

MALÚ MATEUS SANTOS

Avaliação da capacidade da modulação da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção de macrófagos por *Leishmania major* *in vitro*

UBERABA, MG  
2018



MALÚ MATEUS SANTOS

Avaliação da capacidade da modulação da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção de macrófagos por *Leishmania major* *in vitro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba

Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini  
Leonel Alves  
Co-orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire  
de Oliveira

UBERABA, MG  
2018

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

**Santos, Malú Mateus.**

S59a      Avaliação da capacidade da modulação da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção de macrófagos por *Leishmania major in vitro* / Malú Mateus Santos. – Uberaba, 2018.

63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

Coorientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira.

1. Carrapato. 2. Citocinas. 3. Modulação – Saliva. I. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. II. Oliveira, Carlo José Freire de. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 595.429

MALÚ MATEUS SANTOS

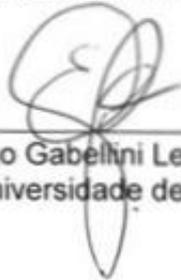
Avaliação da capacidade da modulação da saliva de *Amblyomma cajennense*  
diante da infecção de macrófagos por *Leishmania major in vitro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Sanidade e  
Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-  
Graduação em Sanidade e Produção Animal nos  
Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal  
nos Trópicos

Aprovada em: 12/12/2018

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof. Dr. Endrigo Gabelini Leonel Alves - Orientador  
Universidade de Uberaba



---

Prof. Dr. Roberta Torres de Melo  
Universidade de Uberaba



---

Prof. Dr. Leandro de Jesus Benevides  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para seguir em frente sempre e realizar essa conquista.

Aos meus pais Débora e Luís Otávio por acreditarem em mim sempre, a minha irmã Malena pela paciência e conselhos. Ao meu namorado Rafael pelo amor e por toda a ajuda. Meus avós, tios e primos, muito obrigada por me fazer permanecer firme em meu propósito.

Ao meu orientador professor Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves por toda a ajuda.

Ao meu Co orientador professor Dr. Carlo José Freire de Oliveira por ter me recebido em seu laboratório e se dedicado ao meu trabalho.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela boa vontade, receptividade com todos ligados ao meu projeto, bem como a generosidade com que doaram materiais que foram indispensáveis nesse estudo, em especial professor Marcos Vinícius, aos alunos de pós-graduação Jonatas, Chamberttan, Wesley, Mariana e Bárbara.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisado Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por incentivar os cursos de pós-graduação no Brasil, assim como pelo apoio financeiro e tecnológico para realização desta pesquisa.

A Universidade de Uberaba e ao programa de Mestrado em sanidade e produção animal nos trópicos pela oportunidade de realizar essa pesquisa.

Com toda certeza, alguns nomes não foram citados, porém isso não diminui minha imensa gratidão a aqueles que se doaram para que esse trabalho fosse concluído.



“Por vezes sentimos que aquilo que  
fazemos não é senão uma gota de água  
no mar. Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota”  
Madre Teresa de Calcuta



## RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas obrigatoriamente hematófagos, que secretam através de sua saliva componentes bioativos com ação imunomoduladora. Alguns protozoários utilizam esses componentes da saliva como meio de transporte e proteção para estabelecer sua infecção. A *Leishmania major* causadora da leishmaniose cutânea é um importante microrganismo que pode ser transmitido pela saliva. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção por *Leishmania major in vitro*. Foram utilizados macrófagos infectados com *Leishmania* e posteriormente tratados com diferentes concentrações de saliva, 10µg/ml; 5 µg/ml, 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml. Também foi avaliado a capacidade fagocítica, por meio da citometria de fluxo. A produção de óxido nítrico foi realizada pela reação colorimétrica de Griess utilizando o sobrenadante coletado das culturas, e as citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e a quimiocina MCP-1 foram analisadas através do método de CBA. Foi observado um aumento da capacidade fagocítica pelos macrófagos tratados com as menores concentrações de saliva após uma hora de infecção. Ao avaliar a produção de óxido nítrico, evidenciou-se um aumento significativo em culturas tratadas com baixa concentração de saliva. Em relação às citocinas, houve um aumento nas condições de infecção e não infecção dos macrófagos. Nas condições de não infecção houve aumento das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10 nas culturas que receberam as menores concentrações de saliva. A quimiocina MCP-1 apresentou uma diminuição dose dependente nas culturas que receberam somente saliva. Em condições de infecção foi observado o aumento de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e da quimiocina MCP-1 nas culturas tratadas com saliva, em todas as concentrações. Desta forma podemos concluir que a saliva de *Amblyomma cajennense* possui mecanismos específicos que conseguem modular células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro incluindo macrófagos e as citocinas e quimiocinas produzidas por eles.

Palavras Chaves: Carrapato; Citocinas; Imunomodulação; Quimiocinas



## ABSTRACT

Ticks are ectoparasites obligatorily hematophagous, which secrete through their saliva bioactive components with immunomodulatory action. Some protozoa use these components of saliva as a means of transport and protection to establish their infection. The *Leishmania major* that causes cutaneous leishmaniasis is an important microorganism that can be transmitted by saliva. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory capacity of *Amblyomma cajennense* saliva in relation to *Leishmania major* infection in vitro. *Leishmania*-infected macrophages were used and subsequently treated with different concentrations of saliva 10 µg/ml; 5 µg/ml, 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml. The phagocytic capacity was also assessed by flow cytometry. Nitric oxide production was evaluated by the Griess colorimetric reaction through the supernatant collected from the cultures, and the cytokines IL-12, TNF-α, IL-10 and the chemokine MCP-1 were analyzed by the CBA method. An increase in phagocytic capacity was observed by macrophages treated with the lowest concentrations of saliva after one hour of infection. When evaluating nitric oxide production, a significant increase was observed in cultures treated with low saliva concentration. In relation to the cytokines, there was an increase in the infection conditions and no infection of the macrophages. In the conditions of non-infection there was an increase in IL-12, TNF-α and IL-10 cytokines in the cultures that received the lowest concentrations of saliva. MCP-1 chemokine showed a dose-dependent decrease in cultures that received saliva alone. Under infection conditions, the increase of IL-12, TNF-α, IL-10 and the chemokine MCP-1 in saliva treated cultures at all concentrations was observed. In this way we can conclude that *Amblyomma cajennense* saliva has specific mechanisms that can modulate cells and molecules of the host immune system including macrophages and the cytokines and chemokines produced by them.

Key Words: Cytokines; Chemokines; Tick; Immunomodulation;



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de fagocitose média e desvio padrão de culturas de macrófagos infectados com <i>Leishmania major</i> tratados com diferentes concentrações de saliva de <i>Amblyomma cajennense</i> -----	38
Tabela 2 - Taxa da produção média e desvio padrão de culturas de macrófagos infectados com <i>Leishmania major</i> e tratados com diferentes concentrações de saliva de <i>Amblyomma cajennense</i> -----	39
Tabela 3 - Análise de citocinas: Taxa de produção de citocinas, média e desvio padrão de culturas de macrófagos infectados com <i>Leishmania major</i> tratados com diferentes concentrações de saliva de <i>Amblyomma cajennense</i> -----	42



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise da Viabilidade dos macrófagos tratados com a saliva de <i>Amblyomma cajennense</i> -----	36
Figura 2 - Análise da fagocitose em macrófagos tratados com a saliva <i>Amblyomma cajennense</i> -----	37
Figura 3 - Análise da modulação da produção de oxido nítrico em macrófagos tratados com a saliva <i>Amblyomma cajennense</i> -----	39
Figura 4 - Análise da produção de citocinas em macrófagos tratados com saliva de <i>Amblyomma cajennense</i> -----	41



## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
CBA	Cytometric beads array
CFSE	Carboxifluoresceína Succinimidil Éster
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
IL-1	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
ml	Mililitro
MFI	Intensidade média de fluorescência
NEED	Naftiletlenodiamino dihidroclorídrico
nm	Nanômetro
NO	Oxido Nítrico
°C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato-salino
PGF <sub>2</sub> -α	Prosta Glandina
PE	Ficoeritrina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
Th 1	T helper 1
Th 2	T helper 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral



## SUMÁRIO

Capítulo 1: Revisão de literatura .....	12
1.1 Aspectos gerais sobre carrapatos e sua importância na saúde.....	12
1.2 Aspectos sobre a interação parasito hospedeiro .....	15
1.3 Aspectos gerais sobre Leishmanioses e sua importância na saúde .....	17
1.4 Visão geral sobre a interação Leishmania-hospedeiro .....	18
1.4 Referências .....	20
Capítulo 2 – Artigo .....	26
Anexo I .....	50



## Capítulo 1: Revisão de literatura

### 1.1 Aspectos gerais sobre carrapatos e sua importância na saúde

Os carrapatos são artrópodes, ectoparasitas obrigatoriamente hematófagos (GUGLIELMONE et al., 2014). Pertencem a classe *Arachnida*, subclasse *Acarina*, e ordem *Ixodida* (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009). Foram descritas cerca de 820 espécies que estão divididas em três grandes famílias, sendo elas, os *Argasídeos* (carrapatos moles) abrange cerca de 195 espécies, os *Ixodidae* (carrapatos duros) com cerca de 625 espécies e os *Nuttalliellidae* representado somente por uma espécie presente no continente africano (FIVAZ; PETNEY; HORAK, 1992; VIEIRA et al., 2002). No Brasil, foram descritas cerca de 64 espécies de carrapatos, sendo 44 *Ixodidae* e 20 *Argasídes* (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009; NAVA et al., 2010).

