciclo de vida de *Leishmania* no vetor

O parasita *Leishmania* apresenta 2 formas evolutivas: promastigotas e amastigota (**Figura 4**). A forma promastigota ocorre no inseto vetor, flebotomíneo, e sofre várias diferenciações ao longo de todo o trato digestivo do vetor. Já a forma amastigota é a forma presente no hospedeiro mamífero, intracelular obrigatória, e se multiplica dentro do vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocítico mononuclear.





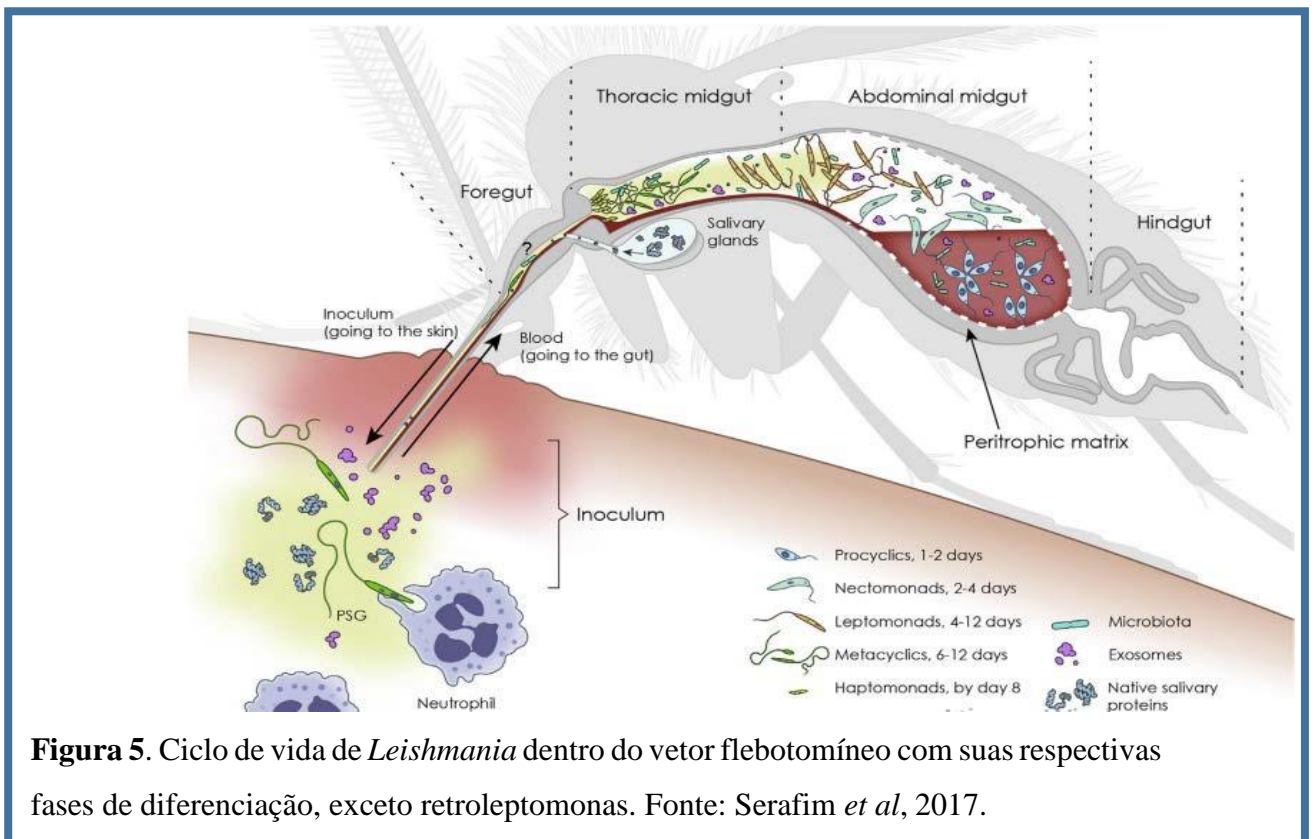
**Figura 4.** Micrografia das formas (A) promastigotas e (B) amastigota observada no microscópio eletrônico de varredura. Fonte: Teixeira et al, 2013

Ao fazer a refeição sanguínea, o flebotomíneo adquire o sangue contendo as formas amastigotas presentes no hospedeiro mamífero, que rapidamente se diferenciam nas primeiras formas promastigotas no vetor, denominadas promastigotas procíclicas. Essa diferenciação ocorre nas primeiras 24 – 48h no intestino posterior separadas do epitélio intestinal por uma barreira chamada matriz peritrófica tipo I. Essa forma corresponde à primeira fase de multiplicação no interior do vetor e tem por característica seu pequeno flagelo e relativa resistência às enzimas digestivas. Apesar de muitas morrerem no processo, há uma parcela que resiste e se multiplica sucessivamente. Após isso, essas formas se diferenciam e dão origem ao promastigota nectomona, que tem tamanho maior que a forma procíclica e tem a capacidade de evadir a membrana peritrófica e se aderir ao epitélio intestinal pelo flagelo, presente na porção anterior do corpo celular. Após essa diferenciação, ocorre outra subsequente originando a forma leptomona. Sua principal função é a replicação massiva e o aumento considerável no número de parasitas. Essa forma sofre um processo posterior de metaciclogênese, formando promastigotas metacíclicos, infectivos, que se acumulam próximo a válvula estomodeal e podem ser transmitidos aos hospedeiros mamíferos. As leptomonas também secretam um gel (PSG

– do inglês “promastigote secretory gel”), que envolvem os parasitas próximos a válvula aumentando a obstrução da faringe do inseto (Bates, 2007). Existe também uma forma chamada haptomona que se adere firmemente a válvula estomodeal, causando grande obstrução. Ainda não se tem certeza de qual seria a sua forma precursora – nectomona ou

leptomonas. Esses vários mecanismos de obstrução da probóscide do inseto são importantes na transmissão do parasita. No momento da picada, o excesso de parasitas associada a probóscide impede o movimento de sucção do sangue, sendo necessário que o inseto regurgite aquela massa parasitária no hospedeiro para liberar sua faringe. Além disso, os flebotomíneos são organismos telmofágicos, ou seja, rompem o tecido e vasos adjacentes formando pequenas “poças de sangue”, onde fazem sua refeição sanguínea. Essa forma de alimentação causa grande irritação no local e, por consequência, um maior recrutamento de célula e mediadores de resposta imune do hospedeiro. Essas duas características combinadas são muito favoráveis a uma infecção bem-sucedida (Langley, 1976; Bouchet e Lavaud, 1999).

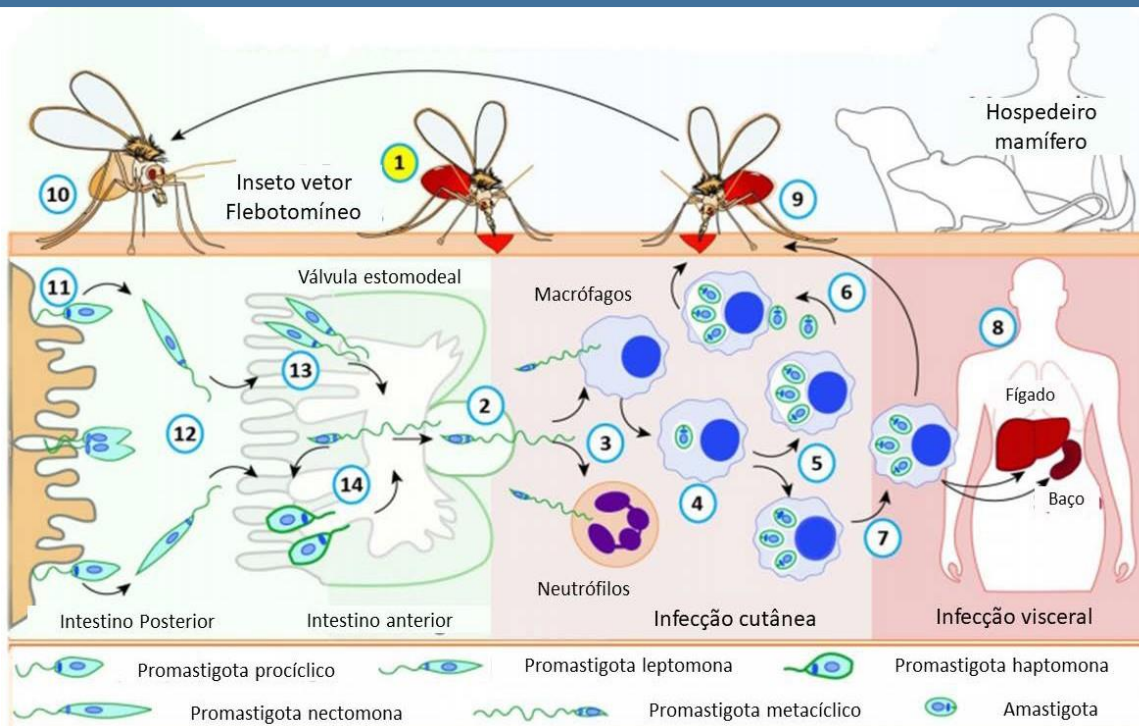
Recentemente foi descrita uma nova forma de promastigota, denominada retroleptomonas, que corresponde a um metacíclico que se desdiferencia e volta ao estado de leptomona, onde se multiplica intensamente e posteriormente se diferencia novamente em metacíclicos. Isso ocorre a cada ciclo de alimentação sanguínea, o que promove um aumento de parasitas no interior do vetor e consequentemente de inóculo no hospedeiro vertebrado durante a picada. O ciclo de diferenciação da *Leishmania* dentro do hospedeiro invertebrado está descrito na **Figura 5** (Serafim *et al*, 2017; Teixeira *et al* 2013; Kamhawi, 2006).





#### 2.4. Ciclo de vida de *Leishmania* no hospedeiro mamífero

Ao serem regurgitadas no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas metacíclicas encontram uma série de barreiras físicas e imunológicas. Mediadores ligados ao parasito como: PSG, exossomas e moléculas de superfície, além da saliva do vetor, que possui atividade anti-hemostática e antiinflamatória, sensibilizam o hospedeiro e ativam o recrutamento de células do sistema imune de mamíferos, em especial macrófagos e neutrófilos (Atayde *et al*, 2016; Mondragon-Shem *et al*, 2020). Após o contato inicial, os parasitos são fagocitados por macrófagos e se mantêm dentro do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam. Essa multiplicação ocorre até que o vacúolo contendo os parasitas se expanda e ocupe boa parte do citoplasma da célula, causando o rompimento da mesma. Dessa forma há a liberação de parasitas no meio extracelular, que podem infectar novas células, estabelecendo a infecção no hospedeiro (**Figura 6**).



**Figura 6.** Ciclo de vida de *Leishmania* completo. Durante a refeição sanguínea (1), os insetos flebotomíneos infectados regurgitam sangue, transmitindo e liberando os promastigotas metacíclicos (2) que não se replicam, mas são altamente infecciosos, no hospedeiro mamífero. Os parasitas são fagocitados por macrófagos e neutrófilos (3). Nos macrófagos, os parasitas se diferenciam em amastigotas infectantes (4), que se multiplicam por fissão binária (5), após a saída da ruptura células e infectar outras células vizinhas (6). Para espécies de *Leishmania* que causam a forma visceral da doença, diferentes órgãos podem ser alcançados, como fígado ou baço (7), onde os parasitas se replicarão e estabelecerão a infecção (8). Quando um flebotomíneo se alimenta de sangue de um hospedeiro mamífero infectado (9), células circundantes contendo amastigotas ou amastigotas livres liberadas serão ingeridas. Quando dentro do intestino do inseto (10), os parasitas irão se diferenciar novamente em promastigotas pró-cíclicos no intestino posterior (11), que se multiplicarão e migrarão (12) para o intestino médio anterior (válvula estomodeal) do inseto (13) onde eles se diferenciarão em formas infecciosas metacíclicas. Esse processo se chama metaciclogênese. Promastigotas metacíclicos que não são regurgitados durante a refeição de sangue sofrem desdiferenciação em promastigotas retroleptomonas, se tornando multiplicativos novamente dentro do vetor, aumentando a quantidade de parasitas haptomonas anexados ao intestino médio anterior do flebotomíneo, aumentando por consequência o número de parasitos metacíclicos (14). Fonte: Silva *et al*, 2020 – Modificado e traduzido.

## **2.5. Moléculas biológicas importantes na interação parasita x hospedeiro:**

### **Os lipídeos.**

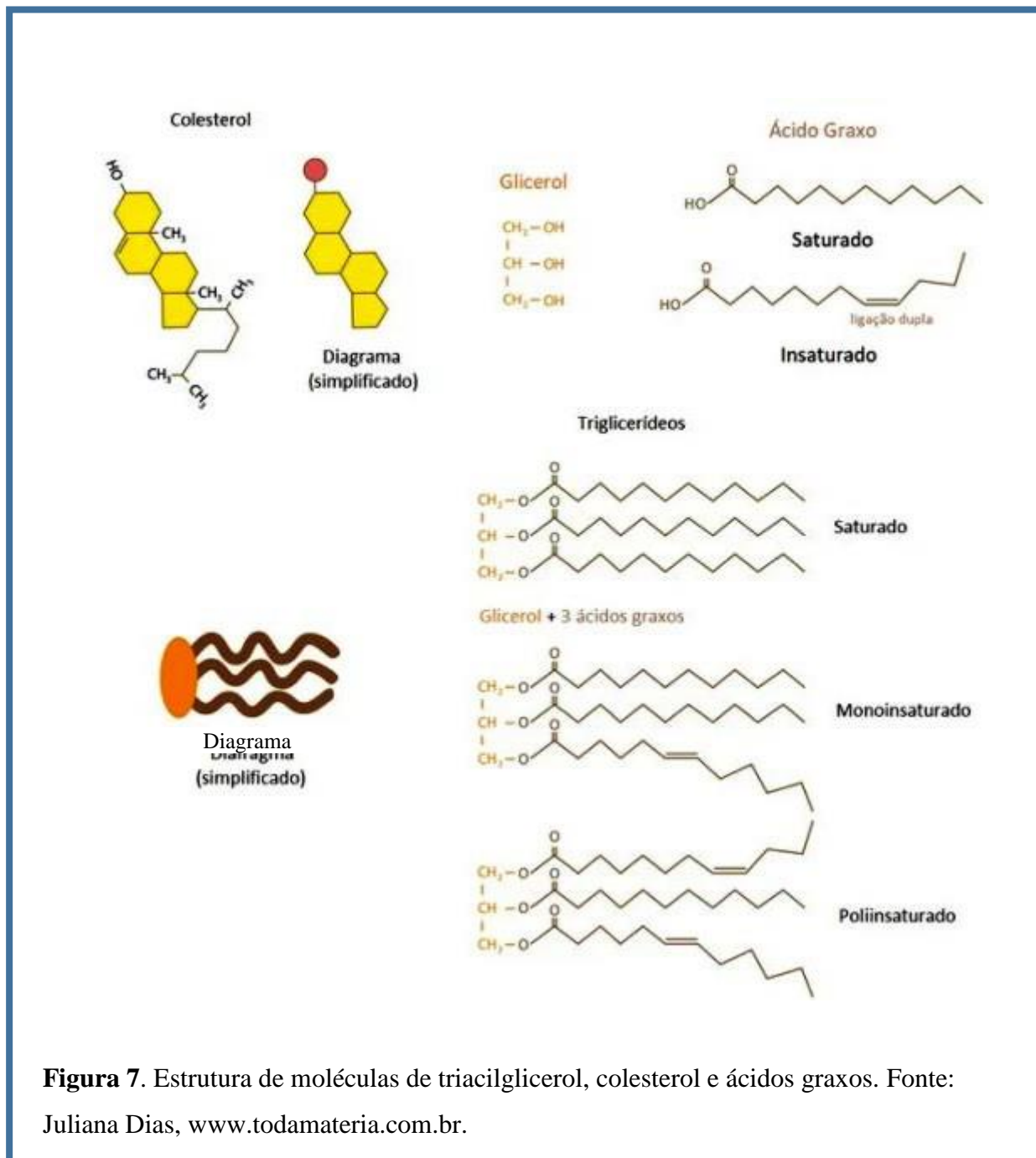
Por definição, parasita é um organismo que se utiliza de componentes do seu hospedeiro para sobreviver e/ou reproduzir. A *Leishmania*, assim como outros hemoparasitos, precisam em ao menos um estágio de sua vida de nutrição por componentes do sangue. Moléculas biológicas como carboidratos, proteínas e lipídeos são usadas como fonte de energia e ajudam na manutenção do metabolismo desses parasitos.

Lipídeos constituem um grupo de compostos que tem em comum a insolubilidade em água. Possuem funções biológicas diversas, assim como sua química. Geralmente, são utilizados para armazenamento de energia na maioria dos organismos. Apresentam também funções estruturais em membranas biológicas, precursor de hormônios, mensageiros intracelulares, co-fatores de enzimas, agentes emulsificantes, dentre outras funções (Voet e Voet, 2006; Nelson e Cox, 2008). Como exemplo, temos os triacilgliceróis (TAG) que são a principal forma de armazenamento de energia em muitos organismos; fosfolipídeos (FL) e esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas; o colesterol, além de um componente vital das membranas celulares, é um precursor dos hormônios esteroides e sais biliares; e o ácido araquidônico é o precursor das prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas, que são potentes mediadores intracelulares capazes de controlar vários processos complexos. Essas variadas funções biológicas fazem com que os lipídeos sejam importantes alvos de estudo (Iqbal e Hussain, 2009).

Lipídeos fornecem o meio no qual as proteínas integrais de membrana (aquelas nas quais os domínios transmembrana abrangem a bicamada) estão dispersas. Proteínas periféricas também interagem com a superfície da membrana e são encontradas parcialmente inseridas na bicamada lipídica. Estas proteínas anfitrópicas são encontradas nos compartimentos aquosos da célula e interagem com a superfície de membrana de modo reversível. A bicamada lipídica fornece um rico e variado ambiente para as proteínas que incluem um interior altamente hidrofóbico delimitado pela região hidrofílica em contato íntimo com a superfície da membrana. Cada classe de lipídeos é constituída de um amplo espectro de variantes químicos e estruturais que em conjunto determinam a fluidez da membrana, permeabilidade e carga superficial.