A família *Ixodidae* compreende as espécies de carrapatos de maior importância médico-veterinária no Brasil. Sendo eles os gêneros *Boophilus*, *Anocentor* e *Rhipicephalus*, que são os carrapatos principalmente encontrados em bovinos, equinos e cães. O gênero *Amblyomma*, é um dos mais numerosos do Brasil, tendo considerável importância na saúde pública, já que inclui espécies que parasitam humanos. Dentre elas, destacam-se *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cooperi* e *Amblyomma sculptum* que estão incriminadas na manutenção enzoótica e na transmissão da febre maculosa para humanos (CIPRANDI; HORN; TERMIGNONI, 2003; GWAKISA et al., 2001)

A espécie *A. cajennense* foi descrita por Fabricius em 1787, tem origem na região neotropical, sua descrição foi feita a partir de uma espécie coletada na Guiana Francesa (BEATI et al., 2013; GUGLIELMONE et al., 2006). Os adultos no Brasil são conhecido popularmente como: “carrapato estrela”, “rodulheiro”, “redulheiro”; as ninfas: “vermelhinho”; e as larvas: “micuim”(DARCI; ARZUA; BECHARA, 2006). A distribuição do *A. cajennense* ocorre no sul dos Estados Unidos, México, América Central, Caribe e na maioria dos países da América do Sul, com exceção do Chile e do Uruguai (CUNHA et al., 2007). No Brasil, é encontrado com abundância em todos os estados das regiões sudeste e centro oeste. O *A. cajennense* completa apenas uma geração por ano no sudeste do Brasil, com os três estágios parasitários marcadamente distribuídos

ao longo do ano. As larvas predominam nos meses de abril a julho, as ninfas predominam de julho a outubro e os adultos predominam nos meses quentes e chuvosos, de outubro a março (DARCI; ARZUA; BECHARA, 2006; LABRUNA et al., 2004; MARTINS et al., 2016; NAVA et al., 2010; VIEIRA et al., 2002).

Mesmo em áreas com abundância de hospedeiros, o *A. cajennense* pode não ser estabelecido pelas condições ambientais da região, que não propiciem o clima favorável para as fases de vida livre do carrapato. Estas condições são dependentes principalmente da latitude (baixas temperaturas ao sul do estado do Paraná limitam o estabelecimento deste carrapato) e do tipo de cobertura vegetal, que vai influenciar diretamente no microclima do solo. Tanto a presença como a abundância de populações de *A. cajennense* estão fortemente associadas à presença de áreas com média a densa cobertura vegetal, tais como pastos com abundância de vegetação, capoeiras e matas. A região de Campinas é um grande exemplo de um local propício para o estabelecimento do carrapato, pois há presença de mata ciliar e de capivaras (ESTRADA-PEÑA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2004; ESTRADA et al., 2006; MARTINS et al., 2016).

O *A. cajennense* passa por quatro estágios de desenvolvimento no seu ciclo de vida, sendo eles: ovo, larva, ninfa e adultos. Com exceção dos ovos, todos os estágios precisam parasitar um hospedeiro para dar sequência na sua evolução, sendo necessários três hospedeiros para completar o ciclo de vida (trioxeno). As fêmeas depois de fecundadas e ingurgitadas (teleóginas) desprendem-se do hospedeiro e caem solo, na vegetação permanecem por cerca de 12 dias, depois inicia-se o período de oviposição. Neste período uma única fêmea ovipõe em torno de cinco mil ovos, ao longo de 25 dias, finalizando com sua morte (OLIVER, 1989).

Após o período de incubação (30 dias em média à temperatura de 25°C) ocorre a eclosão dos ovos e o nascimento das larvas (hexápodes). As larvas sobem e descem a vegetação, conforme variações ambientais, até o encontro do primeiro hospedeiro, onde realizam o repasto de linfa, sangue ou tecidos dilacerados, por três a seis dias; em seguida desprendem-se do hospedeiro e buscam abrigo no solo onde, num período de 18 a 26 dias, ocorre a ecdise transformando-se no estágio seguinte (ninfa). As ninfas (octópodes) fixam-se em um novo hospedeiro e durante cinco a sete dias ingurgitam-se de sangue. Assim como no estágio larval, as ninfas encontram abrigo no solo e sofrem nova ecdise após 23 a 25 dias, transformando-se nos carrapatos adultos que dentro de sete dias já estão aptos para parasitar novos hospedeiros. (OLIVER, 1989; VIEIRA et al., 2002).

Um aspecto bastante importante e que interfere diretamente no ciclo de vida dos carrapatos é a disponibilidade de comida. Algumas espécies só se alimentam em um determinado hospedeiro, já outras como é o caso do *A. cajennense* dispõe de uma ampla variedade de hospedeiros. Os adultos têm predileção por mamíferos como equinos, bovinos, antas e capivaras, além de animais domésticos como búfalo, cão, gato, ovelha, assim como mamíferos silvestres de médio porte, podem ser parasitados. Há também registros de infestação em aves domésticas como perus e galinhas além de aves e animais silvestres. Nas áreas rurais da região sudeste o animal mais afetado é o equino, por conseguir albergar altas infestações, um único equino pode conter 50 mil larvas, 12 mil ninfas e até 2 mil adultos sem que sua vida esteja em risco (LABRUNA et al., 2004, 2011)

Quanto maior a densidade populacional, maior disponibilidade de alimentos, consequentemente maior o número de carrapatos. Embora o *A. cajennense* tenha uma baixa especificidade para hospedeiros as variáveis como presença de hospedeiro primário (vertebrado, sem o qual, uma determinada população de carrapato não é capaz de se estabelecer numa determinada localidade) e condições ambientais devem ser consideradas. O hospedeiro primário é o fator limitante para o estabelecimento de uma determinada espécie de carrapato em uma nova região. O *A. cajennense* tem como hospedeiro primário equinos, antas e capivaras, sendo assim em uma área onde já tem a presença estabelecida desse carrapato com certeza um de seus hospedeiros reside no local, e a partir daí eles conseguem parasitar novos hospedeiros, sendo estes, os secundários (ESTRADA et al., 2006; LABRUNA et al., 2004; SANTOS et al., 2013; VIEIRA et al., 2002)

Infestações por *A. cajennense* se tornaram um grande problema em vários países da América, Europa e Ásia, devido a perdas econômicas que vem trazendo com depreciação do couro dos animais infestados, diminuição da produção, disseminação de agentes patogênicos através do parasitismo (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; LABRUNA et al., 2011; MASSARD; FONSECA, 2004). No processo de alimentação, os carrapatos causam lesão traumática devido a dilaceração de células e tecidos, espoliação direta em consequência da hematofagia, ação tóxica pela inoculação de substâncias de alto peso molecular presentes na saliva. Além disso a lesão causada pela picada do carrapato abre uma porta para infecção predispondo ao desenvolvimento de miíases e abscessos. Durante o processo de alimentação, os carrapatos podem ainda transmitir microrganismos patogênicos juntamente com a saliva. A saliva é considerada

a rota primária pela qual microrganismos são inoculados na corrente sanguínea dos hospedeiros (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; MASSARD; FONSECA, 2004).

Dentre os microrganismos patogênicos transmitidos pelo *A. cajennense* pode-se citar a *Rickettsia rickettsii*, que é o agente causador da Febre maculosa no Brasil. Há transmissão transovariana, permitindo que o mesmo fique infectado por toda sua vida e também transmita o agente para gerações futuras (Jongejan e Uilenberg, 2004; Soares *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013) Recentemente foi isolado um vírus chamado Cacipaporé no *A. cajennense* em São Paulo, sugerindo que o carrapato é seu potencial transmissor (GARCIA *et al.*, 2017). Há também registros de transmissão de *Theileria equi* e *Babesia caballi*, que são agentes etiológicos da piroplasmose equina. (ALECRIM *et al.*, 1983; BARROS *et al.*, 2015).

## 1.2 Aspectos sobre à interação parasito hospedeiro

A saliva do carrapato é o ponto chave para o sucesso de sua alimentação, apresenta proteínas com grande capacidade imunomoduladora. Muito tem-se estudado sobre a interação parasita-hospedeiro (carrapato-vertebrado) e os mecanismos utilizados para que os carrapatos consigam driblar o sistema imunológico do hospedeiro, fixar-se e se alimentar-se por dias. Quando a integridade da pele é perdida, os processos necessários para impedir a invasão microbiana e restaurar a função de barreira da pele são iniciados imediatamente (ŠIMO *et al.*, 2017). Células sentinelas pré-posicionadas, tais como mastócitos, macrófagos e células dendríticas, eosinófilos e neutrófilos são ativadas por componentes específicos liberados de células danificadas da pele ou expressos pelo próprio carrapato. Mediadores solúveis liberados pelos macrófagos, como a bradicinina e a histamina, causam coceira e dor. Células sentinelas liberam quimiotáticos, incluindo quimiocinas e leucotrienos, que recrutam células imunológicas inatas, como os neutrófilos e monócitos, para o local do dano, bem como citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina. (IL-1), que leva a ativação de células imunes inatas locais e infiltrantes. As células dendríticas ativadas pelos antígenos estranhos migram via linfáticos para linfonodos que drenam a pele, onde o antígeno pode ser apresentado a linfócitos T virgens, iniciando assim uma resposta imune adaptativa que culmina na geração de anticorpos específicos para antígenos (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

Acredita-se que os mastócitos tenham papel crucial na regulação da infestação de carrapatos como foi demonstrado que em raças zebuínas, resistentes a carrapatos, há grande quantidade de mastócitos dérmicos. É importante associar o fato de que a liberação de histamina pelos mastócitos produz prurido e desencadeia a mudança de comportamento do hospedeiro que pode desalojar o carrapato do local de alimentação. Por isso acredita-se na existência de lipocalinas presentes na saliva do carrapato que sequestram essa amina dos seus receptores (FILHO; BECHARA; TEODORO, 2006; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997).

Já a maior parte da população de eosinófilos é encontrada nos tecidos, predominantemente nas superfícies do corpo, que interagem com o ambiente externo. Em sucessivas infestações por carrapatos observou-se um infiltrado inflamatório no local da picada, mas não se pode ainda determinar o papel dele na resposta inflamatória frente a saliva (PARIZI; MASUDA; VAZ JUNIOR, 2007).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos que iniciam a resposta imune adaptativa a patógenos invasores, fazendo a apresentação dos mesmos para as células T virgens (Banchereau e Steinman, 1998). Estudos realizados sugerem que os carrapatos possivelmente desenvolveram estratégias de sobrevivência que diminuem as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células dendríticas como IL-12 e aumentam as anti-inflamatórias como IL-10 através dos TLRs induzindo a produção de células dendríticas supressoras aumentando as chances de o carrapato permanecer fixado no hospedeiro. Em contrapartida estudos sugerem que diminuição da resposta imune gerada na presença de saliva é causada pela inibição da diferenciação e maturação das células dendríticas, impedindo a polarização das células T virgens (CAVASSANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

Os neutrófilos são células fagocíticas altamente móveis que constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato, elas englobam e degradam microrganismos e produzem várias quimiocinas, bem como importantes citocinas pró-inflamatórias, além disso influenciam o tráfego celular precoce e a ativação durante os processos fisiopatológicos (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014). Tem-se visto que a saliva de carrapato possui proteínas que causam uma imunossupressão de neutrófilos, o que podem estar ligadas com a transmissão de patógenos ao hospedeiro (HIDANO et al., 2014).

A maioria dos macrófagos residentes nos tecidos é originária da circulação de monócitos derivados da medula óssea. Os macrófagos são encontrados em diferentes órgãos e em resposta à estimulação inflamatória e imunológica, monócitos adicionais são recrutados em maior número para o local, exibindo diferentes fenótipos dos macrófagos originalmente residentes (TAYLOR et al., 2005). Os carrapatos usam macrófagos para orquestrar uma resposta imune do hospedeiro modificada para criar um equilíbrio delicado de reações inflamatórias e imunes, polarizando a resposta em direção à via anti-inflamatória do TLR2 e ao perfil de citocinas (KRAMER et al., 2011).

### 1.3 Aspectos gerais sobre Leishmanioses e sua importância na saúde

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, é uma zoonose endêmica em vários continentes como Ásia, América e África, compreendendo cerca de 98 países. É considerada uma doença tropical negligenciada, causam formas clínicas graves que podem levar a deformidades, incapacidades e mortes. Em 2017 20.792 dos 22.145 (94%) dos novos casos relatados pela organização mundial da saúde ocorreram em sete países, sendo eles, Brasil, Etiópia, Índia Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (Basano e Camargo, 2004; Alvar *et al.*, 2012; Who, 2017).

As *Leishmanias* pertencem ao reino Protista (Haeckel, 1866), classe *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963; Emend. Vickerman, 1976), subclasse *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004), ordem *Trypanosomatida* (Kent, 1880), família *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901), subfamília *Leishmaniinae* (Maslov E Lukeš 2012) e gênero *Leishmania* (Ross, 1903).

As leishmanioses foram divididas em dois subgêneros sendo o *Viannia*: *L. (Viannia) braziliensis*; *L. (V.) peruviana*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) panamensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) colombiensis*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenbergi* e o *Leishmania*: *L. (Leishmania) mexicana*; *L. (L.) pifanoi*; *L. (L.) amazonensis*; *L. (L.) garnhami*; *L. (L.) venezuelensis*; *L. (L.) major* (AKHOUNDI et al., 2016).

As *Leishmanias* são parasitos heteróxenos, que se alojam nas células fagocíticas dos mamíferos e no trato intestinal dos flebotomíneos, embora algumas espécies de carrapatos têm sido relatadas como potencial vetor de *Leishmania* spp. A leishmaniose no Brasil apresenta uma grande diversidade de padrões epidemiológicos, com isso pode-

se encontrar uma gama de vetores envolvidos na transmissão (AKHOUNDI et al., 2016; DANTAS-TORRES et al., 2010). No Brasil as principais espécies mais comuns são *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensi*, *Leishmania (V) panamensis*, *Leishmania (V) lainsoni*, *Leishmania (L) mexicana*, *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (L) venezuelensis*, *Leishmania (L) chagasi* (BOITE et al., 2014).

A *Leishmania major* é a principal causadora de leishmaniose cutânea no velho mundo e é transmitida principalmente pelo vetor *Phlebotomus papatasi* (AL-JAWABREH et al., 2004). É um parasito digenético pois alterna entre um hospedeiro humano e um inseto vetor. Fora do hospedeiro humano os parasitos passam por algumas mudanças quando confinados ao intestino médio do vetor. O ciclo inicia-se quando o flebotomíneo fêmea realiza seu repasto sanguíneo e ingere macrófagos infectados com amastigotas, durante a migração pelo seu trato digestório há mudanças de pH e temperatura que levam há alterações morfológicas do parasito. Essas amastigotas se transformam em promastigotas pró-cíclicos, que são formas com pouca motilidade, e grande capacidade replicativa. São envoltas por uma matriz peritrófica que as separa do intestino. Cerca de 72h depois começa a fase de desaceleração da replicação para iniciar a fase de nectomonadas onde possuem um flagelo longo e grande motilidade, migram para a válvula stomodeal e por fim se transformam em promastigotas metacíclicas e são liberadas durante um novo repasto sanguíneo do vetor para dentro do hospedeiro humano ou animal e se aloja dentro de macrófagos preferencialmente. (Alvar *et al.*, 2012; Dostálová e Volf, 2012).

A *Leishmania spp* é responsável por uma das afecções dermatológicas mais importantes, principalmente pela dificuldade de tratamento enfrentada. As manifestações clínicas variam desde uma forma subclínica, a um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas, com lesões sujeitas à diferentes graus de severidade (BALAÑA-FOUCE et al., 2007). O grau da lesão varia de acordo com a espécie de *Leishmania spp*, resposta imunológica do hospedeiro e o local da picada (AL-JAWABREH et al., 2004).

#### **1.4 Visão geral sobre a interação Leishmania-hospedeiro**

Afim de formar um inóculo infectante o *P. papatasi* possui algumas proteínas salivares importantes. Tais proteínas apresentam atividade farmacológica, como,

vasodilatadora, antiplaquetária, anti-homeostática, imunossupressora e compostos que auxiliam na exacerbação da infecção de *L. major*. Dentre as várias proteínas presentes na saliva desse vetor podemos citar, aspirase- enzima que hidrolisa trifosfato de adenosina e difosfato de adenosina em monofosfato de adenosina, 5' nucleotidase - enzima que hidrolisa monofosfato de adenosina, formando adenosina, compostos com atividade imunossupressoras, vasodilatadoras e antiplaquetária, adenosina deaminase - converte adenosina em inosina, composto esse com efeito anti-inflamatório . Além da saliva como veículo se faz necessário também a presença de promastigotas metacíclicas infectantes (WIKEL; AKSOY; DIMOPOULOS, 2017). Para que essas promastigotas metacíclicas obtenham sucesso em sua infecção, utilizam as propriedades imunomoduladoras presentes na saliva do *P. papatasi* sendo essas a diminuição da produção de NO e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, a apresentação de antígenos por macrófagos infectados através do bloqueio da interação ocorrida entre células T e células apresentadoras de antígenos inibe a modulação da resposta Th1, aumentando a resposta do padrão Th2 com acentuada produção de IL-4 por linfócitos em animais infectados e não infectados (ROGERS et al., 2002; WANG; PRICE; DOI, 1985). Suprime o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), a proliferação de linfócitos T e a expressão de TNF- $\alpha$  por macrófagos e aumenta a liberação de IL-10, IL-6 e PGE2 (ROGERS et al., 2002).