Em artrópodes, lipídeos são usados como substratos para reprodução, embriogênese, metamorfose e voo. Além disso, são usados como meio de comunicação (feromônios),

regulação de diversos processos fisiológicos (hormônios), proteção em ambientes extremamente secos (cutículas lipídicas) e como constituintes celulares (membranas) (Gilbert e Haruo Chino, 1974).



## 2.6. Reservatórios e a Zoonose

Reservatórios são indivíduos, que tem a capacidade de manter o parasita no meio natural durante certo tempo e espaço. São conhecidos como sentinelas para a população humana, pois em geral, as infecções nos animais antecedem os casos humanos. Eles podem ser “reservatórios de manutenção”, caso apenas mantenham a população de parasitas circulantes, ou podem ser “reservatórios amplificadores”, caso além de manter os parasitas circulantes na natureza, permitam um incremento na população dos mesmos favorecendo assim as infecções. Esses 2 papéis podem ser alternados por uma mesma espécie em determinado tempo/espaço (Alencar, 1959; Roque e Jansen, 2014).

O parasito *Leishmania* já foi encontrado em diversas espécies de mamíferos domésticos como: cães, gatos, vacas, cabras, coelhos e equinos e selvagens, como: raposa, gambás, rato selvagem, lebres, búfalos e cangurus vermelhos, o que demonstra uma grande heterogeneidade genética e plasticidade na sua adaptação a biologia de vários animais (Mhadhbi e Sassi, 2020 ). Por esse motivo, os ciclos de transmissão que envolvem *Leishmania spp* são bem complexos e variam de acordo com as regiões, em especial quando falamos de ciclos silvestres. Assim, visto essa grande capacidade de infecção de diferentes espécies, Roque e Jansen, 2014 discutem até mesmo a adequação do termo “tropismo” para esse grupo de parasitas.

“Assim, desafiamos o conceito clássico de tropismo de tecidos das espécies de *Leishmania*. Este termo vem do grego “tropos”, um movimento em uma direção particular em resposta a um estímulo externo. Em *Leishmania spp.*, entretanto, as células do sistema fagocítico mononuclear representam o nicho preferencial. Em termos ecológicos, os tecidos onde as espécies de *Leishmania* são encontradas representam nichos mais favoráveis para o estabelecimento permanente, que podem variar entre os hospedeiros mamíferos; a infecção preferencial não é o resultado de um tropismo por um determinado tecido.”

A maioria dos reservatórios sugeridos para *Leishmania spp* são baseadas em achados moleculares de infecções naturais, porém só essa informação não é suficiente para estruturar que tal espécie tenha importância epidemiológica na manutenção da população de parasitas. Para que uma espécie seja considerada um reservatório há vários parâmetros levados em consideração como espécie e coinfeções no hospedeiro, hábitos de vida, nicho, tempo de multiplicação do parasita e ciclo de vida, via de exposição e intensidade da mesma, entre outros. Assim, para que uma espécie seja um bom

reservatório é necessário que todos esses fatores se combinem juntos e ao mesmo tempo. Por outro lado, essa combinação pode variar de acordo com as mudanças no meio e tornar outras espécies mais aptas a transmitir o patógeno (Roque e Jansen, 2014).

Apesar das questões supracitadas, de forma geral, uma espécie é aceita como reservatório quando combina um xenodiagnóstico e a cultura de tecidos positivas mostra uma potencial biodisponibilidade de parasitas ao vetor. Para a leishmaniose, algumas dessas espécies são: do gênero *Didelphis*, das ordens *Pilosa*, *Cingulata*, *Rodentia*, *Chiroptera* e *Primata*. Entretanto, até hoje os reservatórios mais significativos são os da ordem *Carnivora*: os canídeos, e mais recentemente, os gatos domésticos (*Felis catus*). (Roque e Jansen, 2014; Santos e Oliveira, 2019)

Os gatos têm sido uma escolha muito comum para tutores da atualidade, devido a um conjunto de fatores, entre eles praticidade e necessidade de menos espaço disponível ao animal. A leishmaniose felina tem emergido mais comumente nos últimos 20 anos, em geral, nas regiões endêmicas (Mhadhbi e Sassi, 2020). A principal forma de transmissão atribuída aos felinos é a picada do flebotômíneo infectado. Os dados sobre os gatos domésticos infectados com *Leishmania* são mais limitados que os de cães, além do fato que em geral suas infecções são subclínicas ou raras. No entanto, em regiões endêmicas, esses indivíduos podem atuar como um reservatório secundário, pois são capazes de infectar o flebotômíneo. No Brasil, alguns estudos mostram que a prevalência varia de 6 a 15% de infecção em felinos em regiões endêmicas, porém em algumas regiões, como Araçatuba, em São Paulo, chega a 49%. (Pennisi e Persichetti, 2018; CRMVSP, 2021; CVBD, 2021)

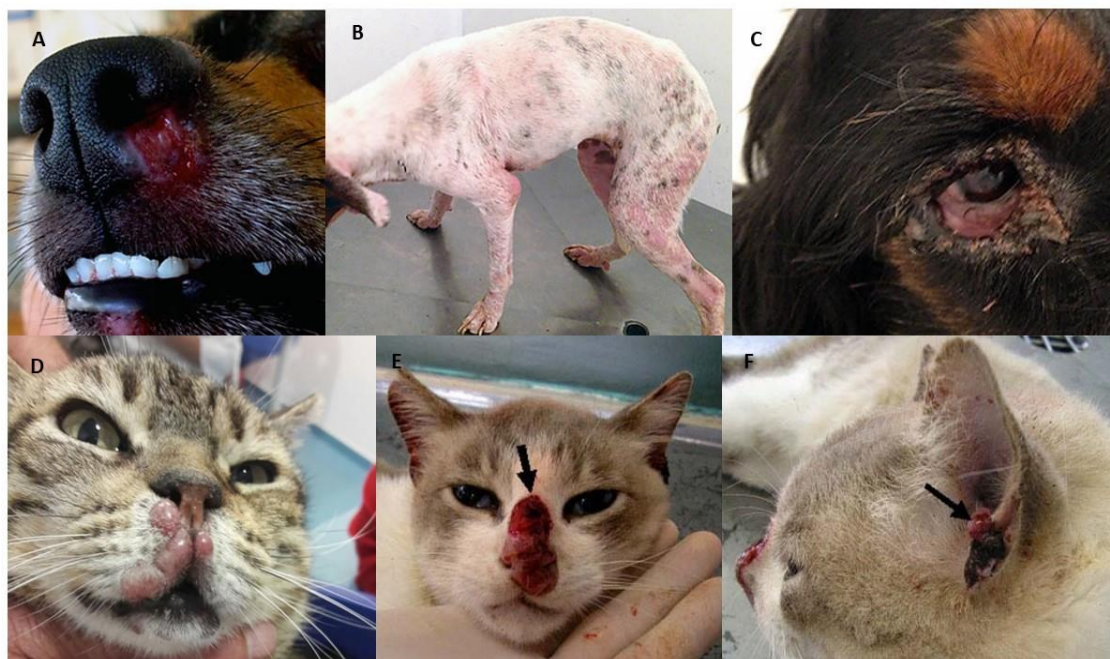
Apesar da *L. infantum* ser a espécie mais comumente achada nos felinos infectados, alguns trabalhos mostram a presença de outras espécies como *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* no Novo Mundo (Solano-Gallego *et al*, 2009; Pennisi *et al*, 2015). Do ponto de vista imunológico, a resposta humoral e adaptativa mediada por células dos gatos susceptíveis é similar a dos cães, sendo o desequilíbrio entre o perfil de células TH2/TH1 o principal fator que leva ao desenvolvimento dos sinais clínicos (Solano-Gallego *et al*, 2009; Esch *et al*, 2013). Alguns estudos vêm relacionando o agravamento da doença com o aumento na expressão de anticorpos anti- *Leishmania*, conforme também observamos nos cães. Alguns sintomas são comuns as infecções caninas e felinas como linfadenomegalia, perda de peso, anorexia, letargia, poliúria e polidipsia, estomatite entre outros (Figura 7) (Pennisi e Persichetti, 2018).

Os cães são de longe o principal reservatório mais conhecido de leishmaniose no ciclo urbano (Dantas-Torres *et al*, 2019). A leishmaniose canina afeta cerca de 70 países e pode ser encontrada em quase todos os continentes. Em algumas regiões da Europa os números de cães diagnosticados podem chegar 2,5 milhões de cães. Na América do Sul, também se estima que haja milhões de cães infectados, porém essa estimativa costuma ser subestimada devido à dificuldade de diagnóstico e subnotificação. Além disso, a política pública de recolhimento de animais errantes é por vezes ineficaz, o que permite que esses cães permaneçam em ambientes superlotados e expostos a infecção, sem cuidados adequados. (CVBD, 2020).

O cão é considerado um bom reservatório, pois seu contato constante com o homem proporciona uma fonte de infecção que permanece rotineiramente próxima as pessoas. Além disso, eles possuem um longo período pré-patente de infecção, uma alta carga parasitária na pele, proporcionando uma fonte de aquisição de parasitas aos vetores e apresentam muitos casos de recidivas após o tratamento. Hoje, cerca de 50% dos cães infectados são assintomáticos, alguns podem progredir para a cura, sendo considerados resistentes. No entanto, cães assintomáticos são competentes para transmitir a infecção, sendo motivo de igual preocupação na questão de saúde pública. (CVBD, 2020). Alguns trabalhos têm mostrado a presença de mais de uma espécie de *Leishmania* em um mesmo cão infectado, como *L. amazonensis* (Sanches *et al*, 2016)

Nos indivíduos sintomáticos, os sintomas podem ser muito inespecíficos, como febre, anemia e perda de peso, porém pode haver apoplecia, atrofia muscular, ulcerações cutâneas, hiperqueratose, onicogribose, epistaxe, esplenomegalia entre outros (**Figura 8**). (CRMVSP, 2021)





**Figura 8.** Cães e gatos com sinais clínicos de leishmaniose. (A) epistaxe, (B) perda de peso, (C) ulcerações oculares, (D) lesões cutâneas, (E) epistaxe com lesão nasal e (F) nódulos na orelha. Fonte: (A - C) Folha de São Paulo (D) Cláudia Pinto, 2019 e (E - F) Souza *et al*, 2009.

## 2.7. Carrapatos e a transmissão da Leishmaniose

Os carrapatos são artrópodes hematofágicos, que parasitam todas as espécies de vertebrados, exceto os peixes. Seu registro fóssil é precário, porém indica que sua existência data de 65- 146 milhões de anos atrás, na era do Cretáceo. São classificados como pertencente ao filo Artropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasitiformes e Subordem Ixodida. Essa subordem é dividida em 3 famílias: Argasidae conhecidos como carrapatos moles, Ixodidae, chamados de carrapatos duros e Nuttalliellidae, que possui apenas 1 espécie representante *Nuttalliella namaqua*. Atualmente, toda a subordem Ixodida possui aproximadamente 900 espécies descritas, sendo a maioria Ixodideos. O estilo de vida dos ixodídeos envolve uma alimentação por um longo período de tempo e de grandes quantidades de sangue por parte das fêmeas, a secreção de saliva no tecido dos hospedeiros, a baixa locomoção- em geral associada a atividade de seus hospedeiros- e a postura de uma grande quantidade de ovos (Nava, Guglielmone e Mangold, 2009 ;Baneth, 2014).

Os carrapatos são reconhecidos como vetores de doenças desde tempos muito antigos. Uma das primeiras menções a essa capacidade de parasitar outros hospedeiros



foi citada por Homero, cerca de 850 a.C., citando que o cão de Ulisses era infestado por carrapatos. Outra menção sobre a capacidade desse artrópode transmitir doenças é a descrição da “febre do carrapato” em um papíro egípcio em 1550 a.C. (Hoogstraal 1970- 1984; Obenchain and Galun 1982). Hoje, os carrapatos são o segundo maior vetor de doenças do mundo, atrás apenas do mosquito. Em certas partes do mundo, como a América do Norte, os carrapatos são o vetor de maior importância epidemiológica, por serem capazes de transmitir uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos e vem sido observada a expansão das regiões acometidas por esses vetores (de la Fuente, 2003; Baneth, 2014).

A expansão de áreas acometidas por carrapatos e as doenças adjacentes estão associados ao transporte por animais migratórios, introdução de uma nova espécie de hospedeiro em um habitat, onde antes eles não estavam presente, desequilíbrio ou mudança na localização de populações de animais selvagens, mudanças climáticas que permitem que ambientes antes inóspitos, agora se tornem adequados à colonização por novas espécies de parasitas/hospedeiros e desmatamento de áreas silvestres sem manejo adequado, o que permite o contato humano e de animais domésticos com esses artrópodes. Essas interferências antrópicas intensas no ecossistema facilitam que haja cada vez mais transbordamentos (ou em inglês *spillover*), proporcionando mais meios para que a capacidade vetorial desses carrapatos se altere e eles possam transmitir cada vez mais patógenos a um grupo maior de hospedeiros. Evidência disso é que várias “infecções vetorizadas por carrapatos” (TBI do inglês “tick-borne infections”), antes de acometerem a população humana e de animais domésticos e/ou de produção, eram circulantes apenas no contexto selvagem como no caso dos patógenos *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*,

*B. microti*, *Ehrlichia chaffeensis* e *A. phagocytophilum*. (Baneth, 2014; Plowright *et al*, 2017).

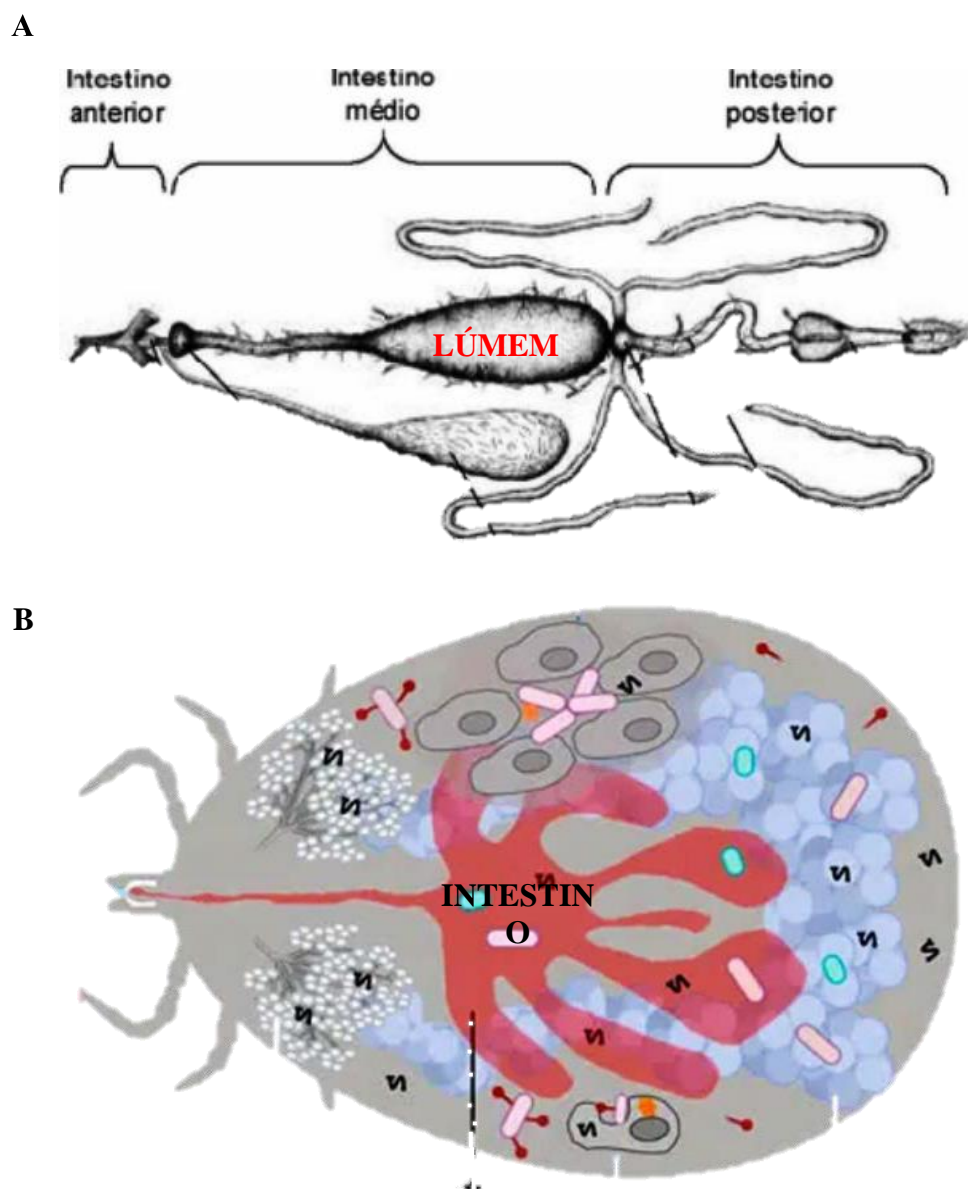
Nesse contexto, a observação de que o cão possui uma íntima e constante associação com carrapatos levantou o debate sobre a capacidade vetorial dos carrapatos frente ao parasita *Leishmania infantum*, principal causador da leishmaniose canina (LCan), uma vez que muitos casos de LCan se sobrepõem aos casos de erlichiose e babesiose, doenças vetorizadas por uma espécie de carrapato muito comum em cães, *Rhipicephalus sanguineus*. A presença de comorbidades nesses animais não é rara, e em muitos casos tem sido associada com a manifestação clínica de LCan em animais antes assintomáticos (Toepp *et al*, 2019; Manoj *et al*, 2020). Dessa forma, devido a essa associação, os pesquisadores têm o interesse em investigar a ligação desses ectoparasitos com a

transmissão e manifestação clínica da leishmaniose canina (Coutinho *et al*, 2005; Coutinho e Linardi, 2007; Ferreira *et al*, 2009; Dantas-Torres, 2011).