#### 1.4 Referências

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- AL-JAWABREH, A. et al. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 7, p. 812–816, 2004.
- ALECRIM, I. et al. Registro do Primeiro Caso de Infecção Humana por Babesia Spp no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, p. 11–29, 1983.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012.
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **Pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 41612, 2007.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.
- BARROS, E. M. et al. Detecção de Theileria equi e Babesia caballi e anticorpos anti-Ehrlichia spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 716–722, 2015.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.
- BEATI, L. et al. Amblyomma cajennense {(Fabricius,} 1787) {(Acari:} Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.
- BOITE, M. C. et al. Distinct Leishmania Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (

- Rodentia : Hystricognathi ) from Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2014.
- CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.
- CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation , maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, p. 235–245, 2005.
- CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos : fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, p. 250–262, 2003.
- CUNHA, A. P. et al. Controle Estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em Equinos, Minas Gerais, Brasil - Parte I. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 221–228, 2007.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Revista de Parasitologia**, v. 106, p. 857–860, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.; BARROS-BATTESTI, D. The ticks {(Acari:} Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, n. 1, p. 30–46, 2009.
- DARCI, B.-B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1º ed. São Paulo: [s.n.].
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.
- ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution

and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283–292, 2004.

ESTRADA, D. et al. Rickettsiae detection in *Amblyomma* ticks {(Acari:} Ixodidae) collected in the urban area of Campinas City, {SP}. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68–71, 2006.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- $\gamma$ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, jul. 1998.

FILHO, J. R. E.; BECHARA, G. H.; TEODORO, R. L. Dermal Mast Cell Counts in F2 Holstein x Gir Crossbred Cattle Artificially Infested with the Tick *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 478, p. 476–478, 2006.

FIVAZ, B.; PETNEY, T.; HORAK, I. **Tick vector biology**. 1<sup>o</sup> ed ed. [s.l: s.n.].

FRANCISCHETTI, I. M. . et al. The Role of Saliva in Tick Feeding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 2051–2088, 2010.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **National Institutes of Health**, v. 71, n. 5, p. 493–512, 2009.

GARCIA, G. et al. Genetic Characterization of Cacipacoré Virus From Ticks Collected in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1783–1786, 2017.

GEISSMAN, T. A. **Organic chemistry of secondary plant metabolism / by T.A. Geissman and D.H.G. Crout. - Version details - Trove**. 1<sup>o</sup> ed. São Francisco: [s.n.].

GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.

- GUGLIELMONE, A. A. et al. **The Hard Ticks of the World**. [s.l.] springer, 2014.
- GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 2001.
- HIDANO, A. et al. Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**, v. 23, p. 466–474, 2014.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The Global Importance of Tick. **Parasitology**, v. 129, p. S3–S14, 2004.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015a.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, out. 2015b.
- KRAMER, C. D. et al. Tick saliva regulates migration , phagocytosis , and gene expression in the macrophage-like cell line , IC-21. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 665–671, 2011.
- KRAUSE, P. J. et al. Dermatologic Changes Induced by Repeated *Ixodes scapularis* Bites and Implications for Prevention of Tick-Borne Infection. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 6, p. 603–610, 2009.
- LABRUNA, M. B. et al. Strategic control of the tick *Amblyomma cajennense* on horses. **Ciência Rural**, v. 34, p. 195–200, 2004.
- LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.
- MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu

- lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- MASSARD, C.; FONSECA, A. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15–23, 2004.
- MATTOS, D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119–122, 2004.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033–1079, 1997.
- NAVA, S. et al. Description of a New Argasid Tick {(Acari:} Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089–1101, 2010.
- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Veterinary Parasitology Tick saliva induces regulatory dendritic cells : MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 288–297, 2010.
- OLIVEIRA, F. et al. Deconstructing Tick Saliva. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.
- OLIVER, J. H. Biology and systematics of ticks (acari:ixodida). **Annual Reviews**, v. 20, n. 7, p. 397–430, 1989.
- PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. DA S. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos \* Modulation of the host Immune system by ticks. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 35, n. August, p. 285–294, 2007.
- ROGERS, K. A. et al. **Type 1 and type 2 responses to Leishmania major** **FEMS Microbiology Letters**, 19 mar. 2002. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007646>>. Acesso em: 28 nov. 2018
- SANTOS, A. P. et al. **Febre maculosa : dinâmica da doença , hospedeiros e vetores.**

Piracicaba: [s.n.].

ŠIMO, L. et al. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–23, 2017.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 139–151, 2012.

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annual Reviews of Immunology**, v. 23, p. 901–44, 2005.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines : facts beyond expression. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. October, p. 1–7, 2014.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 8346–8353, 2005.

THIAKAKI, M. et al. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis* -BALB / c mouse model. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 760–766, 2005.

VIEIRA, A. M. L. et al. **Manual de Vigilância Acarológica - Estado de São Paulo**. São Paulo: [s.n.].

WANG, L. F.; PRICE, C. W.; DOI, R. H. *Bacillus subtilis* dnaE encodes a protein homologous DNA primase of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3368–3372, 15 nov. 1985.

WIKEL, S. K.; AKSOY, S.; DIMOPOULOS, G. **Arthropod vector: controller of disease transmission. Vector microbiome and innate immunity of arthropods.** 2<sup>o</sup>

ed. Estados Unidos: [s.n.].

## **Capítulo 2 – Artigo**

A saliva de *Amblyomma cajennense* promove a modulação da infecção de macrófagos por *Leishmania major* *in vitro*.

Malú Mateus Santos<sup>1</sup>, Rafael Obata Trevisan<sup>2</sup>, Jonatas da Silva Catarino<sup>2</sup>, Chamberttan Souza Desidério<sup>2</sup>, Wesley Guimarães Bovi<sup>2</sup>, Marina de Oliveira<sup>2</sup>, Marcos Vinicius Silva<sup>2</sup>, Virmondes Rodrigues<sup>2</sup>, Carlo José Freire de Oliveira<sup>2</sup>, Endrigo Gabellini Leonel Alves<sup>1</sup>

Universidade de Uberaba<sup>1</sup> Av. Nenê Sabino, 1801 - Universitário, Uberaba - MG, 38055-500

Universidade Federal do Triângulo Mineiro<sup>2</sup> Av. Getúlio Guaritá, 130 - Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, 38025-440

Autor correspondente: Malú Mateus Santos; e-mail: [malu.mateus\\_21@hotmail.com](mailto:malu.mateus_21@hotmail.com)

## Resumo

Os carrapatos são ectoparasitas obrigatoriamente hematófagos, que secretam através de sua saliva componentes bioativos com ação imunomoduladora. Alguns protozoários utilizam esses componentes da saliva como meio de transporte e proteção para estabelecer sua infecção. A *Leishmania major* causadora da leishmaniose cutânea é um importante microrganismo que pode ser transmitido pela saliva de vetores. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção por *Leishmania major in vitro*. Foram utilizados macrófagos infectados com *Leishmania* e posteriormente tratados com diferentes concentrações de saliva, 10µg/ml; 5 µg/ml, 1µg/ml; 0,1µg/ml; 0,01µg/ml; 0,001µg/ml. Também foi avaliado a capacidade fagocítica, por meio da citometria de fluxo. A produção de óxido nítrico foi avaliada pela reação colorimétrica de Griess utilizando o sobrenadante coletado das culturas, e as citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e a quimiocina MCP-1 foram analisadas através do método de CBA. Foi observado um aumento da capacidade fagocítica pelos macrófagos tratados com as menores concentrações de saliva após uma hora de infecção. Ao avaliar a produção de óxido nítrico, evidenciou-se um aumento significativo em culturas tratadas com baixa concentração de saliva. Em relação às citocinas, houve um aumento nas condições de infecção e não infecção dos macrófagos. Nas condições de não infecção houve aumento das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10 nas culturas que receberam as menores concentrações de saliva. A quimiocina MCP-1 apresentou uma diminuição dose dependente nas culturas que receberam somente saliva. Em condições de infecção foi observado o aumento de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e da quimiocina MCP-1 nas culturas tratadas com saliva, em todas as concentrações. Desta forma conclui-se que a saliva de *Amblyomma cajennense* possui mecanismos específicos que conseguem modular células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro incluindo macrófagos e as citocinas e quimiocinas produzidas por eles.

Palavras Chaves: Carrapato; Imunomodulação; Citocinas; Quimiocinas

## Principais achados

A saliva do *A. cajennense* em menores concentrações aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos.

A saliva do *A. cajennense* é capaz de aumentar a produção de NO nas horas iniciais pós infecção.

A saliva do *A. cajennense* é capaz de modular a produção de citocinas

## **Introdução**

Os carrapatos são ectoparasitas obrigatoriamente hematófagos (GUGLIELMONE et al., 2014). Possuem imensa capacidade imunomoduladora através de sua saliva. O *A.cajennse* faz parte de uma família de carrapatos duros conhecidos como *Ixodides*, são considerados uma das espécies com maior importância na saúde pública por infectar o homem e transmitir *Rickettsias*, vírus e bactérias (CIPRANDI; HORN; TERMIGNONI, 2003; GWAKISA et al., 2001). A espécie *A. cajennense* no Brasil é encontrado com abundância em todos os estados das regiões sudeste e centro oeste, é um carrapato com ciclo de vida trioxeno, ele possui uma ampla variedade de hospedeiros, facilitando assim a sua alimentação. Dispõe de proteínas em sua saliva com capacidade imunomoduladora que garantem que o sistema imunológico do hospedeiro não o ataque (DARCI; ARZUA; BECHARA, 2006; LABRUNA et al., 2004; MARTINS et al., 2016; NAVA et al., 2010; VIEIRA et al., 2002).

As proteínas presentes em sua saliva são responsáveis pela permanência do carrapato se alimentando por longos períodos de tempo, pois ela diminui a resposta das células residentes como células dendríticas, impedindo a apresentação de antígenos para os linfócitos T, diminui a produção de citocinas por macrófagos como a IL-12 que é responsável pela ativação de novos macrófagos, TNF- $\alpha$  que auxilia no início da resposta inflamatória aguda, aumenta a IL-10 que é a principal citocina ligada ao perfil Th2 de resposta, levando a regulação da resposta imunológica. Diminui ainda quimiocinas como a MCP-1 que está diretamente ligada com atração de macrófagos para o local de alimentação. Sendo assim há alguns protozoários que utilizam a saliva dos carrapatos como meio de transporte para conseguir estabelecer sua infecção no hospedeiro como é o caso da *Leishmania* (MATTOS et al., 2004).

As *leishmanias* são parasitos heteróxenos, que se alojam nas células fagocíticas dos mamíferos e no trato intestinal dos flebotomíneos, embora algumas espécies de carrapatos têm sido relatadas como potencial vetor de *Leishmania spp.* A leishmaniose no Brasil apresenta uma grande diversidade de padrões epidemiológicos, com isso pode-

se encontrar uma gama de vetores envolvidos na transmissão (AKHOUNDI et al., 2016; DANTAS-TORRES et al., 2010). As *Leishmanias spp* são responsáveis por uma das afecções dermatológicas mais importantes, podendo levar a Leishmaniose visceral, Leishmaniose mucocutânea e Leishmaniose cutânea. Dentre as causadoras da leishmaniose cutânea está a *Leishmania major* que está classificada dentro do subgênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). Esta tem como principal vetor o *Phlebotomus papatasi*, que funciona como hospedeiro definitivo deste protozoário (AL-JAWABREH et al., 2004). Através das mudanças da fase de amastigotas para promastigotas metacíclicas que ocorrem dentro desse vetor a leishmania pode estabelecer sua infecção em um novo hospedeiro (Alvar *et al.*, 2012; Dostálová e Volf, 2012). Para o estabelecimento dessa infecção a *L. major* utiliza a saliva do *P. papatasi* como veículo. Essa saliva dispõe de proteínas como a aspirase, 5' nucleotidase, vasodilatadoras, antiplaquetária, adenosina deaminase (WIKEL; AKSOY; DIMOPOULOS, 2017). Para que essas promastigotas metacíclicas obtenham sucesso em sua infecção, utilizam as propriedades imunomoduladoras presentes na saliva do *P. papatasi* sendo essas a diminuição da produção de NO e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, a apresentação de antígenos por macrófagos infectados através do bloqueio da interação ocorrida entre células T e células apresentadoras de antígenos inibe a modulação da resposta Th1, aumentando a resposta do padrão Th2 com acentuada produção de IL-4 por linfócitos em animais infectados e não infectados (ROGERS et al., 2002; WANG; PRICE; DOI, 1985). Suprime o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), a proliferação de linfócitos T e a expressão de TNF- $\alpha$  por macrófagos e aumenta a liberação de IL-10, IL-6 e PGE2 (ROGERS et al., 2002).

Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar o poder imunomodulatório da saliva de *Amblyomma cajennense* diante da infecção por *Leishmania major in vitro*.

## **Materiais e Métodos**

### **Cultura celular**

Macrófagos RAW 264.7 imortalizados com o vírus da leucemia murina de Abelson, foram mantidas em garrafas de cultura celular de 25 ml, em meio RPMI enriquecido a 10% com soro fetal bovino, em estufa de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços (TC-Platte 96 Well, Standard, F) na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por poço, em quintuplicata. Foi coletado o sobrenadante para a realização do *Cytometric Beads Array* (CBA), reação de Griess e viabilidade.

### **Cultura de Parasitos**

A *Leishmania major* cepa Fridlein foram mantidas em garrafas de cultura de 50 ml com meio Schneider enriquecido a 10% com soro fetal bovino, em estufa de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C. Posteriormente foram marcadas com Carboxifluoresceína Succinimidil Éster (CFSE) para visualização durante a citometria de fluxo. Primeiramente as *Leishmanias* passaram por um ciclo de 3 lavagens e centrifugação para a retirada do meio em que estavam e passadas para o meio RPMI-1640 incompleto (sem soro fetal bovino), foram condicionadas a um novo ciclo de lavagens e após centrifugação, o pelet foi ressuspensionado em 1ml de RPMI-1640 incompleto. Em seguida foi adicionado 1µl de CFSE, homogeneizou-se e então foi incubado por 10 minutos a 37° e posteriormente 5 minutos a 4°. Na sequência foi adicionado 10ml de meio completo e repetiu-se o ciclo de lavagens. Posteriormente foi adicionado 5ml de meio M199 (EARLE) e os protozoários foram plaqueados na densidade de  $6 \times 10^5$  parasitos por poço.

### **Saliva de Carrapato**

A saliva foi previamente obtida por meio coletas de *A. cajennense* na região de Uberaba - MG, em equinos por infestação natural. A retirada da saliva aconteceu pelo estímulo de uma solução contendo 600 µl de dopamina e 400 µl de PBS 1x inoculados cerca de 0,5 ml na cavidade celomática do carrapato, após uma hora os mesmos começaram o processo de salivação. A saliva foi utilizada em seis concentrações, sendo 10µg/ml; 5 µg/ml, 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml.

### **Tratamento**

A cultura de macrófagos foi tratada com a saliva do carrapato *A. cajennense* em três condições de tempo, sendo elas 4, 12 e 24 horas, nas concentrações já citadas anteriormente.

### **CBA (*Cytometric Beads Array*)**

Para a quantificação das citocinas foi utilizado o CBA, onde as amostras e citocinas recombinantes foram incubadas com microesferas de diferentes intensidades de fluorescência conjugadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina. Em seguida, foram adicionados anticorpos conjugados com PE (Ficoeritrina) específicos para cada citocina. Após incubação, as microesferas foram lavadas com as soluções correspondentes e analisadas num citometro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando o software CellQuest (BD Biosciences). As microesferas específicas para cada citocina foram separadas devido ao fato de terem emitido diferentes intensidades de fluorescência a 660 nm e a quantidade de citocinas conjugadas com cada uma delas foi separada por intensidade de fluorescência a 585 nm. Dados de amostras e dados sobre citocinas recombinantes foram coletados e subsequentemente analisados usando o software FCAP Array 2.0 (Soft Flow, Pécs, Hungria), e as concentrações de citocinas foram determinadas usando curvas padrão.

### **Reação de Griess**

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (GEISSMAN, 1969). Consiste na detecção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Foi adicionado à uma placa de ELISA de 96 poços (TC-Platte 96 Well, Standard, F) 25 $\mu\text{l}$  do sobrenadante de cultura em duplicata (diluído em RPMI suplementado com SFB 10%), seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5% (solução A) e de NEED 0,1% (naftiletilenodiamino dihidroclorídrico 0,1%), também diluído em solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrato de sódio na concentração inicial de 200 $\mu\text{M}$  foi diluída de forma seriadas (fator 2) em água destilada. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro (EnSpire) foi realizada a 570 nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão, e os resultados obtidos expressos como a média da duplicata  $\pm$  erro padrão, utilizando-se Graphpad Prism (GraphPad Software 7.0, La Jolla, CA, EUA).

### **Teste de Viabilidade**

Para verificação da viabilidade celular frente ao tratamento com a saliva de *Amblyomma cajennense* foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando resazurina

(Alamar Blue). Macrófagos raw foram distribuídos em placas de 96 poços (TC-Platte 96 Well, Standard, F) na concentração de  $1,25 \times 10^6$  células/poço e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> *overnight*. No dia seguinte foi adicionado a saliva nas diluições de 10 µg/ml; 5 µg/ml, 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml. Em seguida foi adicionado 4 µL de resazurina por poço. A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> coberta com papel alumínio, protegida da luz, e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda a 594 nm em trinta minutos, um hora, uma hora e trinta minutos e duas horas.

### **Citometria**

Para análise de infectividade, macrófagos da linhagem Raw 264.7 as células foram ressuspendidas e distribuídas em placas de cultura de 96 poços na concentração de  $1,25 \times 10^6$  células por poço. Os parasitos da espécie *Leishmania major* cepa Fridlein foram obtidas de cultura celular, e incubadas com tampão salino fosfato (PBS) acrescido de 1 µM de CFSE por 5 min como já descrito anteriormente. Após a marcação, os parasitos foram adicionados a cultura de macrófagos Raw 264.7 na relação de 5:1 parasitos/células. Após uma, quatro e 24 horas as células foram coletadas e lavadas para remover os parasitos que não invadiram as células e analisadas usando o FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). As análises foram feitas usando CellQuest 5.1 and FlowJo10 (TREESTAR, Ashland, OR, USA) software.