As controvérsias a respeito desse tema transpassam por décadas. Por um lado, a interação altamente específica da *Leishmania* com seu vetor faz com que se questione a possibilidade de um organismo tão distinto, como o carrapato, possa vetorizar com sucesso esse parasita para outros hospedeiros. Por outro lado, muitos trabalhos vêm sugerindo de que essa hipótese possa de fato ocorrer.

Uma tese de 1984, defendida na Universidade de Oklahoma, nos Estados Unidos, avaliou essa pergunta sobre o título “Um estudo da transmissão de leishmaniose canina por carrapato - *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) e uma comparação ultra estrutural de promastigotas”. Nesse estudo, a principal pergunta avaliada era se carrapatos naïve alimentados em cães infectados com *Leishmania sp*, quando se alimentassem em cães naïve, seriam capazes de transmitir o parasita. Num primeiro momento, ao fazer um cultivo das glândulas salivares desses carrapatos, o resultado se mostrou positivo a presença de *Leishmania* na cultura desde o dia 3 até o dia 95, confirmando sua viabilidade. No entanto, ao analisar por histologia em HE os tecidos e hemolinfa dos carrapatos, não se observou nenhum parasita. Após alguns outros ensaios, eles observaram que houve a detecção de anticorpos anti- *Leishmania* no sangue dos cães naïve, demonstrando que eles haviam tido um contato imune com o parasita. O cultivo dos linfonodos extraídos desses cães também mostrou a presença de parasitas livres. Apesar desses resultados, devido ao baixo número de cães testados e a massiva infestação por carrapatos, se discute se não seria um caso de transmissão mecânica eventual.

Algo a ser considerado quando comparamos carrapatos e flebotomíneo é sua estrutura interna (**Figura 9**). É bem estabelecido que a *Leishmania* interage em vários estágios especificamente com algumas regiões do intestino do flebotomíneo, como o intestino médio e a faringe (Serafim *et al*, 2017). Dessa forma, precisamos considerar que o processo de digestão dos flebotomíneo e carrapatos possuem diferenças tanto anatômicas, digestão extracelular no lúmen do intestino no caso dos flebotomíneo versus digestão intracelular em um intestino altamente ramificado sem lúmen no caso dos carrapatos, quanto metabólicas como, secreção de enzimas, pH, composição da matrix peritrófica (INCTEM - 2012).



**Figura 9.** Comparação entre os sistemas digestórios de flebotomíneo e carrapato. Fonte: (A) Desenho esquemático do intestino de um flebotomíneo. (Campolina, 2017- modificado) e (B) desenho esquemático do intestino de um carrapato. (Jornal da USP – Pesquisadora Andréa Fogaça - modificado).

Vários estudos sugerem, que o carrapato *R. sanguineus* pode ser vetor secundário da leishmaniose, em particular em locais onde não há a detecção do vetor habitual *Lutzomyia longipalpis*, porém há registro de casos autóctones de LCan. Alguns estudos mostram a presença de kDNA e RNA de *Leishmania* em macerados de carrapatos coletados de cães e a presença de formas promastigotas em diferentes órgãos como ovários, intestino e glândulas salivares de carrapatos, sugerindo um possível ciclo do parasita nesse artrópode

(Viol *et al*, 2016). Também há estudos que sugerem um possível mecanismo de resposta imune por parte dos hemócitos de carrapato, principais células mediadoras da resposta imune inata de invertebrados, contra *Leishmania* spp. (Campos e Costa, 2014; Trotta *et al*, 2021; Morasi *et al*, 2013; Dantas – Torres, 2011; de Sousa *et al*, 2013; Feitosa *et al*, 2018; Cazan *et al*, 2020; Sgroi *et al*, 2021). Esses fatos evidenciam as controvérsias na comunidade científica a cerca desse tema (Otranto e Dantas- Torres, 2009; Paz *et al*, 2010).

## 2.8. Cultivo Celular como ferramenta de estudos biológicos

O cultivo celular começou seu desenvolvimento no início do século XX com Harrison, em 1907, estabelecendo o crescimento de fibras nervosas embrionárias de rã *in vitro* e mais tarde com Carrel, em 1912, fazendo explantes de tecido conjuntivo de filhote de galinha. O objetivo primário dessa técnica era avaliar o comportamento celular livre das variações ambientais que o organismo completo proporciona, e dessa forma isolar o efeito das variáveis avaliadas no estudo (MOLINARO,2012; SKLOOT, 2011).

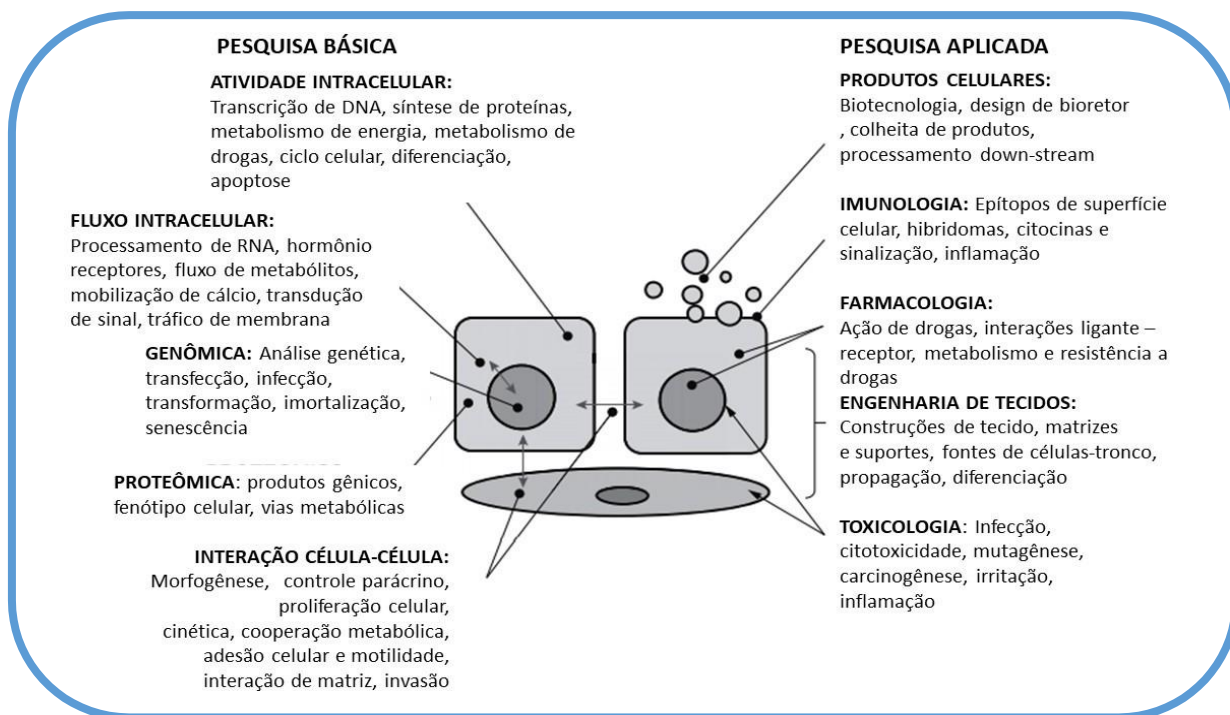
Os primeiros estudos se deram isolando fragmentos de tecidos animais de forma mecânica. Estes eram mantidos com incremento de nutrientes; no começo eram utilizados fluidos animais e mais tarde foram desenvolvidos meio de cultivos cada vez mais específicos para atender a necessidade de cada tipo celular. Nesse período, houve muitos avanços e estabelecimento de linhagens, tanto primárias como permanentes, de várias espécies de animais. **(Tabela 2)**

Todo esse avanço culminou no estabelecimento da primeira linhagem celular humana - HeLa - em 1952, por Gey *et al.*, a partir do carcinoma cervical de uma paciente negra chamada Henrietta Lacks (SKLOOT, 2011). O desenvolvimento dessa linhagem foi fundamental para diversos avanços nas mais variadas vertentes da ciência, incluindo a testagem de resistência antimicrobiana, pesquisas sobre doenças degenerativas, terapia celular, bem como o estabelecimento de outras linhagens contínuas.

Hoje em dia, as linhagens celulares não se limitam mais apenas ao seu objetivo original, mas seu estudo tem influência direta no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para uso na medicina, compreender melhor as interações entre patógenos e hospedeiros, elaboração de bioprodutos, entre outras utilidades, como mostrados na **figura 10**.

Data	Evento	Referência
1907	Crescimento de fibra nervosa de embrião de rã <i>in vitro</i>	Harrison, 1907
1912	Explantos de tecido conjuntivo de pintinhos; músculo cardíaco contrátil por 2–3 meses	Carrel, 1912; Burrows, 1912
1916	Tripsinização e subcultura de explantes	Rous & Jones, 1916
1923	Subcultura de linhas de células fibroblásticas	Carrel & Ebeling, 1923
1925–26	Diferenciação de tecidos embrionários em cultura de órgãos	Strangeways & Fell, 1925, 1926
1929	Cultura de órgãos de ossos longos de pintinhos	Fell & Robison, 1929
1948	Introdução do uso de antibióticos em cultura de tecidos	Keilova, 1948; Cruikshank & Lowbury, 1952
1943	Estabelecimento do fibroblasto de células L de camundongo; primeira linhagem celular contínua	Earle et al., 1943
1948	Clonagem da célula L	
1948	Crescimento do vírus em cultura de células	Sanford et al., 1948
1949	Crescimento do vírus em cultura de células	Enders et al., 1949

**Tabela 2.** Principais eventos no desenvolvimento de culturas de células e tecidos na primeira metade do século XX. Fonte FRESHNEY, 2010 - Traduzido e modificado.



**Figura 10.** Aplicações para técnica de cultivo celular. Fonte FRESHNEY, 2010 - Traduzido.

Os avanços no campo do estabelecimento e manutenção das linhagens celulares não se restringiram a células de mamíferos. Um exemplo de organismo que tem um

número de linhagens crescendo exponencialmente nas últimas décadas é o **carrapato**. As células de linhagem de carrapato foram desenvolvidas há mais de 50 anos e desde então vem sendo utilizadas para inúmeros fins como pesquisa nas relações entre parasita x hospedeiro x vetor, biologia básica de parasitas e vetores, isolamento de patógenos, manipulação genética, imunidade comparada de artrópodes e outros tópicos.

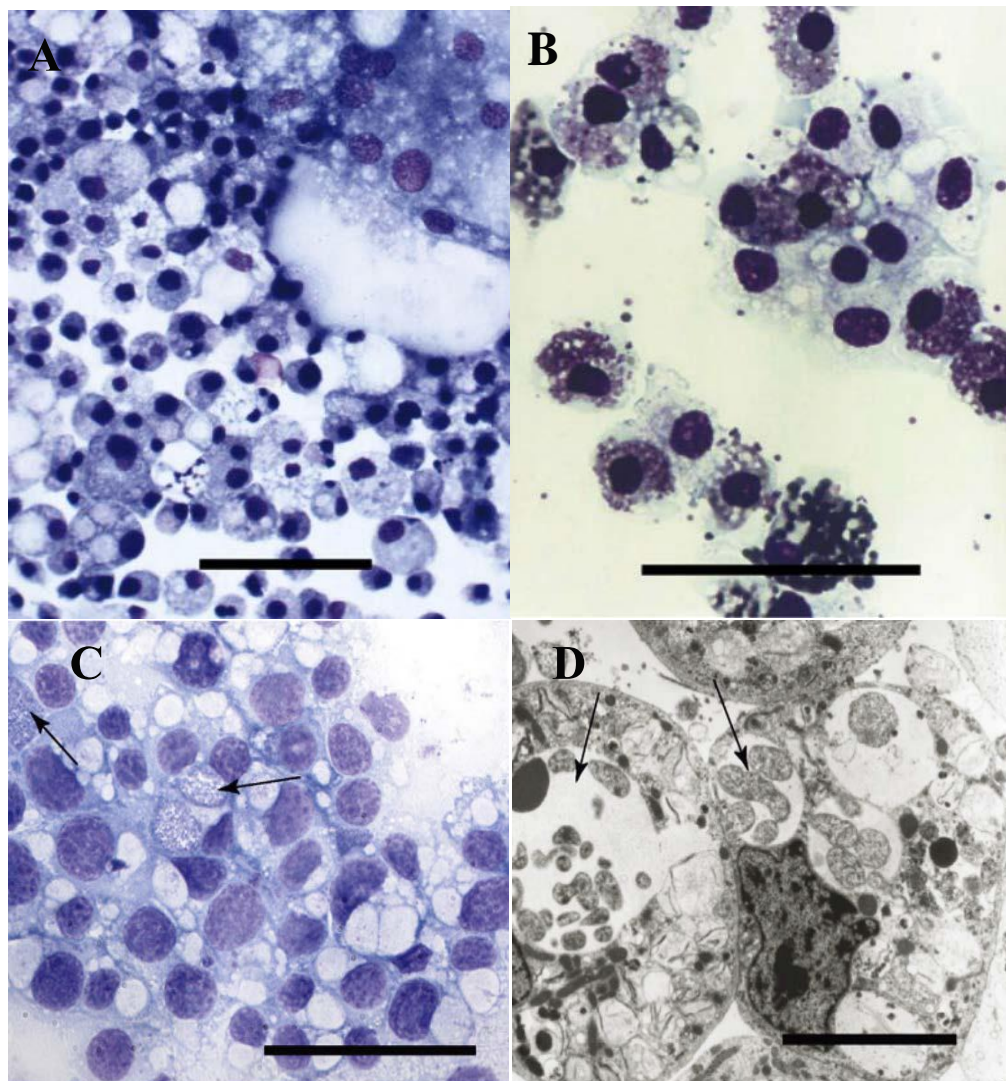
As linhagens celulares contínuas de carrapatos podem demorar a ser estabelecidas, mas apresentam muitas vantagens na rotina laboratorial. São células de fácil manutenção e podem sobreviver em altas densidades sem precisar de subcultivos regulares. Além disso, essas linhagens não têm seu crescimento inibido pelo contato célula-célula, e por essa razão crescem em 3 dimensões. Não possuem uma forte aderência com as superfícies, formando uma monocamada que facilmente entra em suspensão. Apesar de exigirem certa dedicação na ressuscitação das células criopreservadas, podemos mantê-las assim por mais de 10 anos (MUNDERLOH e KURTTI, 1989; Bell- Sakyi *et al*, 2007; Bell- Sakyi *et al*, 2018).

Essas linhagens são desenvolvidas a partir de ovos, larvas ou ninfas desses artrópodes, o que faz essas linhagens embrionárias possuírem pelo menos 2 tipos celulares. Essa heterogeneidade celular se mostrou fundamental para a manutenção das linhagens em longo prazo, visto que a tentativa de fazer linhagens com clones não foi bem-sucedida. A maioria das linhagens desenvolvidas até hoje foi a partir de Ixodídeos, que conservaram várias características de seus progenitores como: A boa resistência e longa duração das linhagens, visto que é necessário apenas trocas semanais de meio de cultura e eventuais subcultivos. Além disso, possuem crescimento lento, o que favorece seu uso no isolamento de alguns patógenos. Por serem provenientes de artrópodes hematófagos, eles apresentam uma boa sobrevivência aos meios de cultivo de mamíferos. MUNDERLOH e KURTTI, 1989, descreveram a formulação mais usada hoje em dia para a manutenção dessas células baseado no meio L15 (Leibovitz) modificado e suplementado com caldo triptose fosfato e soro fetal bovino. Essas linhagens são mantidas no intervalo de temperatura de 28°C a 34°C sem uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), com algumas exceções que podem ser mantidos a 37°C. Algumas linhagens de argasídeos também já foram estabelecidas, mas não apresentam a mesma resistência que os cultivos de Ixodídeos (Bell- Sakyi *et al*, 2007; Bell- Sakyi *et al*, 2018). Uma das linhagens de Ixodídeos mais utilizadas nos estudos de interação e isolamento é a linhagem IDE8 de *Ixodes scapularis*. É uma linhagem embrionária com células grandes, semi

aderentes, com ramificações e pseudópodes, lembrando uma célula neuronal humana (**Figura 11C e D**) (Munderloh *et al*, 1994).

O Tick- Cell BioBank hoje é o principal banco de células de carrapato, que possui como principal objetivo isolar e desenvolver novas linhagens celulares, e distribuir essas linhagens pelo mundo a fim de aumentar o conhecimento relacionado a sua biologia. O Tick cell biobank possui em seu acervo mais de 70 tipos linhagens de artrópodes, incluindo Ixodídeos, Argasídeos, e alguns insetos vetores de doenças negligenciadas (**Figura 11**). Além disso, nos últimos anos, o Tick- Cell BioBank tem buscado estabelecer linhagens de insetos importantes na agricultura. Hoje, fica localizado na universidade de Liverpool, na Inglaterra e conta com alguns *outpots* em 3 outros continentes: Ásia – Malásia; África – Quênia e América – Brasil.





**Figura 11. Esfregaço em citocentrífuga corado com Giemsa de linhagem celulares contínuos de carrapato.** (A) Linhagem IRE/CTVM18 de *Ixodes ricinus* e (B) linhagem AVL/CTVM17 de *Amblyomma variegatum*, (C) *Ehrlichia canis* infectando a linhagem IDE8 e (D) *Ehrlichia ruminantium* infectando a linhagem IDE8. As setas indicam pontos onde há a presença de colônias bacterianas. Fonte: Bell- Sakyi *et al*, 2007.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é utilizar as linhagens celulares de carrapato como modelo *in vitro* a fim de esclarecer aspectos biológicos da interação carrapato e *Leishmania*.



### 3. Objetivo

Estabelecer um modelo *in vitro* de estudo da interação entre *Leishmania spp.* e carrapatos Ixodídeos, usando linhagens celulares do carrapato *Ixodes scapularis*.

#### 3.1. Objetivos específicos;

- Avaliar a capacidade de interação de promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* com as linhagens de celulares de carrapato;
- Avaliar a viabilidade das células de carrapato de linhagem durante infecção com *Leishmania spp.*
- Caracterizar a interação da *Leishmania* com células de carrapato por microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de carrapato frente à infecção por *Leishmania infantum*;
- Analisar o perfil lipídico das células de carrapato infectadas ou não por *Leishmania*

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Parasitos

Foram utilizadas duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) e *Leishmania infantum chagasi* (MCAN/BR/2008/1112). *L. amazonensis* foi mantida no meio de cultura “*Schneider Insect Medium*” suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (cripion) (SFB) e 50 µg/ml de Gentamicina (Sigma) à 26°C e *L. infantum chagasi* foi mantida no meio de cultura “*Schneider Insect Medium*” suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (cripion) (SFB) e 50ug/ml de Gentamicina (Sigma) à 26°C.

#### **4.2. Células de carrapato**

Foi utilizada a linhagem celular IDE8, da espécie de *Ixodes scapularis*, cedida gentilmente pelo Prof. Adivaldo Fonseca, DPA\_ UFRRJ e pela Dra. Lesley Bell-Sakyi da Universidade de Liverpool. A linhagem IDE8 foi mantida em meio L15B suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina à 29°C.

#### **4.3. Interação de células de carrapato com leishmanias**

As células de linhagem de carrapato IDE8 foram plaqueadas em lamínulas redondas de vidro em placas de 24 poços e mantidas a 34°C por 24h em meio L15B para IDE8. Após esse período, as células foram incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi* na proporção de 5:1 por 2 horas. Ao final desse tempo, os parasitos livres foram removidos por lavagem com PBS e a interação foi avaliada nos tempos de 2h, 24h e 48h. Ao final de cada tempo de incubação, as células foram fixadas por 10 minutos em metanol e coradas com Giemsa. O índice de associação (% células infectadas X número de parasitos / célula) foi determinado pela contagem de no mínimo 200 células por lamínula.

#### **4.4. Sobrevivência dos parasitos após a interação**

As células de linhagem de carrapato IDE8 foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas a 34°C por 24h em meio L15B. Após esse período, as células foram incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* na proporção de 5:1 por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio de cultivo por 48h. Ao final desse tempo, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado meio *Schneider* na placa por mais 48h no volume final de 500 µl/poço e as células incubadas a 26°C. Após esse período de incubação, o número de promastigotas por ml foi determinado em hemocítômetro.

#### **4.5. Coloração com azul de trypan (“trypan blue”)**

Células de linhagem IDE8 na concentração de  $2 \times 10^5$  foram infectadas conforme descrito acima e posteriormente, no tempo de 48 horas, células foram lavadas com PBS e coradas com azul de trypan 0,03% e contadas em microscópio invertido.

#### **4.6. Atividade de LDH**

O sobrenadante das incubações de 48h de infecção, conforme descrito no tópico anterior, foram centrifugados 2 vezes e congelados para análise posterior da atividade da enzima lactato desidrogenase, enzima citoplasmática utilizada como repórter de permeabilidade da membrana resultante de morte celular (PEREIRA, 2017; THOMASSIAN *et al*, 2007). Para essa análise foi utilizado kit da Promega (CytoTox96 Non- Radio). Sobrenadantes foram incubados com 50µl de substrato. Após 30 minutos no escuro, foi adicionado 50µl de solução stop. A leitura foi feita a 490 nm em leitor de placa.

#### **4.7. Microscopia eletrônica de varredura**

O processamento da amostra foi realizado em colaboração da Prof Maria Cristina Motta – UFRJ- usando lamínulas de vidro pré-revestidas com 1 mg / ml de poli-L-lisina. Células de carrapato IDE8 infectadas com *L. amazonensis* foram fixadas por 1 h em glutaraldeído a 2,5% diluído em PBS (pH 7,2)]. As células foram então aderidas a lamínulas, pós-fixado por 1 h com 1% de tetróxido de ósmio diluído em tampão cacodilato, e desidratado em uma série de álcool graduada (50%, 70%, 90% e duas trocas de etanol a 100% 33 durante 10 min a cada passo). As amostras foram secas em ponto crítico um aparelho Leica EM CPD030 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os espécimes foram revestidos com platina em um Leica EM SCD050 antes da visualização usando um Microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 40 VP.

#### **4.8. Microscopia eletrônica de transmissão**

Células de carrapato infectadas com *L. amazonensis* foram fixadas por 1 h em glutaraldeído tipo II a 2,5% diluído em PBS (pH 7,2). Eles foram lavados duas vezes em tampão cacodilato e pósfixados (1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio, 5 mM de cloreto de cálcio diluído em tampão cacodilato 0,1 M) por 1 h. As amostras foram então lavadas em tampão cacodilato, desidratado em uma série graduada de soluções de acetona (50%, 70%, 90% e duas trocas de 100% de acetona) por 10 min cada etapa, e incorporado em resina Polybed. Secções ultrafinas foram coradas com 5% de uranilo acetato de sódio por 45 min e citrato de chumbo por 5 min antes da observação em TECNAI Spirit (FEI) TEM funcionando a 80 kV. Esse procedimento também foi realizado em colaboração com a Prof. Maria Cristina Motta – UFRJ

#### **4.9. Dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Células de linhagem IDE8 foram incubadas a 34°C com *L. infantum* em garrafas de cultivo de 25cm<sup>3</sup> por 2h. Após, os parasitas livres foram lavados com PBS e a dosagem foi feita 48h após a infecção pelo método Amplex Red Invitrogen® 100µl/mL e lido em 540 nm no espectrofotômetro imediatamente após acrescentar o AmplexRed.

#### **4.10. Efeito da interação sobre perfil lipídico das células de linhagem**

A linhagem celular IDE8 foi incubada com *L. infantum* em garrafas de cultivo celular conforme descrito acima por 48h. Após esse período, as células foram ressuspensas e lavadas 2 vezes com PBS, contadas e número de células foi igualado em cada experimento. Foram 5 parasitas/ 1 célula de carrapato. As amostras foram utilizadas para extração de lipídeos.

#### **4.11. Extração de lipídeos**

A extração lipídica foi realizada de acordo com Bligh e Dyer (1959). As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS, em seguida foi adicionado uma solução de clorofórmio: metanol: água destilada (0,5:1:0,4 v/v). Em seguida, foram vortexadas em intervalos de 5 minutos durante 1 hora tornando-se uma fase única. Após as amostras seguiram para centrifugação a 3000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi novamente extraído. Ao final, ambos os sobrenadantes recolhidos foram incubados com uma solução de clorofórmio-água (1:1 v/v). Os sobrenadantes foram centrifugados por 3000 rpm por 30 min para separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi separada e armazenada em tubos de micro centrífuga.

#### **4.12. Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HP TLC)**

As fases orgânicas extraídas foram secas utilizando arraste de nitrogênio (N<sub>2</sub>) em banho seco a 37 °C até completa evaporação dos solventes para definir a quantidade de lipídeos. Após, os tubos foram pesados em balança semi-analítica e a quantidade de lipídeos foi estabelecida pela diferença entre pesos dos micros tubo vazios e peso dos micros tubo com amostra já seca (processo de gravimetria). Após a gravimetria, as

amostras foram ressuspensas em 20 µl de clorofórmio, homogeneizadas e utilizadas para análise do perfil lipídico.

O perfil lipídico foi determinado por cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC). Para isso amostras foram aplicadas em placas de gel de sílica 60, e submergidas numa solução de n-hexano-éter dietílico-ácido acético (30:40:0,5 V/V) para separação de lipídeos neutros. Para revelação das bandas formadas, placas foram coradas com reagente cromogênico de Charring e aquecidas a 200 °C por 30 minutos. Após revelação placas foram escaneadas e análise densitométrica foi realizada utilizando o programa Image Master Total Lab. Os lipídeos foram identificados por comparação aos padrões monoacilglicerol (MAG), fosfolipídeos (PL), oxisterol (OXY), ácido graxo (FA) e colesterol esterificado (CHOE).

#### **4.13. Incubação com precursor lipídico ácido palmítico <sup>3</sup>H**

As amostras foram incubadas com aproximadamente 180 µCi de <sup>3</sup>H-palmitato (<sup>3</sup>H-FA, ácido graxo (ácido palmítico/palmitato), ácido palmítico 16:0 [9,10- <sup>3</sup>H (N)], PerkinElmer, Boston, MA, USA) complexado a 288 µL de albumina livre de ácidos graxos 0,01g% (BSA-FFA, Sigma) por amostra. Foram feitas análises de lipídeos totais após 48h de interação e de lipídeos específicos nos tempos de 24h, 48h e 72h de interação.

#### **4.14. Análise por cintilação de lipídeos derivados de ácidos graxos com ácido palmítico <sup>3</sup>H**

Após a extração de lipídeos das células IDE8, infectadas ou não com *L. infantum*, previamente marcados com <sup>3</sup>H-FA-BSA, os mesmos foram concentrados por centrifugação, ressuspensos em 50 µL de clorofórmio, e utilizado 10% do volume total da amostra (5 µL) para fazer a estimativa da quantidade do complexo <sup>3</sup>H-FA-BSA se manteve dentro das células controle ou experimental. A alíquota de 10% da amostra foi inserida em tubos (Pico Pro Vial, 4 mL, PerkinElmer) junto a 1 mL de coquetel de cintilação (Optiphase Hisafe 3 - PerkinElmer). A radioatividade associada aos lipídeos foi determinada por cintilação líquida utilizando o cintilador PerkinElmer TriCarb

O contador de cintilação tem a capacidade de quantificar a radiação na amostra estimando quanto a amostra cintila em comparação aos seus padrões internos de cintilação - seja para radiação alfa, beta ou alfa e beta - emitida por isótopos como:

carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ), fósforo-32- ( $^{32}\text{P}$ ) e trítio ( $^3\text{H}$ ). Seu resultado é emitido em Contagens por minuto (CPMA) de radiação que compõe determinada amostra. Como a quantidade de CPMA varia de acordo com a precisão do aparelho utilizado, se faz necessária a conversão para uma unidade de radiação universal, chamada de Desintegrações por minuto (DPM). Essa conversão é feita com o auxílio de um padrão externo de contagem, a Curva de Quench para Trítio (Packard/PerkinElmer).

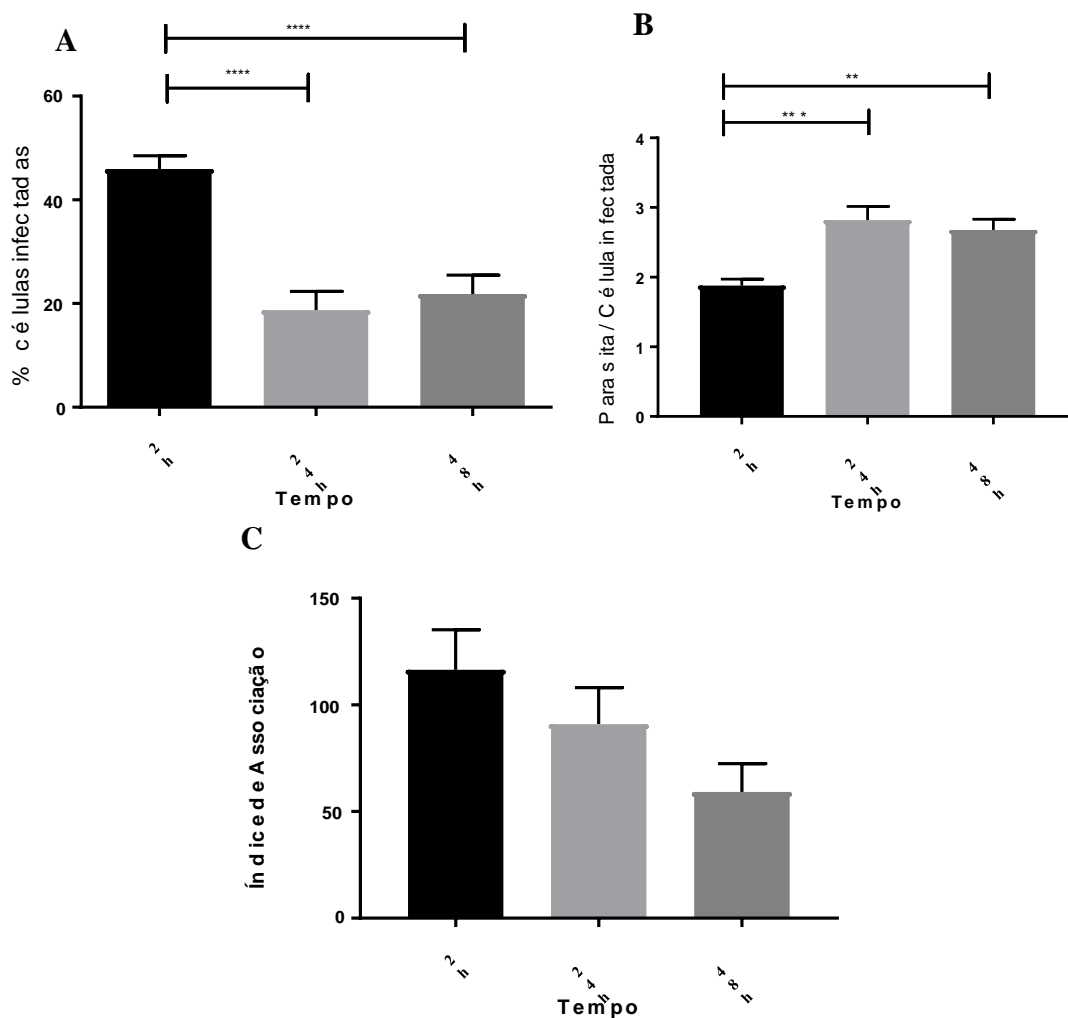
#### **4.15. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 7.0 software. O teste *Student's t-test* foi utilizado nas análises com somente dois grupos e ANOVA para mais de três grupos. Resultados de  $p > 0,005$  foi considerado uma diferença estatística significativa.

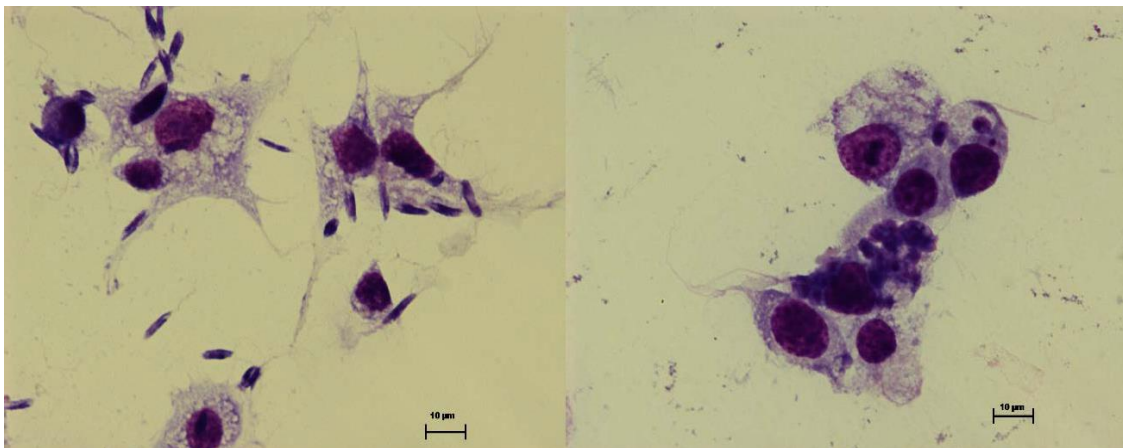
### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Interação carrapato x *Leishmania amazonensis***

Inicialmente avaliamos a interação de células IDE8 de *Ixodes scapularis* com promastigotas de *L. amazonensis*, espécie causadora de leishmaniose tegumentar em humanos e também já descrita em cães. Os resultados mostram em 24 e 48 horas uma diminuição na quantidade de células infectadas de aproximadamente 2,5 x em relação ao tempo inicial de infecção de 2h (**Figura 12A**). Apesar disso, o número de parasita por célula infectada tem um aumento significativo entre 2 -24h, de 1,5 x na quantidade de parasitas inicial e que se mantem em 48h (**Figura 12B**). Ao calcularmos o índice de associação que leva em consideração esses dois parâmetros não foi observado diferença significativa entre os tempos analisados (**Figura 12C**). Na microscopia óptica é possível observar interação de promastigotas de *L. amazonensis* com células de carrapato IDE8 em 2h e o parasita internalizado em 24h (**Figura 13**).



**Figura 12.** Interação IDE8 e *Leishmania amazonensis*. Células de linhagem IDE8 foram incubadas com promastigotas de *L. amazonensis* numa MOI de 5:1 por diferentes tempos. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos livres. As células foram incubadas pelos tempos indicados. Após esses períodos de tempo, foram determinados (A) % de células infectadas, (B) parasita/ célula e (C) índice de associação. Dados = média  $\pm$  SEM de 3 experimentos em triplicata. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$  e \*\*  $p < 0,0013$ .