### **Análise estatística**

Todas as variáveis foram testadas por distribuição normal e variância. O teste de Shapiro-Wilk e kolmogorov smirnov, foi utilizado para avaliar a normalidade de todas as variáveis. Nos casos de distribuição não gaussiana de dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para análise de variáveis pareadas. As comparações múltiplas como mais de uma família de variáveis relativas às medianas de valores para mais de dois grupos foram feitas usando o teste não paramétrico de oneway Anova seguido pelo teste de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%). A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism (GraphPad Software 7.0, La Jolla, CA, EUA).

## Resultados

### Análise da viabilidade dos macrófagos tratados com a saliva de *Amblyomma cajennense*

Foi observado que diferentes concentrações da saliva do carrapato *A. cajennense* não alteram a viabilidade celular nos diferentes tempos e concentrações de saliva testados.

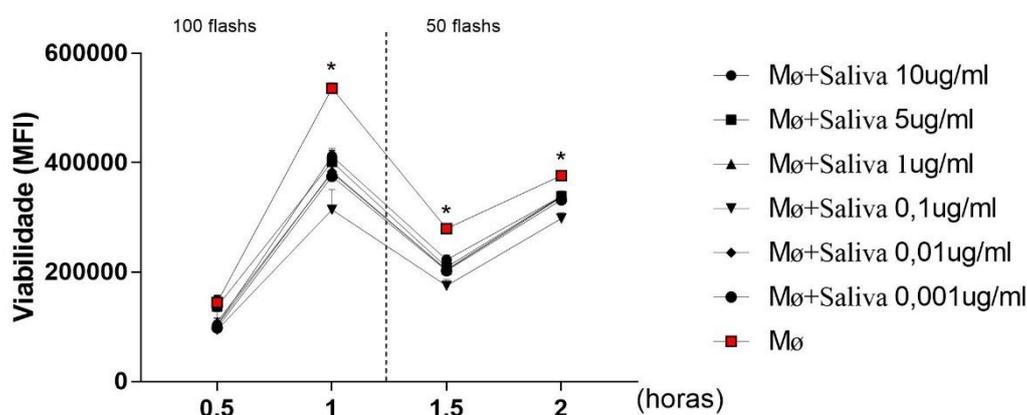


Figura 1: Viabilidade celular. Para verificar se a saliva do *A. cajennense* era tóxica para os macrófagos foi realizado o ensaio de viabilidade utilizando a resazurina. O teste se deu através da leitura de absorbância em diferentes tempos, sendo eles 30 minutos; 1 hora; 1 hora e 30 minutos e 2 horas. Não foi observada diferença significativa.

### Análise da fagocitose em macrófagos tratados com a saliva *Amblyomma cajennense*

Este estudo mostrou que a saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* é capaz de modular a atividade fagocítica dos macrófagos, aumentando significativamente a porcentagem de fagocitose nas concentrações 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0162$ ); 0,01  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0193$ ); 0,001  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,02250$ ) (Figura 2A). Já após 4 horas de infecção não foram observadas diferença significativa entre as taxas de fagocitose em relação ao macrófago não tratado com a saliva (Figura 2B). Após 24 horas de infecção só foi possível observar aumento significativo na taxa de fagocitose na concentração de 0,001  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0029$ ) (Figura 2C).

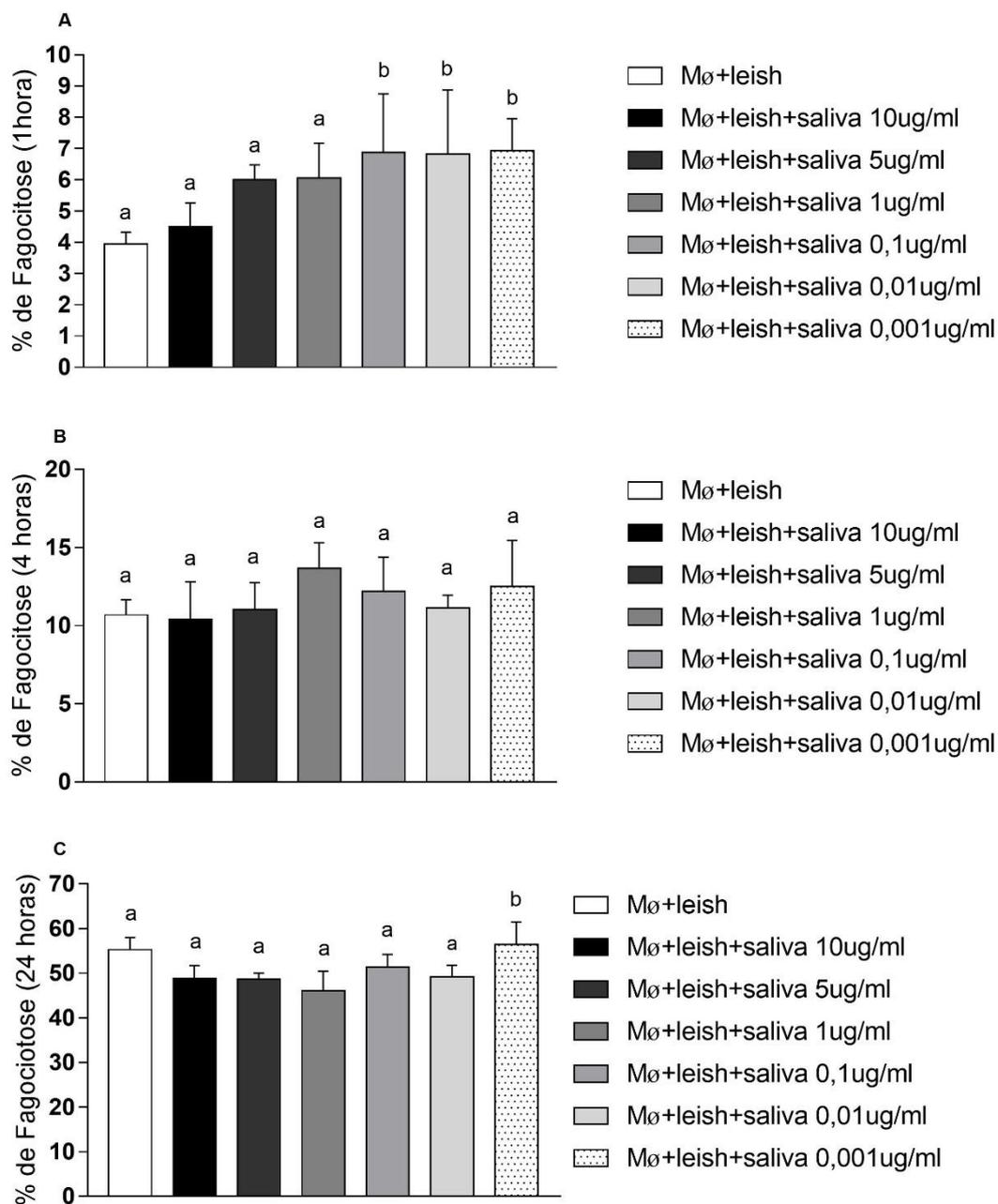


Figura 2 - Porcentagem média de desvio padrão de fagocitose nos macrófagos infectados em diferentes tempos. A saliva do *A. cajennense* foi capaz de modular a atividade fagocítica dos macrófagos, aumentando a porcentagem de fagocitose. Houve modulação positiva da capacidade fagocítica dos macrófagos, na primeira hora pós infecção (figura 2a), nas concentrações de 0,1  $\mu$ g/ml; 0,01  $\mu$ g/ml; 0,001  $\mu$ g/ml. Após 4 horas de infecção (figura 2b) não foi observada diferença significativa. Após 24 horas de infecção (figura 2c) foi possível observar diferença apenas na concentração de 1  $\mu$ g/ml em relação ao macrófago não tratado com a saliva. Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov. Como apresentaram normalidade, as médias de fagocitose de cada concentração de saliva foram comparadas com a cultura infectada pelo teste oneway anova, e aplicado o pós teste correspondente utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 1:** Taxa média (%) e desvio padrão de fagocitose em culturas de macrófagos infectados com *Leishmania major* tratados com diferentes concentrações de saliva de *A. cajennense*. Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov. Como não apresentaram normalidade, as médias de fagocitose de cada concentração de saliva foram comparadas com a cultura infectada pelo teste oneway anova, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

Tempos de avaliação	Mo+Leish	10µ/mL	5µ/mL	1 µ/mL	0,1 µ/mL	0,01 µ/mL	0,001 µ/mL
1 horas	3,94±0,383 <sup>aA</sup>	4,49±0,767 <sup>aA</sup>	6,00±0,478 <sup>aA</sup>	6,05±1,124 <sup>aA</sup>	6,87±1,877 <sup>aA</sup>	6,81±2,06 <sup>aA</sup>	6,93±1,017 <sup>aA</sup>
4 horas	10,69±0,968 <sup>aB</sup>	10,39±2,417 <sup>aB</sup>	11,06±1,699 <sup>aB</sup>	1,63±13,68 <sup>aB</sup>	12,21±2,184 <sup>aB</sup>	11,16±0,792 <sup>aB</sup>	13,53±2,927 <sup>aB</sup>
24 horas	55,3±2,695 <sup>aC</sup>	48,78±2,923 <sup>aC</sup>	48,66±1,374 <sup>aC</sup>	46,08±4,361 <sup>aC</sup>	51,38±2,868 <sup>aC</sup>	49,14±2,624 <sup>aC</sup>	56,42±5,094 <sup>aC</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas difere, entre si (p<0,05)

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas difere, entre si (p<0,05)

### **Análise da produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com a saliva *Amblyomma cajennense***

Após uma hora de infecção foi observado aumento significativo na produção de NO nas concentrações de 0,01 µg/mL (p<0,0159); 0,001 µg/mL (p<0,0159) (figura 3B), às quatro horas nas concentrações 0,1 µg/ml (p<0,0159); 0,01 µg/ml (0,0397); 0,001 µg/ml (0,0159) (figura 3C) e às 24 horas nas concentrações de 1 µg/ml (p<0,0397); 0,1 µg/ml (p<0,0079); 0,001 µg/ml (p<0,0079) (figura 3D). Foi possível observar que a saliva do carrapato é capaz de aumentar a produção de NO nas primeiras horas pós infecção.