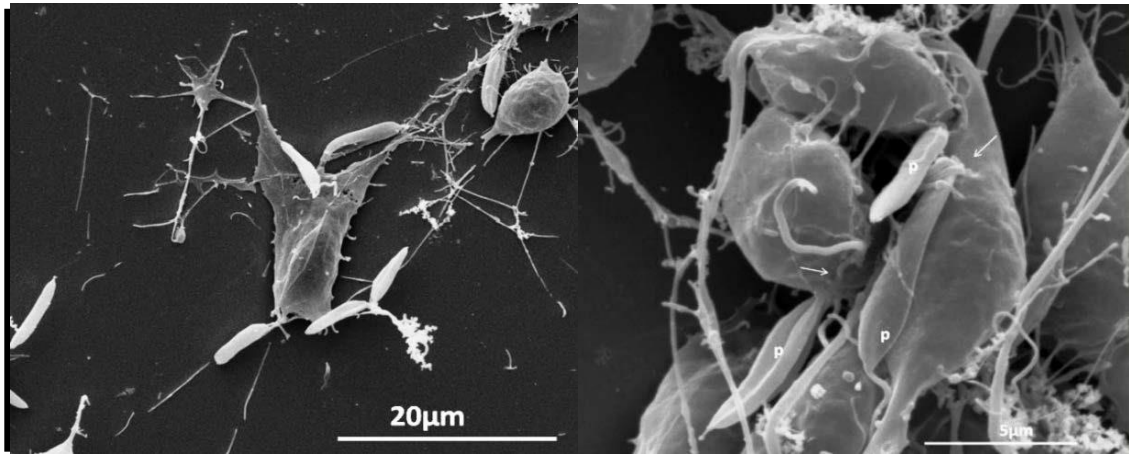
**Figura 13.** Interação entre IDE8 *Leishmania amazonensis*. Células de linhagem IDE8 foram incubadas com promastigotas de *L. amazonensis* numa MOI de 5:1 por diferentes tempos. Após 2h, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos livres. (A) O parasito está aderido a membrana da célula de linhagem IDE8 e (B) o parasito foi internalizado dentro da célula de linhagem IDE8.

## 5.2. Microscopias Eletrônicas da interação de Células de linhagem IDE8 com *Leishmania*.

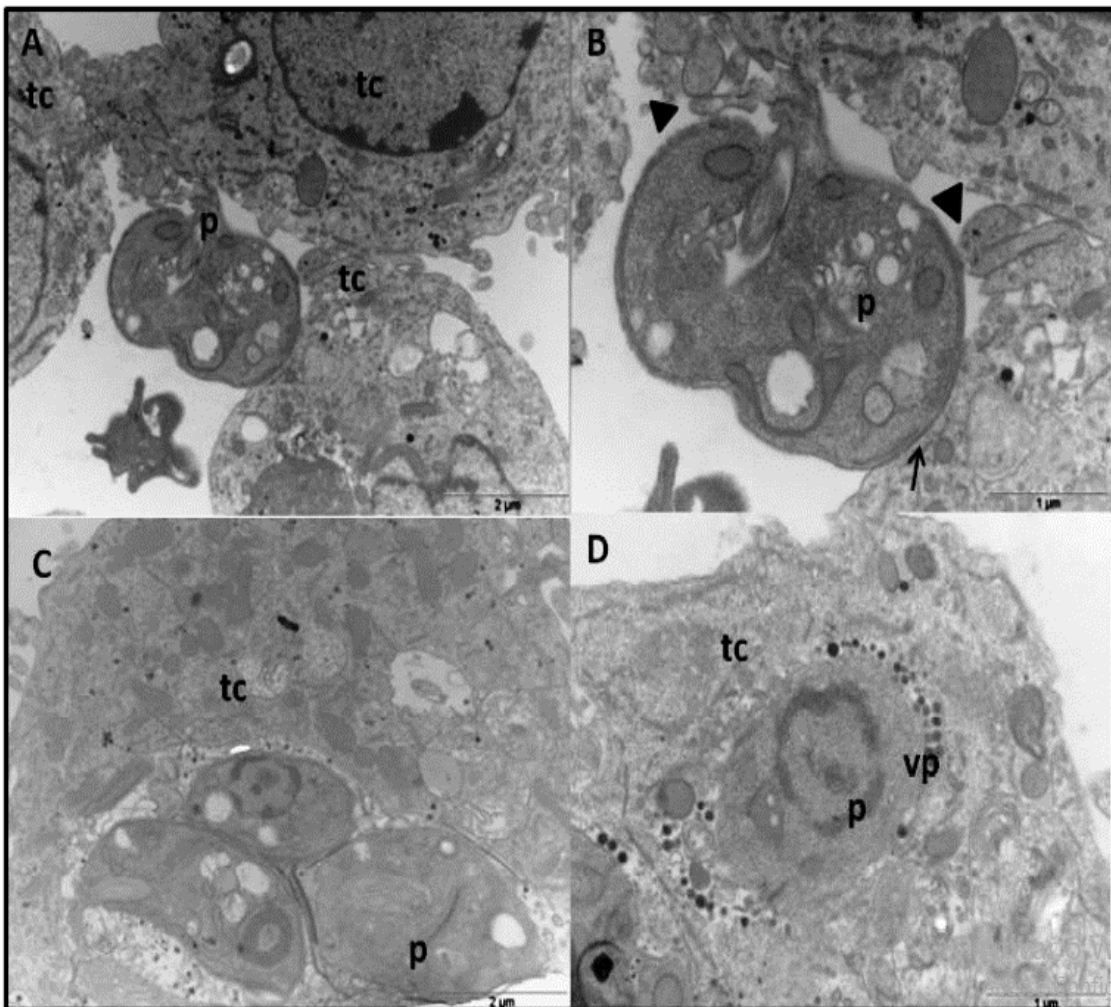
A fim de avaliar por ultraestrutura a interação entre as células de carrapato IDE8 os parasitas, realizamos uma microscopia eletrônica de varredura (**Figura 14**). Nas imagens de 2 horas podemos identificar formas promastigotas do parasita interagindo com a bolsa flagelar na extremidade da célula, de onde se projeta o flagelo, e com o corpo celular com as células IDE8.

Posteriormente avaliamos por microscopia eletrônica de transmissão os aspectos mais detalhados da interação nos tempos de 24h e 48h, onde se observa uma íntima associação dos parasitas possuem com a membrana das células IDE8 no momento da invasão da célula (**Figura 15A e B**). Além disso, observamos a formação de um vacúolo justaposto em torno dos parasitas (**Figura 15C**), assim como a presença de estruturas eletrondensas dentro do vacúolo justaposto ao parasita (**Figura 15D**).





**Figura 14.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de linhagem celular IDE8 incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 2 horas a 34°C. **P** = promastigotas.

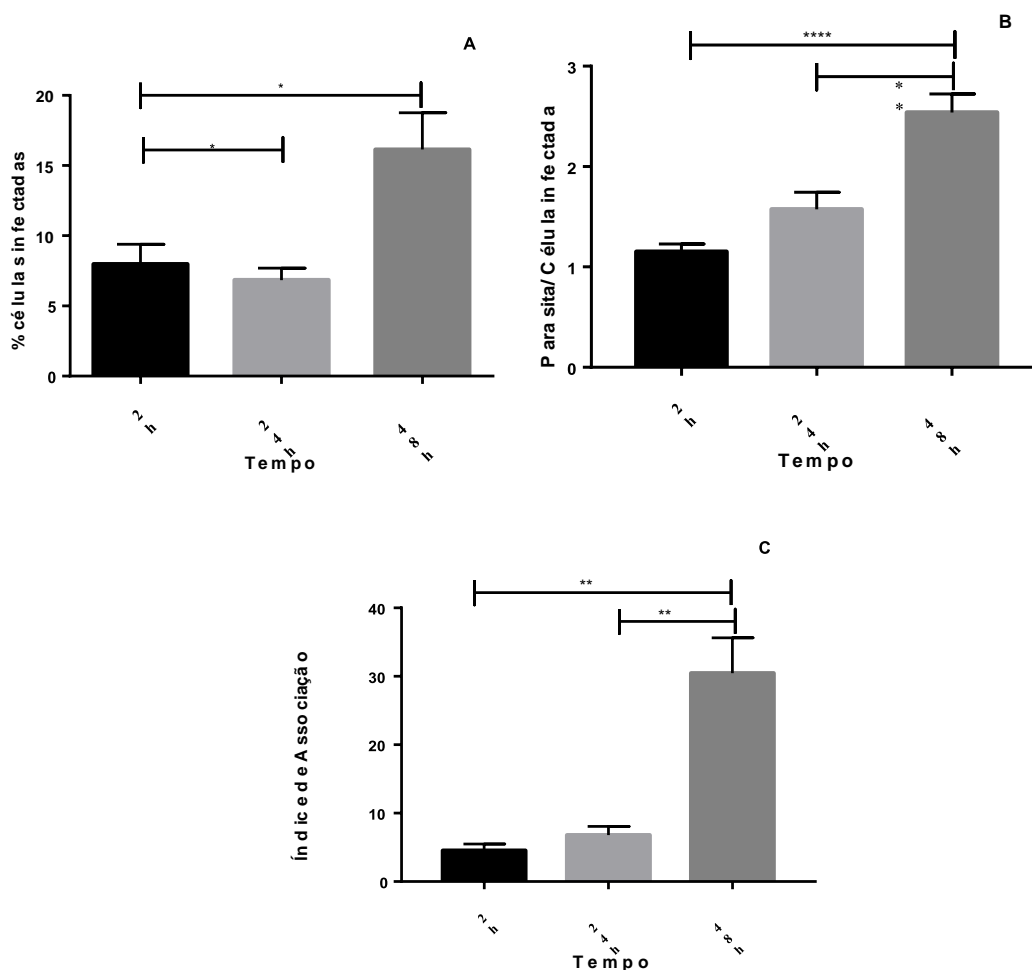


**Figura 15.** Microscopia eletrônica de transmissão de linhagem celular IDE8 e formas promastigotas de *L. amazonensis* após (A, B, C) 24h e (D) 48h de interação. **P**= parasitos; **tc**= célula de carrapato; seta em B indica membrana do parasito interagindo intimamente com a superfície da célula de carrapato; cabeça de seta: indica projeções da membrana de carrapato em direção ao parasito

### 5.3. Interação célula de carrapato x *Leishmania infantum*

Em seguida avaliamos a interação de *L. infantum*, principal agente causador da leishmaniose canina e visceral humana, nos tempos de 2h, 24h e 48h. Os resultados mostram uma redução de aproximadamente 0,8% de células infectadas entre 2 – 24h, mas em 48h há um aumento de 2 vezes no percentual de células infectadas do que em 2h (**Figura16 A**). Em seguida analisamos o número de parasitas por célula de carrapato IDE8. Os dados mostram que entre 2 e 24h não houve uma diferença significativa no número de parasitas por células IDE8, no entanto em 48h há um aumento na quantidade de parasitas nas células infectadas de 1,5 vezes quando comparado a 24h de infecção (**Figura16 B**). Em relação a 2 horas, em 48 horas houve um aumento de mais de 2 vezes de parasitas por célula IDE8.

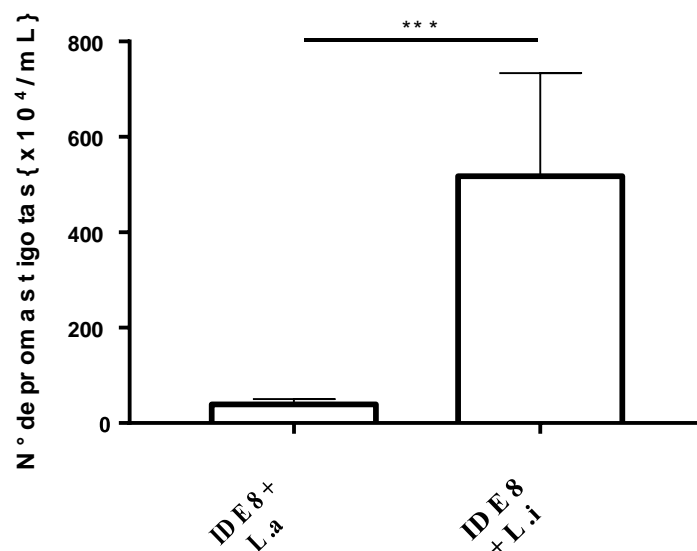
A partir desses dois dados, calculamos o índice de associação que indica um aumento em 48h de aproximadamente 7 vezes em relação a 2h e de 4 vezes e meia em comparação com 24h. (**Figura 16C**).



**Figura 16.** Interação IDE8 e *Leishmania infantum*. Células de linhagem IDE8 foram incubadas com promastigotas de *L. infantum* numa MOI de 5:1 por diferentes tempos. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos livres. As células foram incubadas pelos tempos indicados. Após esses períodos de tempo, foram determinados (A) % de células infectadas, (B) parasita/ célula e (C) índice de associação. Dados = média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos em triplicata. \*  $p < 0,0254$ ; \*\*  $p < 0,0017$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 5.4. Sobrevivência de *Leishmania* após a interação com células de carrapato

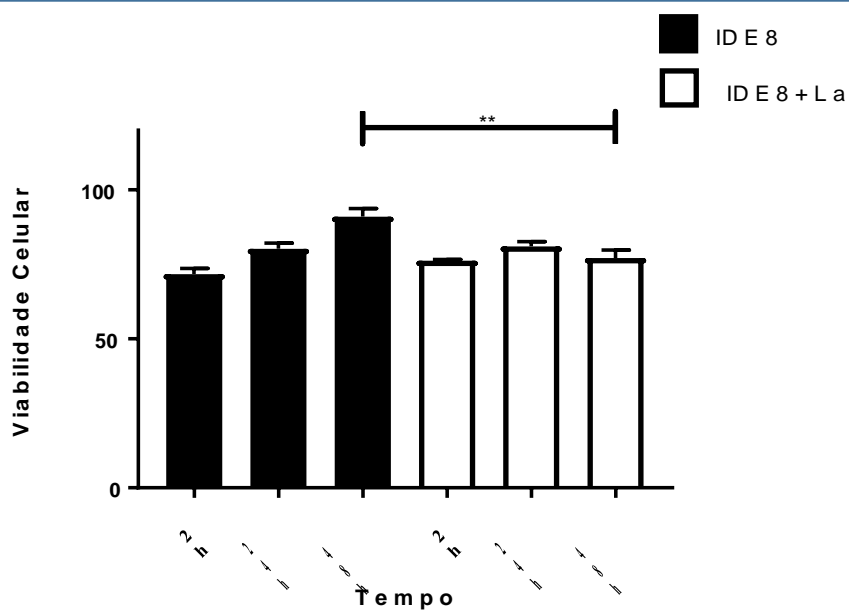
A análise da sobrevivência das diferentes espécies de *Leishmania* após interação por 48 horas com células de carrapato da espécie IDE8 mostrou que *L. infantum* sobreviveu 13 vezes mais do que *L. amazonensis* após contato com IDE8 (**Figura 17**).



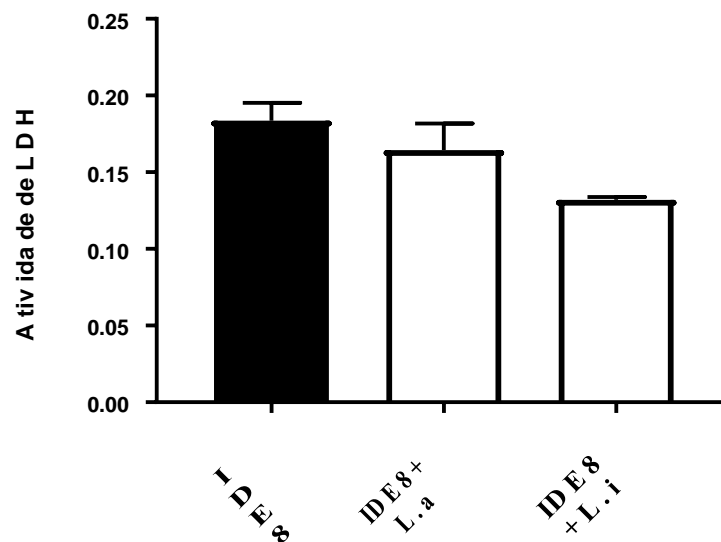
**Figura 17.** Sobrevivência dos parasitos após interação de 48h. Células IDE8 foram incubadas com formas promastigotas de *L. amazonenses* e *L. infantum* (5 parasitos: 1 célula) por 2h e após esse período foram lavadas com PBS e incubadas por 48 horas a 34°C. Em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionado meio Schneider e incubado por mais 48h a 26°C. Ao final, o número de promastigotas foi contado em câmara de Neubauer. (Média  $\pm$  erro padrão de quatro experimentos independentes em triplicata. \*\*\*p<0,0001.)

### 5.5. Viabilidade celular de linhagem celular de carrapato infectada com *Leishmania*

Avaliamos a viabilidade da membrana das células infectadas ou não por *L. amazonensis* pelo método de exclusão “trypan blue” e foi observado uma redução na viabilidade em 48h, onde foi encontrado de 91% de células IDE8 viáveis nas células controles não infectados e 77,1% nas células IDE8 infectadas com *L. amazonensis*. (**Figura 18**). Do mesmo modo, avaliamos a viabilidade das células IDE8 infectadas com ambas as espécies de *Leishmania* frente as células controle não infectadas, através do ensaio da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante. Essa enzima é intracelular, e é encontrada no sobrenadante caso as células estejam lisadas. De acordo com o gráfico abaixo, não houve diferença estatística entre a viabilidade das células IDE8 infectadas e não infectadas com ambas as espécies (**Figura 19**).



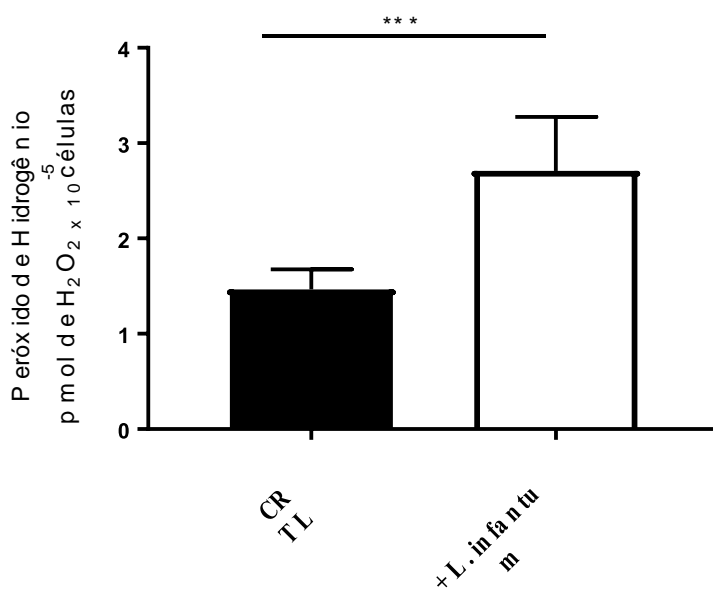
**Figura 18.** Viabilidade de Membrana celular pelo método de exclusão azul de Trypan. As células IDE8 foram incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 2h e mantidos a 34°C nos tempos de 2, 24 e 48h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e contadas em solução de 0,003% de azul de trypan em hemocitometro.