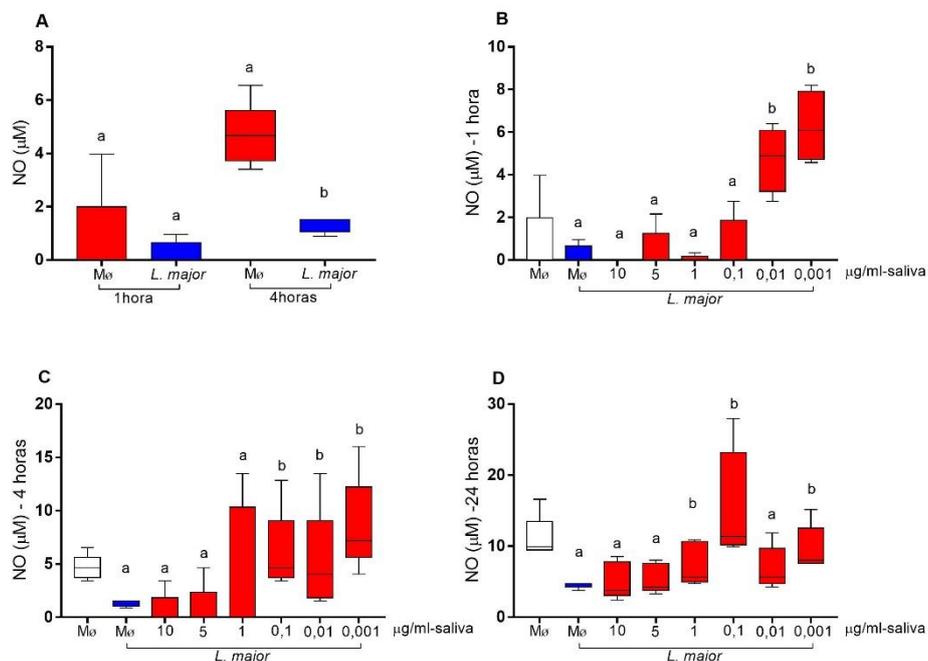


Figura 3: Foi possível observar que a saliva do carrapato é capaz de aumentar a produção de NO nas primeiras horas pós infecção. Em 1 hora (figura 3B) aumentou a produção nas concentrações de 0,01 µg/ml; 0,001, em 4 horas (figura 3C) 0,1 µg/ml; 0,01 µl/ml; 0,001 µl/ml e em 24 horas nas concentrações de 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,001 µg/ml (figura 3D). O aumento da produção de NO pelos macrófagos infectados e tratados é expressiva principalmente nas menores concentrações. Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney U. Como não apresentaram normalidade, as medianas de NO de cada concentração de saliva foram comparadas com a cultura infectada pelo teste oneway anova, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 2:** Mediana (mínimo - máximo) (µM) da produção de NO em culturas de macrófagos infectados com leishmania e tratados com diferentes concentrações de saliva de *Amblyomma cajennense* em 1, 4 e 24 horas.

Tempos de avaliação	Mo+Leish	10µg/mL	5µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL	0,01 µg/mL	0,001 µg/ml
1 horas	0(0-0,95) <sup>a</sup>	0(0-0) <sup>a</sup>	0(0-2,16) <sup>a</sup>	0(0-0,35) <sup>a</sup>	0(0-2,76) <sup>a</sup>	4,57(0,35-6,391) <sup>b</sup>	5,18(0,95-8,20) <sup>b</sup>
4 horas	1,52(0,89-1,52) <sup>a</sup>	0(0-3,40) <sup>a</sup>	0(0-4,66) <sup>a</sup>	0(0-13,48) <sup>a</sup>	4,66(3,40-12,85) <sup>b</sup>	4,03(1,52-13,48) <sup>b</sup>	7,18(4,03-16) <sup>b</sup>
24 horas	4,72(3,77-4,73) <sup>a</sup>	3,77(2,35-8,51) <sup>a</sup>	4,24(3,3-8,04) <sup>a</sup>	5,67(4,72-10,89) <sup>b</sup>	11,36(9,94-27,97) <sup>b</sup>	5,67(4,24-11,84) <sup>a</sup>	8,04(7,56-15,16) <sup>b</sup>

Medianas seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas difere, entre si (p<0,05)

### **Análise da produção de citocinas em macrófagos tratados com saliva de *Amblyomma cajennense***

Foi observado que a saliva era capaz de modular positivamente a produção de IL-12 na concentração de 0,1µg/ml ( $p<0,0317$ ), TNF- $\alpha$  nas concentrações de 5µg/ml ( $p<0,0397$ ); 1µg/ml ( $p<0,0286$ ) e a IL-10 na concentração de 5µg/ml ( $p<0,0317$ ) (Figura 4).

Observou-se também que nas concentrações de 5 µg/ml ( $p<0,0397$ ) e 1µg/ml ( $p<0,0286$ ) a saliva promove redução significativa na produção de TNF- $\alpha$ , além de reduzir a produção de IL-10 na concentração de 5µg/ml ( $p<0,0317$ ). No que diz respeito a quimiocina MCP-1, foi observado uma modulação negativa, dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração da saliva, menor a produção de MCP-1, 10 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 5 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 1 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 0,1 µg/ml ( $p<0,0079$ ); 0,01 µg/ml ( $p<0,0317$ ) .

A análise da modulação da produção de citocinas por macrófagos tratados com saliva e infectados com *Leishmania major in vitro*, mostrou que a saliva promove o aumento da produção de IL-12 nas concentrações de 10 µg/ml ( $p<0,0286$ ); 5 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 1 µg/ml ( $p<0,0286$ ); 0,1 µg/ml (0,0286); 0,01 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 0,001 µg/ml ( $p<0,0286$ ), TNF- $\alpha$  nas concentrações de 10 µg/ml ( $p<0,0159$ ); 5 µg/ml ( $p<0,0079$ ); 0,01 µg/ml ( $p<0,0317$ ); 0,001 µg/ml ( $p<0,0159$ ) e IL-10 na concentração de 0,1µg/ml ( $p<0,0159$ ). No que diz respeito a MCP-1, a saliva na maior concentração 10 µg/ml ( $p<0,0079$ ) diminuiu a expressão de dessa quimiocina, enquanto nas concentrações de 1 µg/ml ( $p<0,0476$ ) e 0,01 µg/ml ( $p<0,0238$ ) tem efeito positivo em sua produção após a infecção.