**Figura 19.** Atividade de LDH após interação de 48h com células IDE8 e *L. amazonensis* e *L. infantum*. As células foram incubadas com formas promastigotas por 2h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 48 horas a 34°C e tiveram seu sobrenadante coletado, centrifugado e congelado. Dados = média  $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

### 5.6. Estresse oxidativo de células de carrapato IDE8 infectadas com *Leishmania infantum*

Em seguida, avaliamos se a infecção por *L. infantum* causava algum tipo de estresse oxidativo na célula de carrapato. Nossos resultados mostram que a presença do parasita aumenta em quase 2 vezes a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células IDE8 quando comparadas com as células controles não infectados (**Figura 20**).



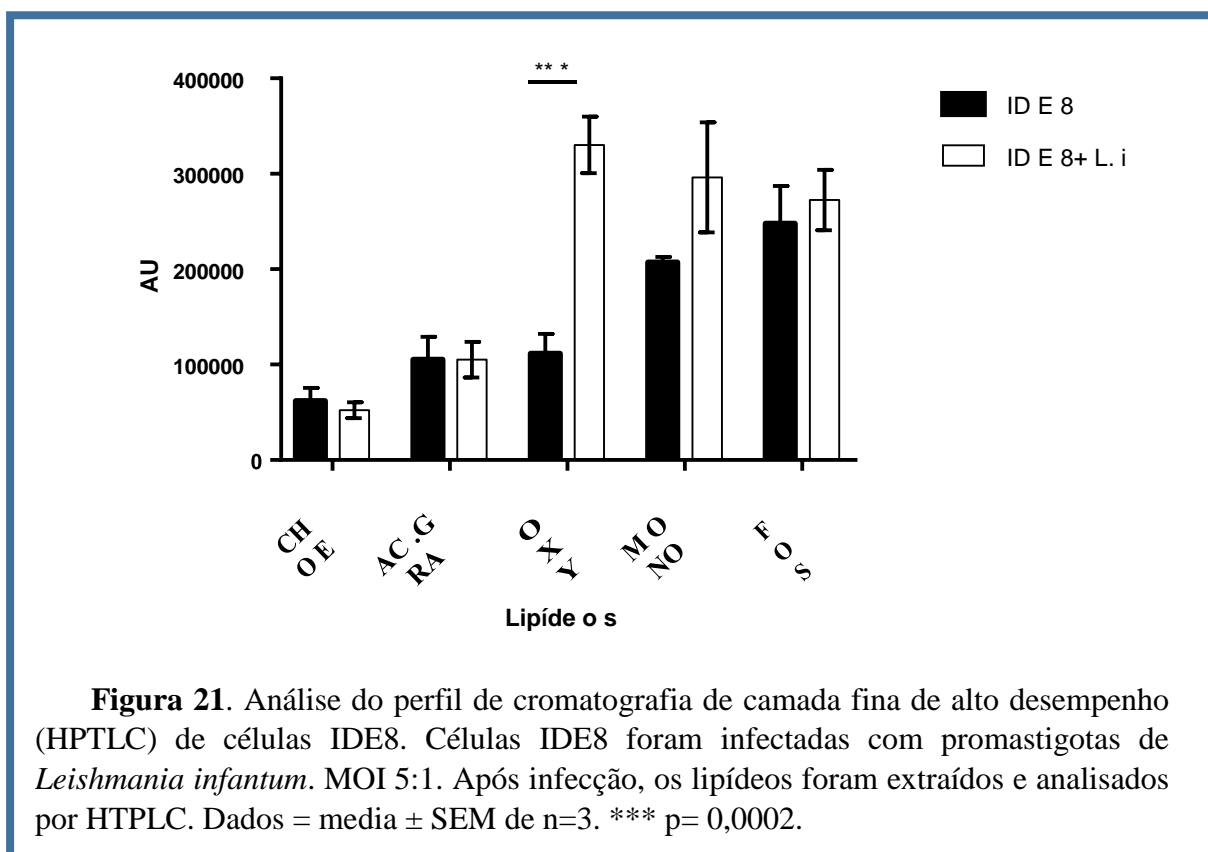
**Figura 20.** Análise da produção de peróxido de hidrogênio total em células IDE8. Células de linhagem IDE8 foram incubadas com promastigotas de *L. infantum* numa MOI de 5:1. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos livres. As células foram incubadas por 48h. Dados = média  $\pm$  erro padrão de 2 experimentos em quadruplicata.  $P = 0,0003$

### 5.7. Análise do perfil lipídico de células IDE8 infectadas com *Leishmania infantum*

Um outro aspecto avaliado foi o perfil lipídico das células IDE8 e se este estava sendo influenciado pela infecção do parasita *L. infantum*. Avaliamos os seguintes lipídeos

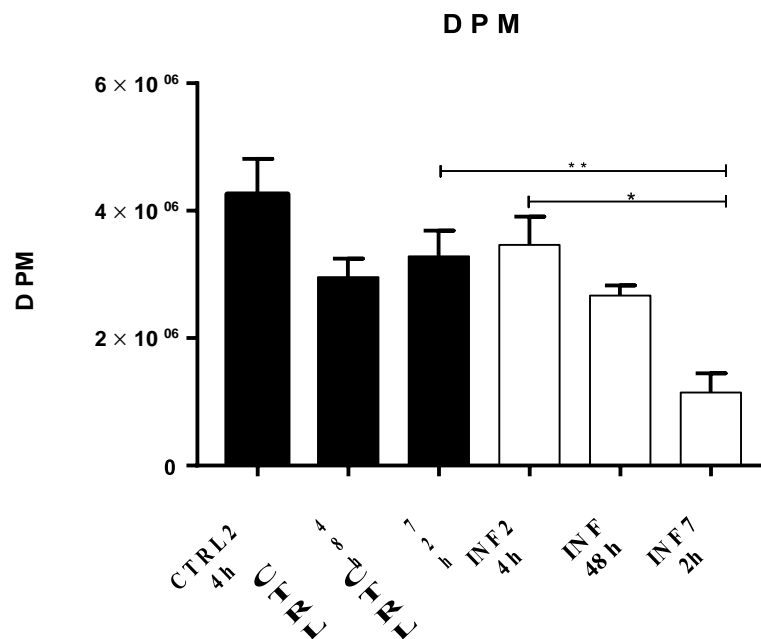
neutros: colesterol esterificado (CHOE), ácidos graxos (AC. GRA), oxisterol (OXY), monoacilesterol (MAG) e fosfolipídeos (FOS).

Os resultados mostram que não houve diferença significativa na quantidade de lipídeos analisados, exceto em oxisterol que apresentou um aumento de aproximadamente 3 vezes na quantidade de lipídeos presentes nas células IDE8 infectadas em relação as células controles não infectadas (**Figura 21**).



Em seguida, marcamos as células de carrapato infectadas ou não com ácido palmítico radioativo com trítio para avaliar com mais precisão a quantidade de lipídeos neutros totais (LNT) derivados de ácido graxos e assim monitoramos a variação da quantidade de LNT de 24 até 72h.

Primeiramente, observamos que houve uma redução de lipídeos totais de 3 vezes nas células IDE8 infectadas no tempo de 24h em relação a 72h. Além disso, há uma redução significativa na quantidade de lipídeos totais de aproximadamente 3 vezes entre as células IDE8 infectadas quando comparadas as células controles não infectadas no tempo de 72h (**Figura 22**).



**Figura 22.** Lipídeos totais marcados com ácido palmítico-<sup>3</sup>H em IDE8 infectados com *Leishmania infantum*. As células de linhagem IDE8 foram infectados com *L. infantum* MOI 5:1, 5 $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-FA-BSA. As células foram retiradas, extraídos os lipídeos e analisadas alíquotas da amostra após os tempos designados. Os experimentos foram feitos em duplicata (n= 4) Os valores representam a média  $\pm$  SEM. (\*) representa o valor de  $p < 0,05$ .

Em seguida, escolhemos o mesmo método anterior para avaliar se havia alguma diferença entre os lipídeos individualmente, devido a sua maior sensibilidade, a fim de verificar se a via de formação de algum lipídeo específico estaria favorecida. Avaliamos fosfolipídeos (PL), monoacilglicerol (MAG), 1,2 diacilglicerol (D 1,2), 1,3 diacilglicerol (D1,3), ácidos graxos (FA), triacilglicerol (TAG) e colesterol esterificado (CHOE).

Os fosfolipídeos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre as células infectadas e não infectadas (**Figura 23A**). Já o MAG apresentou um aumento significativo de aproximadamente 40 vezes em 48h nas células infectadas quando comparado as células controle (**Figura 23B**) não infectadas. Entre as células infectadas em 48h houve um aumento de 24 vezes na quantidade de MAG em relação a 24h de infecção, seguida de uma redução em 72 horas de aproximadamente 45 vezes (**Figura 23B**).

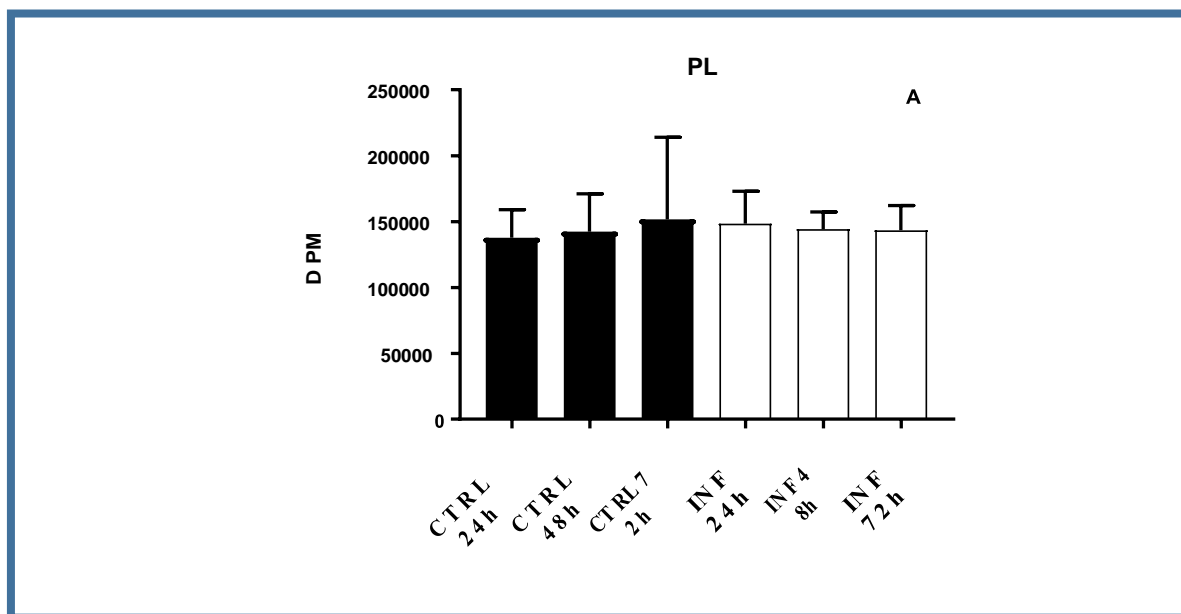
Em seguida, avaliamos a quantidade de 1,2 D, 1,3 D e FA, cujos dados mostram que houve um aumento significativo de aproximadamente 5 vezes na quantidade desses lipídeos em 48 horas nas células IDE8 infectadas em relação as células de carrapato controles não infectados (**Figura 23 C, D e E**). Além disso foi observado uma redução

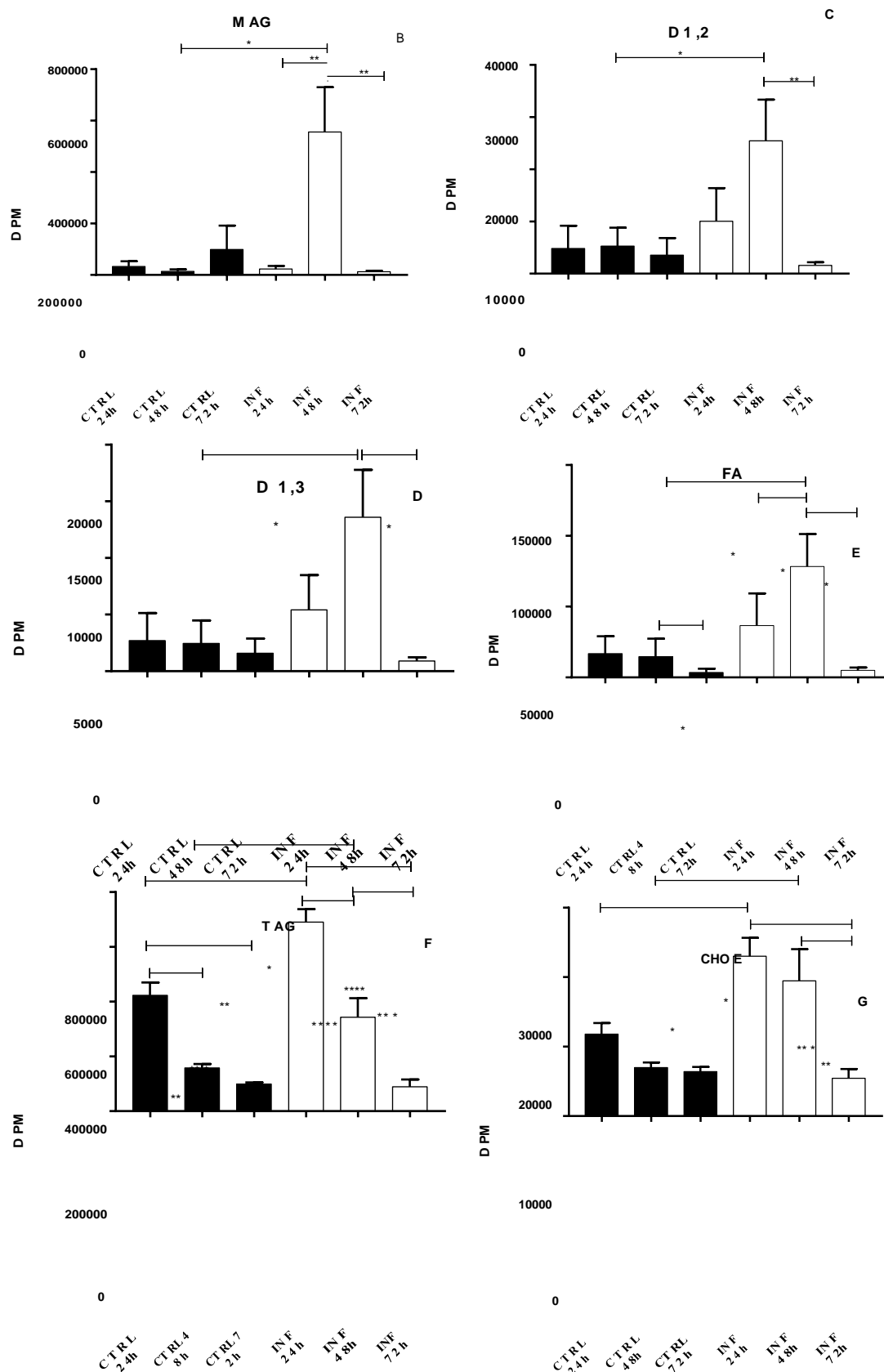


de aproximadamente de 15 vezes de 1,2 D, 1,3 D e FA em 72 horas nas células IDE8 infectadas comparado a células infectadas de 48 horas (**Figura 23 C, D e E**).

Ao avaliarmos TAG, os dados mostram que há uma diminuição de TAG nas células IDE8 controles não -infectadas ao longo do tempo de 2,6 vezes entre 24h e 48h e de 4,2 vezes entre 24h e 72h. A análise das células de carrapato infectadas com *L. infantum*, mostram também uma diminuição de 2 vezes entre 24 e 48h e uma redução de 3,8 vezes entre 48h e 72h. Em seguida, observamos um aumento de TAG de mais de 2 vezes no tempo de 48 h nas células IDE8 infectadas em relação as células controle não infectadas. (**Figura 23 F**).

A análise dos dados de CHOE (**Figura 23 G**) nas células IDE8 mostra que há diferenças significativas entre células IDE8 controle e infectadas nas primeiras 48h. Em 24h as células IDE8 infectadas tiveram um aumento de quase 2 vezes na quantidade de CHOE em relação as células não infectadas. Já em 48h, essa diferença aumentou para aproximadamente 3 vezes mais CHOE nas células infectadas do que no controle. Entre as células IDE8 infectadas também observamos uma diferença significativa: entre 24h e 72h uma redução de mais de 4 vezes e, entre 48h e 72h, uma redução de aproximadamente 3 vezes.





**Figura 23.** Lipídeos totais marcados com ácido palmítico- $^3\text{H}$  em IDE8 infectados com *Leishmania infantum*. As células de linhagem IDE8 foram infectados com *L. infantum* MOI 5:1,  $5\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -FA-BSA. As células foram retiradas, extraídos os lipídeos e analisadas alíquotas da amostra após os tempos designados. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão; n=4. (\*) representa o valor de  $p < 0,05$ . Fosfolipídeos (PL), monoacilglicerol (MAG), 1,2 diacilglicerol (D 1,2), 1,3 diacilglicerol (D1,3), cidos

graxos (FA), triacilglicerol (TAG) e colesterol esterificado (CHOE).

## 6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças negligenciadas consideradas pela OMS como a sétima doença tropical de maior importância no mundo, possuindo uma variedade de manifestações clínicas potencialmente fatais ou limitantes (TORRES-GUERRERO, *et al*, 2017; ALVAR, 2012). O ciclo de transmissão da *Leishmania* é bem estabelecido na literatura, cujo vetor mais comum no Brasil é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Apesar disso, a interação desse gênero de parasitos com outros artrópodes é um campo ainda discutido na literatura.

Nyindo e colaboradores, em 1986, mostraram a interação entre células de linhagem de carrapato das espécies *Rhipicephalus appendiculatus* e *R. evertsi* com 2 espécies de *Leishmania*: *L. major* e *L. donovani*. Estes observaram que nas primeiras 24h de interação apenas 5% das células de linhagem comportaram os parasitos, mas essa média aumentou para 50% em 48h de infecção, sem observar diferença entre as 2 espécies de parasito. Esse dado é semelhante ao observado nos nossos dados de interação entre IDE8 e *L. infantum*, onde vemos um aumento significativo na interação a partir de 2h até 48h. Entretanto, esse fato não se aplica a interação com *Leishmania amazonensis*, que apesar de ter apresentado aumento no percentual de células infectadas e no número de parasita/célula infectadas, não resultou em um aumento significativo no índice de associação. É interessante o fato que as primeiras 24h de interação com *L. amazonensis* há um número de parasitas maior do que *L. infantum*, entretanto, em 48h, esses valores são bem aproximados. Dados similares foram obtidos na interação com linhagens celulares de *Rhipicephalus sanguineus* com ambas as espécies de *Leishmania* (dados não mostrados). Além disso, *L. infantum* apresentou em 48h uma quantidade significativamente maior de parasitos viáveis do que *L. amazonensis*, conforme mostrado na figura 16. Esses dados juntos sugerem que *L. infantum* possui algum mecanismo específico de reconhecimento e/ou sobrevivência pelas células de carrapato.

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou uma íntima associação entre o parasita *L. amazonensis* e a membrana da célula de carrapato. Além disso, na MET é possível observar estruturas arredondadas pequenas dentro do vacúolo, justapostas ao parasita. É interessante que alguns autores têm mostrado que as linhagens originadas a partir do carrapato *Ixodes scapularis* possuem um vírus endossimbionte, incapaz de infectar células de mamíferos e insetos (Bell-Sakyi e Attoui, 2016). O vírus St Croix River virus (SCRV) pertence à família Reoviridae, que possui

como material genético um RNA de dupla fita. Alberdi *et al*, 2012 e Bell- Sakyi e Houssam, 2013 mostraram várias imagens de MET, onde identificaram endovírus em diversas linhagem de carrapatos, tanto Ixodídeos quanto Argasídeos. Essas estruturas são morfológicamente similares as estruturas que encontramos em nossas METs. Dessa forma sugerimos que as estruturas observadas junto aos parasitas no vacúolo sejam partículas virais. É interessante notar que essas partículas virais se encontram em sua maioria dentro do vacúolo formado, é possível sugerir que a presença do parasita possa influenciar na quantidade do vírus. Alguns estudos mostraram que a presença de simbiossiontes em insetos contribui para menor susceptibilidade a infecção por patógenos, tanto bactérias quanto protozoários (Dong *et al*, 2009; Meister *et al*, 2009 e Telleria, 2018). Se a a presença do vírus endossimbionte vista na microscopia influencia ou não a infecção das células de linhagem por *Leishmania*, são necessários experimentos com células IDE8 sem o vírus.

O objetivo de se estabelecer uma linhagem como modelo experimental é permitir que outros estudos sejam conduzidos com mais facilidade e reprodutibilidade. Dessa forma, um aspecto fundamental é que a célula modelo resista a infecção pelo agente patogênico em questão e permaneça viável. Dessa forma, a avaliação da integridade célula são necessárias, o ensaio de azul de Trypan mostra uma pequena alteração na viabilidade, e a atividade da LDH, que é uma enzima intracelular, não mostrou diferença estatística significativa entre células controle e infectadas. Isso mostra que a célula mantém a integridade de membrana e a viabilidade após a interação com os parasitos de ambas as espécies.

Outro aspecto avaliado foi se a presença do parasita causava algum estresse as células IDE8. Um dos mecanismos de estresse celular mais bem caracterizados na literatura é o estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), possuindo efeitos importantes para a sinalização e regulação celular (Murphy *et al*, 2011). Além disso, está envolvido na cascata de reações que produz potentes microbicidas como ânion hipoclorito e possui efeito nocivo também para a célula hospedeira por sua alta reatividade com outras moléculas (Pereira *et al*, 2001). Observamos que a infecção por *L. infantum* causa o aumento da produção de EROs, indicando que há uma resposta oxidativa por parte da célula na presença do parasita. Isso ocorre no mesmo tempo em que o índice de associação aumenta, sugerindo que o parasita não está sendo afetado pelos EROs ou que este possa estar evadindo esse mecanismo de defesa.

É interessante avaliar que a produção de EROs em células de carrapato é associada principalmente ao processo de fagocitose realizado pelos hemócitos, células do sistema imune inato dos carrapatos responsáveis pela resposta celular frente aos patógenos, como um dos principais mecanismos de morte de microrganismos fagocitados (Pereira *et al*, 2001). Nossos resultados mostram esse mesmo aumento, porém, em uma linhagem embrionária de células de carrapato. Além disso, EROs está associada a uma das principais formas que os macrófagos controlam a infecção por *Leishmania* em mamíferos, porém, nossos dados de interação com *L. infantum* no tempo de 48h não mostra nenhuma evidência de que esse mecanismo esteja sendo bem-sucedido no controle dos parasitos quando estes interagem com células de carrapatos. Dahmani e colaboradores, 2020 mostraram que *Anaplasma phagocytophilum*, uma bactéria vetorizada por carrapato, é capaz de evadir esse mecanismo de resposta oxidativa através da via da quinurenina, uma via antioxidante de degradação do triptofano e formação de  $\text{NAD}^+$ . É interessante ressaltar que *Phlebotomus papatasi*, um vetor conhecido de *Leishmania*, apresenta duas cópias dos genes que codificam de uma das principais enzimas dessa via (Quinurenina aminotransferase - KAT), assim como os Ixodídeos. Isso pode sugerir um dos mecanismos que possibilitam esse artrópode vetorizar o parasito *Leishmania* de forma bem-sucedida. Além disso, 2 metabólitos da via da quinurenina, o ácido xanturênico e o ácido quinurênico, atuam como reguladores da produção de ROS na célula, sendo responsáveis por não permitir seu acúmulo após a infecção e removendo os íons reativos para proteger as células do dano oxidativo. Isso contribui para a manutenção do hospedeiro vivo e permite que ele vetorize o parasito para outros indivíduos.

Por definição, parasitas são organismos que se utilizam dos componentes do seu hospedeiro para manter sua homeostase. Este fato ocorre principalmente quando se trata de hemoparasitos transmitidos por um vetor artrópode, que precisam, em ao menos um estágio de sua vida, de nutrição por componentes do sangue. Dessa forma, não é incomum observar que esses organismos utilizam várias moléculas como carboidratos, proteínas e lipídeos como fonte de energia para a manutenção do seu metabolismo. Um dos componentes mais abundantes no sangue são os lipídeos, como ácidos graxos e colesterol, e cada vez mais pesquisas tem mostrado que os parasitos vetorizados por artrópodes necessitam dos lipídeos de seus hospedeiros como principal fonte de energia para síntese de biomoléculas e para manter sua homeostase. Os lipídeos são componentes hidrofóbicos, que formam as membranas celulares, ativam vias de sinalização e são fontes

de energia. Essas moléculas possuem uma capacidade de fornecer mais de 2 vezes a energia obtida por uma molécula de carboidrato (O'Neal *et al*, 2020, Toprak *et al*, 2020).

Assim, buscamos analisar se a composição lipídica das células de carrapato IDE8 era alterada durante a infecção com *Leishmania* em comparação com as células controles não infectados. Na primeira análise pela HP TLC, vimos uma diferença significativa na presença de oxiesterol nas células IDE8 infectadas. O oxiesterol é um lipídeo derivado de colesterol, que pode ser formado a partir da oxidação enzimática, oxidação não enzimática ou adquirido através da alimentação. No caso da oxidação não enzimática, o colesterol é oxidado facilmente em presença de espécies reativas de oxigênio, consistindo na primeira etapa da peroxidação lipídica, tida como uma via “antioxidante” do colesterol por alguns autores (Girao *et al*, 1999).

Em células de mamíferos, o oxiesterol já teve diversos efeitos biológicos descritos como a citotoxicidade e atividade antiproliferativa em células tumorais. Além disso regula a homeostase do colesterol, modulando a atividade de 2 famílias de fatores de transcrição, SREBP e LXR (proteínas de ligação do elemento regulador de esterol e receptores X do fígado, respectivamente). A inibição de SREBP regula a biossíntese de ácidos graxos e colesterol e a captação de colesterol, exercendo um efeito inibitório em uma enzima importante na biossíntese do colesterol, a hidroximetil glutaril coenzima A (HMG- CoA). Já a ativação de LXR induz o efluxo de colesterol e a síntese dos ácidos graxos. Assim, altos níveis de oxiesterol no organismo, resultando de grande acúmulo de colesterol, inibe a sua captação ao mesmo tempo que promove a sua remoção de dentro da célula. (Wang *et al*, 2008; Silva, Carvalho e Melo, 2011; Choi e Finlay, 2020).

Além disso, o oxiesterol já foi discutido como um importante imunomodulador em mamíferos. Bazin e colaboradores, 2006 mostraram que na infecção por *Leishmania spp*, a adição de moléculas de oxiesterol a compostos com atividade leishmanicida aumentava a inibição do crescimento do parasita e causava sua morte celular, inclusive de cepas modificadas para serem resistentes a anfotericina B, droga usada no tratamento da leishmaniose. Nossos dados sugerem que a presença do parasita causa um aumento no oxiesterol, o que baseado nos dados de Bazin e colaboradores, poderia ser um indicativo de uma resposta regulatória das células de carrapato sobre os parasitas em multiplicação. Além disso, esse aumento foi observado após 48h, coincidindo com o aumento da produção de EROS. Isso pode favorecer a via não enzimática de formação do oxiesterol. Não avaliamos até o momento se há alguma diferença na quantidade de colesterol total

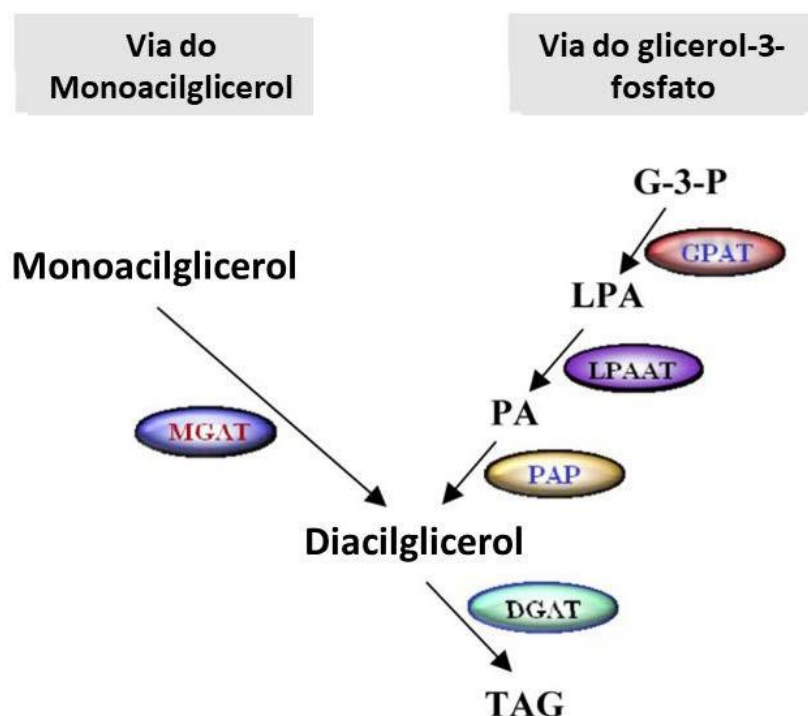
da amostra, mas avaliaremos no futuro se há ou não o aumento da peroxidação lipídica, sugerindo que essa via estaria sendo modulada pela infecção.

Seguindo as análises lipídicas das células vimos uma modulação significativa dos glicerolipídeos nas células IDE8 infectadas em comparação com as células controle. Em 24 horas observamos, tanto nas células infectadas quanto nas células não infectadas, uma grande quantidade de TAG, que vai decaindo em 48 e 72h. Os insetos, como a maioria dos animais, armazenam grandes quantidades de energia na forma de triacilgliceróis (TAG) em vários órgãos, sendo um deles o corpo gorduroso, em estruturas celulares chamadas de gotículas lipídicas (LD- em inglês “*lipid droplets*”) (Soulages *et al*, 2015). Existem 2 vias que podem resultar na síntese de TAG. A primeira é a via do monoacilglicerol (MAG). Nessa via o MAG sofre a ação da monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) e é convertido a DAG, que por sua vez é convertido a TAG, catalisado pela ação da diacilglicerol aciltransferase (DGAT). A segunda é a via do glicerol-3 –fosfato (G3P). O G3P é convertido a ácido fosfatídico (PA) através de 2 reações sucessivas catalisadas por glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) e ácido lisofosfatídico aciltransferase (LPAAT). Em seguida o PA é fosforilado pela PAP- ácido fosfatídico fosforilase- e convertido em DAG, que segue na via de forma semelhante a via do MAG (**Figura 24**). Ambas as vias convergem na formação do DAG. Essas vias regulam a quantidade de TAG em reserva ou a disponibilização de glicerolipídeos e ácidos graxos para a célula (Shi e Cheng, 2009). As reservas de TAG por sua vez podem ser mobilizadas de acordo com a necessidade da célula. A via de degradação de TAG causa sucessivas hidrólises catalisadas por lipases que tornam as moléculas disponíveis para o transporte até os tecidos alvo, como o caso de DAG, que pode ser transportado através da hemolinfa. Nesse processo também são liberados ácidos graxos livres, que se ligam a lipoproteínas e são encaminhados para via de  $\beta$ -oxidação, para gerar energia ou intermediários de outras vias (Heier e Kühnlein , 2018).

Algumas células de mamíferos, como BMM e células dendríticas, quando infectadas com *Leishmania spp*, mostraram um aumento na síntese de TAG (Lecoeur *et al*, 2013; Rabhi *et al* 2016). Além disso, Xu *et al*, 2012 mostrou que a aciltransferase DGAT2 tem um papel importante na formação dos LD. Esses mecanismos de regulação foram mostrados para vários microrganismos (Khovidhunkit *et al*, 2004; Feingold e Grunfeld, 2012, Rabhi *et al* 2016). Estudos sobre metabolismo lipídico em insetos vetores durante infecção nos modelos *Aedes aegypti* e *Plasmodium gallinaceum* e/ou *Rhodnius prolixus*



e *Trypanosoma. rangeli* mostram alterações nas lipoproteínas do inseto. Em células de linhagem de *Aedes albopictus* infectadas com o vírus da dengue foi observado um aumento na biossíntese de PL, esfingolipídeos e TAG, como consequência da ativação do FAS (ácido graxo sintase). De forma semelhante, foi observado no modelo de infecção de células de linhagem de *A. albopictus* com o vírus Zika uma alteração no perfil lipídico das células com acúmulo de vários lipídeos, principalmente PL (Godim *et al*, 2018). Nossos dados mostram que concomitantemente à diminuição de TAG de 24 para 48h, há um aumento significativo em todos os metabólitos da via de degradação de TAG como MAG, os DAG - 1,2 D e 1,3 D e os ácidos graxos livres. Isso pode sugerir que a célula de carrapato recrutou moléculas de energia para auxiliar a controlar a infecção por *Leishmania infantum*, ou que o parasito modulou o metabolismo lipídico na linhagem célula de carrapato, consumindo o TAG sintetizado pela célula. No último caso, a célula hospedeira estaria com deficiência em TAG, e estaria sintetizando os precursores lipídicos necessários para formar novamente seu estoque energético. Para elucidar quais desses mecanismos poderia ser avaliado a expressão das enzimas da via de síntese e degradação de TAG ou poderia ser medido a atividade dessas enzimas propriamente ditas.



**Figura 24.** Via de síntese de TAG. Fonte: Shi e Cheng, 2009- Traduzido e modificado.

Em seguida, observamos o aumento de CHOE nas células IDE8 infectadas até as 48h. O colesterol é esterificado a CHOE através da enzima ACAT (colesterol acetiltransferase) e pode ser estocado nos LD. É interessante observar que um estudo com Miltefosina, uma droga usada no tratamento da leishmaniose visceral, mostrou que esse fármaco causa o aumento na quantidade de colesterol em uma amostra de promastigotas tratadas e uma diminuição no ergosterol, único lipídeo que os parasitas do gênero *Leishmania* possuem a capacidade de sintetizar e que não está presente em hospedeiros mamíferos, (Yao e Wilson, 2016) indicando uma associação entre uma maior quantidade de colesterol e a morte do parasito (Rakotomanga *et al*, 2007). Outro estudo mostra que há um aumento de colesterol quando o parasita se encontra em fase estacionária, em comparação com a fase de crescimento exponencial (Yao e Wilson, 2016), o que sugere uma correlação entre uma quantidade maior de colesterol e a ausência de crescimento da cultura. Nossos dados mostram que há um aumento no índice de associação do parasita entre 24 e 48h. Isso coincide com o aumento na quantidade de colesterol esterificado, originado através de reações que consomem o colesterol. Isso sugere que o aumento que vemos no índice de associação pode ser devido a um ambiente mais favorável a multiplicação do parasito.

Até o momento apenas dois trabalhos viram alterações no perfil lipídico de carrapatos *in vivo* desafiados com fungo e com bactéria, respectivamente (Sá *et al.*, 2018; Hoxemeier *et al.* 2017). Foi observado que ninfas de *I. scapularis* alimentadas em animais infectados com *Borrelia burgdorferi* e *B. mayonii* possuíam uma quantidade de colesterol total baixa no grupo controle não infectado e nos grupos infectados nos dias 0 e 1. Após o dia 1, o colesterol começou a se acumular nos grupos de carrapatos não infectados, enquanto os grupos infectados com *B. burgdorferi* e *B. mayonii* demonstraram uma abundância menor, indicando potencialmente uma maior aquisição de colesterol pelas espiroquetas. No dia 3 pós infecção observa-se que o grupo de ninfas infectadas por *B. burgdorferi* aumentam o colesterol acima dos grupos de carrapatos controle e infectados com *B. mayonii*, essa tendência ao longo do tempo em grupos de carrapatos infectados por *B. burgdorferi* pode refletir o colesterol recebido na alimentação sendo usado para a remodelação da membrana do carrapato e para energia metabólica (Hoxemeier *et al*, 2017). Em outro estudo usando *R. microplus* desafiados com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* foi observado um aumento em 24 e 48 h pós-inóculo de triacilglicerol e ácidos graxos. Foi demonstrado que a síntese de TAG depende do metabolismo ativo dos fungos, pois a presença de conídios mortos não produziu

mudanças significativas na produção de TAG. No entanto, a síntese de ácido graxo parece estar associada à presença física de produtos do patógeno e depende de tempo. (Sá *et al*, 2018).

Em outro estudo, a linhagem de células de *Ixodes scapularis* ISE6 foram infectadas com o vírus Langat virus (LGTV), um flavivírus menos virulento usado como modelo de infecção *in vitro* para flavivírus transmitidos por carrapato (TBFs), embora o *I. scapularis* não seja seu vetor natural. Os dados mostraram que diversas proteínas relacionadas ao metabolismo da célula de carrapato estavam alteradas durante a infecção, entre elas, ACAT1 que utiliza metabólitos de Coenzima A (CoA) durante o metabolismo de ácidos graxos e a VNN, uma proteína ancorada por glicosilfosfatidilinisitol (GPI) envolvida no remodelamento lipídico e sugerem que a diminuição da expressão destas diminui a replicação viral (Grabowski *et al*, 2017).

Ao analisarmos essas diferenças no processo metabólico dos lipídeos nas células IDE8 infectadas com *Leishmania* podemos obter uma compreensão mais detalhada dessa interação, bem como explorar a variação encontrada. Esse conhecimento pode auxiliar e facilitar a descoberta de vias para outros modelos de patógenos que sejam reconhecidamente transmitidos por carrapato e com potencial utilidade para novos métodos de controle dentro do carrapato vetor.

## 7. CONCLUSÕES

Neste estudo buscamos estabelecer como modelo experimental de baixo custo o uso das linhagens embrionárias de célula de carrapato na pesquisa de hemoparasitos vetorizados por artrópodes. Nossos resultados mostraram que há uma íntima associação entre 2 espécies do gênero *Leishmania* com a linhagem IDE8, proveniente de *Ixodes scapularis*. Essa taxa é crescente para a espécie *L. infantum*, com sua maior associação com as células de linhagem após 48h. Mostramos também que não há perda de viabilidade por parte das células de linhagem após a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* e nem dos parasitas após 48h de interação. Além disso, há indícios de que as células reajam a presença do parasito pela produção de EROs, sabidamente tóxico aos parasitos.

Registramos também uma modulação de grupos de lipídeos em decorrência da infecção por *L. infantum*. Ressaltamos a importância do aumento do oxiesterol, muito associado em diferentes estudos como modulador da via de biossíntese do colesterol e o

aumento do colesterol esterificado, que tem sido relacionado com o controle do crescimento ou morte do parasito.

Assim, mostramos que dados obtidos em modelos já bem estabelecidos na literatura estão em conformidade com nosso modelo e por isso propomos o uso das linhagens embrionárias como uma nova ferramenta, barata e precisa, a ser utilizada na busca por se entender melhor os aspectos bioquímicos da interação vetor x patógeno.

## 8. Referências bibliográficas

Abongomera C, van Henten S, Vogt F, Buyze J, Verdonck K, van Griensven J. Prognostic factors for mortality among patients with visceral leishmaniasis in East Africa: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2020 May 15;14(5):e0008319.

Alberdi MP, Dalby MJ, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kohl A, Bell-Sakyi L. Detection and identification of putative bacterial endosymbionts and endogenous viruses in tick cell lines. Ticks Tick Borne Dis. 2012 Jun;3(3):137-46.

Alencar, J.E. - Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil Fortaleza, Imp. Oficial, 1959. (Tese da Universidade Federal do Ceará).

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, *et al.* (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004349.

Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, Olivier M. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. Cell Immunol. 2016 Nov;309:7-18.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology, 37(10), 1097–1106.

Bazin MA, Loiseau PM, Bories C, Letourneux Y, Rault S, El Kihel L. Synthesis of oxysterols and nitrogenous sterols with antileishmanial and trypanocidal activities. Eur J Med Chem. 2006 Oct;41(10):1109-16.

Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends Parasitol. 2007 Sep;23(9):450-7.

Bell-Sakyi L, Attoui H. Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Jul 12;3:25.

Bell-Sakyi L, Attoui H. Virus Discovery Using Tick Cell Lines. *Evol Bioinform Online*. 2016;12(Suppl 2):31-34. Published 2016 Sep 15. Bell-Sakyi L, Darby A, Baylis M, Makepeace BL. The Tick Cell Biobank: A global resource for in vitro research on ticks, other arthropods and the pathogens they transmit. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018 Jul;9(5):1364-1371.

Bouchet F, Lavaud F. Solenophagie et telmophagie: mécanisme de piquûres chez quelques insectes hématophages [Solenophagy and telmophagy: biting mechanisms among various hematophagous insects]. *Allerg Immunol (Paris)*. 1999 Dec;31(10):346-50. French.

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). *Leishmaniasis*. *The Lancet*. Campolina, Thais Bonifácio. A ação da microbiota nativa de *Lutzomyia longipalpis* no desenvolvimento de *Leishmania* spp. / Thais Bonifácio Campolina. – Belo Horizonte, 2017. Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ Biblioteca do CPqRR

Campos, José Henrique Furtado; COSTA, Francisco Assis Lima. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo , v. 56, n. 4, p. 297-300, Aug. 2014

. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652014000400297&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000400297&lng=en&nrm=iso)>. access on 31 Mar. 2021.

Cazan CD, Ionică AM, Matei IA, D'Amico G, Muñoz C, Berriatua E, Dumitrache MO. Detection of *Leishmania infantum* DNA and antibodies against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia canis* in a dog kennel in South-Central Romania. *Acta Vet Scand*. 2020 Aug 3;62(1):42. Choi C, Finlay DK. Diverse Immunoregulatory Roles of Oxysterols-The Oxidized Cholesterol Metabolites. *Metabolites*. 2020 Sep 28;10(10):384. Cláudia Pinto. Veterinária Atual. Animais de estimação - E a leishmaniose felina? – 2019. Disponível em: <https://www.veterinaria-atual.pt/na-clinica/e-a-leishmaniose-felina/> Acesso em: 17 de set 2021

Coutinho, M.T., Linardi, P.M., 2007. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol*. 147, 320–325.

Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*. 128, 149–155.

Cox, Michael M., and David L. Nelson. *Lehninger principles of biochemistry*. Vol. 5. New York: Wh Freeman, 2008.

CVBD. Companion Vector- Borne Diseases. Leishmaniosis. Disponível em: <https://cvbd.elanco.com/diseases/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis>. Acesso em: 29 de Março . 2021.

CRMVSP. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo. Série Zoonoses: Leishmaniose Visceral. Disponível em : [https://www.crmvsp.gov.br/arquivo\\_zoonoses/LEISHMANIOSE\\_SERIE\\_ZOONOSES.pdf](https://www.crmvsp.gov.br/arquivo_zoonoses/LEISHMANIOSE_SERIE_ZOONOSES.pdf). Acesso em : 29 de Março de 2021.

Dahmani M, Anderson JF, Sultana H, Neelakanta G. Rickettsial pathogen uses arthropod tryptophan pathway metabolites to evade reactive oxygen species in tick cells. *Cell Microbiol*. 2020 Oct;22(10):e13237

Dantas-Torres, Filipe. "Ticks as vectors of *Leishmania* parasites." *Trends in parasitology* 27.4 (2011): 155-159.

Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., et al Otranto, D. (2019). Canine Leishmaniasis Control in Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12). de la Fuente J. The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *Exp Appl Acarol*. 2003;29(3-4):331-44.

Delgado J, Macías J, Pineda JA, Corzo JE, González-Moreno MP, de la Rosa R, Sánchez-Quijano A, Leal M, Lissen E. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Nov;61(5):766-9

de Moraes RC, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Pessoa e Silva R, Costa PL, da Silva KG, da Silva FJ, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, de Paiva-Cavalcanti M. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. *Vet Parasitol*. 2013 Sep 23;196(3-4):506-8.

de Sousa KC, André MR, Herrera HM, de Andrade GB, Jusi MM, dos Santos LL, Barreto WT, Machado RZ, de Oliveira GP. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2013 Oct-Dec;22(4):525-31.

Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*. 2011;41(5):571–9.

Dong Y, Manfredini F and Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathogens 5, e1000423..

Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, Gutierrez Fernandez J (2014) Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 8:961-972.

Esch, K.J., Juelsgaard, R., Martinez, P.A., Jones, D.E., Petersen, C.A., 2013. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. J. Immunol. (Baltimore Md) 190 (191), 5542–5550.

Feingold KR, Grunfeld C. Lipids: a key player in the battle between the host and microorganisms. J Lipid Res. 2012; 53: 2487–9.

Feitosa Ana Paula S., Marlos M. Chaves, Dyana L. Veras, Dayse M. Vasconcelos de Deus, Naironberg C. Portela, Alberon R. Araújo, Luiz C. Alves, Fábio A. Brayner, Assessing the cellular and humoral immune response in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) infected with *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908), Ticks and Tick-borne Diseases, Volume 9, Issue 6, 2018, Pages 1421-1430, ISSN 1877-959X,

Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F., Lima, V.M., 2009. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. Vet Parasitol. 165, 150– 154.

Folha de São Paulo. Leishmaniose canina. Disponível em: <https://fotografia.folha.uol.com.br/galerias/46524-leishmaniose-canina>. Acesso em: 17 de set de 2021.

Freshney, R. Ian. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. – 6th ed. p. cm. 2010

Gilbert, Lawrence I., and Haruo Chino. "Transport of lipids in insects." *Journal of lipid research* 15.5 (1974): 439-456.

Girao, H., Mota, C. & Pereira, P., (1999). Cholesterol may act as an antioxidant in lens membranes. Current Eye Research 18 (6): 448-454.

Guia de Vigilância em Saúde : volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. J Am Acad Dermatol. 2015 Dec;73(6):911-26; 927-8.

Heier C, Kühnlein RP. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 2018 Dec;210(4):1163-1184.

Hoogstraal H. 1970-1984. Bibliography of ticks and tick-borne diseases from Homer (about 800 B.C.) to 31 Dec. 1969 (to 1983). Special publications, NAMRU3, Cairo.

INCTEM. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular: Digestão em Insetos. 2012. Disponível em: [http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo\\_5\\_Digestao\\_em\\_Insetos.pdf](http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_5_Digestao_em_Insetos.pdf). Acesso em: 3 de setembro de 2021.

Iqbal, Jahangir, and M. Mahmood Hussain. "Intestinal lipid absorption." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296.6 (2009): E1183-E1194.

Jornal da USP. Júlio Bernardes. Estudo aponta caminhos para criar vacinas contra doenças causadas por carrapatos. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/estudo-aponta-caminhos-para-criar-vacinas-contradoencas-causadas-por-carrapatos/>. Acesso em: 14 de set de 2021.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):439-45

Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004.

Langley, P. A. (1976). Initiation and Regulation of Ingestion by Hematophagous Arthropods. *Journal of Medical Entomology*, 13(2), 121–130.

Lecoeur H, Giraud E, Prévost MC, Milon G, Lang T. Reprogramming Neutral Lipid Metabolism in Mouse Dendritic Leucocytes Hosting Live *Leishmania amazonensis* Amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7.

Leishmaniose. WHO<sup>1</sup>. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 26. Nov de 2020.

Leishmaniose. Fatos importantes. WHO<sup>2</sup>. <Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> >. Acesso em: 26. Nov de 2020

Manoj, Ranju Ravindran Santhakumari; Roberta Iatta, Maria Stefania Latrofa, Loredana Capozzi, Muthusamy Raman, Vito Colella, Domenico Otranto, Canine vector-borne pathogens from dogs and ticks from Tamil Nadu, India, *Acta Tropica*, Volume 203, 2020.

Meister S, Agianian B, Turlure F, Relogio A, Morlais I, Kafatos FC and Christophides GK (2009) *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *Plos Pathogens* 5, e1000542.



- Mhadhbi M, Sassi A. Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. *Equine Vet J*. 2020 Jan;52(1):28-33.
- Molinaro, Etelcia Moraes. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2, cap 5 . Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2012.
- Mondragon-Shem K, Wongtrakul-Kish K, Kozak RP, Yan S, Wilson IBH, Paschinger K, Rogers ME, Spencer DIR, Acosta-Serrano A. Insights into the salivary N-glycome of *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis. *Sci Rep*. 2020 Jul 31;10(1):12903.
- Munderloh UG, Kurtti TJ. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp Appl Acarol*. 1989 Aug;7(3):219-29
- Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtti TJ. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol*. 1994 Aug;80(4):533-43.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 2011 Apr 6;13(4):361-366
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14:2857-77.
- Nyindo, M., Shatry, A., Awiti, L. S., Chintawi, M., AND Hendricks, L. D. 1987. *Leishmania donovani* and *L. major*: Cultivation in vitro in tick embryonic cell lines. *Experimental Parasitology* 63, 240-242.
- Obenchain F.D. and Galun R. 1982. Physiology of ticks. Current themes in tropical science. Pergamon Press, Oxford, pp vii-ix.
- Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human *Leishmaniasis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(3):489-493.
- O'Neal AJ, Butler LR, Rolandelli A, Gilk SD, Pedra JH. Lipid hijacking: a unifying theme in vector-borne diseases. *Elife*. 2020;9:e61675. Published 2020 Oct 29. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.; 2019.
- Otranto D, Dantas-Torres F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania spp.* to dogs: caution is needed. *Vet Parasitol*. 2010 Feb 26;168(1-2):173-4.
- Paz, G.F., Ribeiro, M.F.B., Michalsky, É.M. *et al*. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* **106**, 523 (2010).

Pennisi, M.-G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G., Solano-Gallego, L., 2015. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites Vectors* 8, 302.

Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, 251, 131–137.

Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol*. 2001 Oct;99(2):66-72.

Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, Lloyd-Smith JO. Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Aug;15(8):502-510.

Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S, *et al.* (2016) Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *PLoS ONE* 11(2): e0148640.

Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1425–30

Sanches LD, Martini CC, Nakamura AA, Santiago ME, Dolabela de Lima B, Lima VM. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016 Oct-Dec;25(4):465-469.

Santos, R. L., & Oliveira, A. R. (2019). Leishmaniasis in non-human primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. *Journal of Medical Primatology*.

Seblová V, Sádlová J, Vojtková B, Votýpka J, Carpenter S, Bates PA, Volf P. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;

Silva, M., Carvalho, J. & Melo M.,(2011). Oxiesteróis: o seu papel na saúde e na doença. *Química* 121: 53-58.

Sgroi G, Iatta R, Veneziano V, Bezerra-Santos MA, Lesiczka P, Hrazdilová K, Annoscia G, D'Alessio N, Golovchenko M, Rudenko N, Modrý D, Otranto D. Molecular survey on tick-borne pathogens and *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis*. 2021 May;12(3):101669.

S. N. Mule, J. Silva Saad, L. Rosa-Fernandes, B. S. S. Carboni, M. Cortez and G. Palmisano, *Mol. Omics*, 2020.

Singh SP, Reddy DC, Rai M, Sundar S, 2006. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 11: 899–905.

Shi Y, Cheng D. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E10-8.

Skloot, R. A vida imortal de Henrietta Lacks. Tradução: Ivo Korytowski. São Paulo: Companhia das Letras, 2011.

Soares-Bezerra, Rômulo José; LEON, Leonor; Genestra, Marcelo. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 139-149, June 2004

. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322004000200003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322004000200003&lng=en&nrm=iso)>. access on 26 Nov. 2020.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitology* 165, 1–18.

Soulages JL, Wu Z, Firdaus SJ, Mahalingam R, Arrese EL. Monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases and the synthesis of neutral glycerides in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2015 Jul;62:194-210.

Souza, Alda & Nunes, VLB & Borralho, V. & Ishikawa, EAY. (2009). Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases - J VENOM ANIM TOXINS TROP DIS*. 15. 10.1590/S1678-91992009000200017.

Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):82. Published 2017 Feb 15.

Telleria EL, Martins-da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Csekö YM. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 2018 Sep;145(10):1336-1353

Teixeira, Dirceu E *et al.* Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*/ Rio de Janeiro : Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

Tiago D. Serafim, Ranadhir Dey, Hira L. Nakhasi, Jesus G. Valenzuela, Shaden Kamhawi, Chapter 6 - Unique Features of Vector-Transmitted Leishmaniasis and Their Relevance to Disease Transmission and Control, Editor(s): Stephen K. Wikel, Serap Aksoy, George Dimopoulos, *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*,

Toepp, A.J., Monteiro, G.R.G., Coutinho, J.F.V. *et al.* Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasites Vectors* **12**, 54 (2019).

Trotta M, Nicetto M, Fogliazza A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Dec;3(5-6):294-7.

Viol MA, Guerrero FD, de Oliveira BC, de Aquino MC, Loiola SH, de Melo GD, de Souza Gomes AH, Kanamura CT, Garcia MV, Andreotti R, de Lima VM, Bresciani KD. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol Res.* 2016 Sep;115(9):3479-84.

Voet, Donald, and Judith G. Voet. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana, 2006.

Xu N, Zhang SO, Cole RA, McKinney SA, Guo F, Haas JT, *et al.* The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol.* 2012; 198: 895–911.

Wang, Y., Rogers, P. M., Su, C. *et al.*, (2008). Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXRα. *J Biol Chem.* 283(39): 26332-26339.

Wilhelm, T. J. (2019). *Viszerale Leishmaniose. Der Chirurg.*

Yao C, Wilson ME. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. *Parasit Vectors.* 2016 Apr 12;9:200.