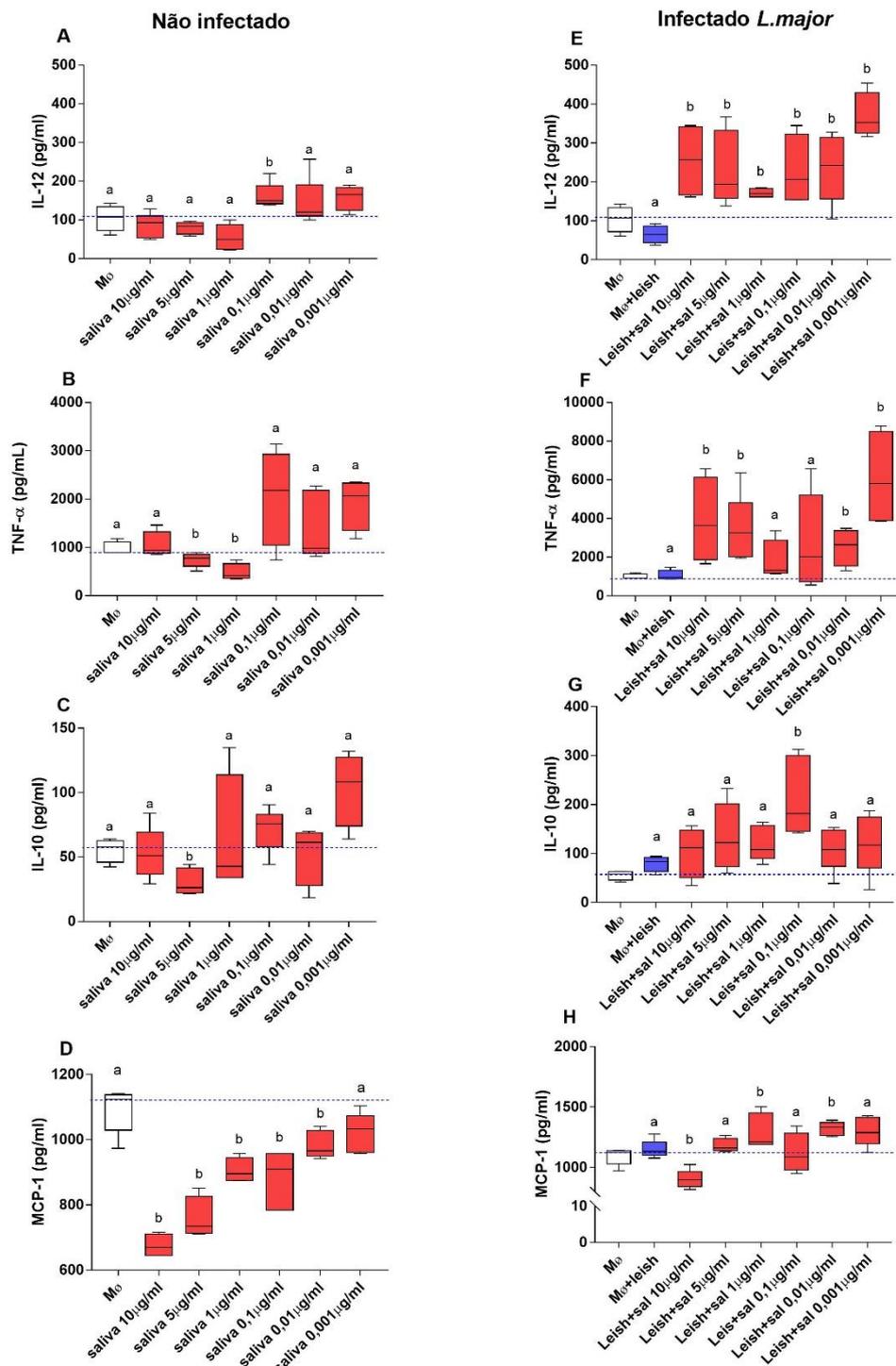


Figura 4 - Produção de citocinas por macrófagos tratados com saliva de *A. cajennense* e macrófagos tratados e infectados. Dosagem de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e MCP-1 comparada com a produção basal de macrófagos tratados e não infectados, respectivamente figura 3 A, B, C e D. Dosagem de IL-12 (A) onde houve significância na concentração de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , TNF- $\alpha$  (B) nas concentrações de 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ , IL-10 (C) 5  $\mu\text{g/ml}$  e MCP-1 nas concentrações de 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,001  $\mu\text{g/ml}$ . Foi comparada com a produção basal de macrófagos infectados com *L. major* na figura 3 E, F, G e H, onde foi avaliada a produção de IL-12 tendo significativa produção nas concentrações de 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , TNF- $\alpha$  nas concentrações de 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , IL-10 na concentração de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  e a quimiocina MCP-1 nas concentrações de 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney U. Como não apresentaram normalidade, as medianas de cada citocina/quimiocina de cada concentração de saliva foram comparadas com a cultura de macrófago infectada ou não pelo teste oneway anova, utilizando-se um confiança de 95%.

**Tabela 3:** Mediana (mínimo-máximo) (pg/mL) de citocinas em culturas de macrófagos infectados com *L. major* tratados com diferentes concentrações de saliva de *A. cajennense*. Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney U. Como não apresentaram normalidade, as médias de cada citocina/quimiocina de cada concentração de saliva foram comparadas com a cultura de macrófago infectada ou não pelo teste oneway anova, utilizando-se um confiança de 95%.

Citocinas/ Infecção	Mo/ Mo+leishmania	10µg/mL	5µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL	0,01 µg/mL	0,001 µg
IL-12 Mo	107 <sup>a</sup> (60-142)	92 <sup>a</sup> (48-127)	82 <sup>a</sup> (57-95)	48 <sup>a</sup> (21- 99)	129 <sup>b</sup> (138- 219)	115 <sup>a</sup> (99- 256)	165 <sup>a</sup> (112- 189)
IL-12/ Mo+leishmania	65 <sup>a</sup> (37-92)	257 <sup>b</sup> (161- 344)	193 <sup>b</sup> (138- 367)	169 <sup>b</sup> (161- 185)	207 <sup>b</sup> (153- 344)	242 <sup>b</sup> (105- 328)	353 <sup>b</sup> (317- 453)
TNF-α Mo	895 <sup>a</sup> (895-1183)	939 <sup>a</sup> (852- 1464)	775 <sup>b</sup> (512- 895)	420 <sup>b</sup> (342- 735)	2178 <sup>a</sup> (735- 3136)	984 <sup>a</sup> (815- 2264)	2065 <sup>a</sup> (1183- 2352)
TNF-α/ Mo+leishmania	936 <sup>a</sup> (852-1462)	3635 <sup>b</sup> (1657- 6563)	3250 <sup>b</sup> (1945- 6373)	1320 <sup>a</sup> (1127- 3365)	2018 <sup>a</sup> (505- 6563)	2645 <sup>b</sup> (1286- 3482)	5792 <sup>b</sup> (3847- 8768)
IL-10 Mo	57 <sup>a</sup> (42-63)	51 <sup>a</sup> (29-93)	26 <sup>b</sup> (21-44)	42 <sup>a</sup> (34- 134)	75 <sup>a</sup> (44- 90)	61 <sup>a</sup> (18- 69)	108 <sup>a</sup> (63,99- 132)
IL-10/ Mo+leishmania	83 <sup>a</sup> (56-94)	111 <sup>a</sup> (34-156)	122 <sup>a</sup> (60- 232)	108 <sup>a</sup> (77- 163)	181 <sup>b</sup> (142- 312)	108 <sup>a</sup> (38- 153)	117 <sup>a</sup> (26- 187)
MCP-1 Mo	1123 <sup>a</sup> (973-1142)	669 <sup>b</sup> (644- 716)	734 <sup>b</sup> (710- 851)	895 <sup>b</sup> (873- 957)	910 <sup>b</sup> (784- 957)	965 <sup>b</sup> (941- 1041)	1032 <sup>a</sup> (957- 1104)
MCP-1 Mo+leishmania	1133 <sup>a</sup> (1077-1276)	859 <sup>b</sup> (817- 1024)	1162 <sup>a</sup> (1133- 1265)	1212 <sup>b</sup> (1192- 1501)	1086 <sup>a</sup> (949- 1343)	1331 <sup>b</sup> (1254- 1390)	1287 <sup>a</sup> (1123- 1426)

Medianas seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas difere, entre si (p<0,05)

## Discussão

O carrapato *A. cajennense* é um artrópode hematófago que possui baixa especificidade de hospedeiros e permanece fixado nos mesmos por um longo período de tempo. Ele dispõe de uma extraordinária gama de proteínas presentes em sua saliva com

capacidade de modular o microambiente de sua alimentação, incluindo as células residentes como os macrófagos, e as moléculas liberadas por eles sendo, quimiocinas e citocinas. Isso permite que o *A. cajennense* consiga evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro favorecendo a infestação e a transmissão de patógenos (FRANCISCHETTI et al., 2009). A *L. major* é um dos protozoários causadores da leishmaniose cutânea, é um parasito intracelular obrigatório, principalmente de macrófagos. É transmitida preferencialmente pelo *Flebotomo papatasi*, porém tem-se observado essa transmissão por carrapatos de forma mecânica, ingestão ou vetorial. A *Leishmania* pode utilizar da capacidade imunomoduladora da saliva do carrapato para estabelecer sua infecção no hospedeiro. Esse estudo mostrou que a saliva de *A. cajennense* é capaz de modular a capacidade fagocítica dos macrófagos, que são células importantes para a resposta imune inata e adaptativa. Mostrou-se também que a saliva modula a produção de citocinas chave da resposta imunológica em condições de infecção e não infecção. Interfere na produção de quimiocinas que participam da migração de macrófagos, e também na produção de óxido nítrico.

A capacidade imunomoduladora da saliva do *A. cajennense* não está relacionada com a toxicidade, uma que não foi observada redução da viabilidade do macrófago em nenhuma das concentrações testadas (Figura 1). Resultado semelhante foi observado por Carvalho-costa et al. (2015) ao estudar o efeito diferentes diluições de saliva de *A. cajennense* em células dendríticas. Portanto acredita-se que a saliva não sendo toxica para as células residentes impede uma resposta imune local no momento da picada, permitindo assim a alimentação do carrapato por longos períodos de tempos.

Foi mostrado que a saliva do *A. cajennense* aumenta a fagocitose das *L. major* pelos macrófagos nas menores concentrações, 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml em 1 hora e em 24 horas na concentração de 0,001 µg/ml (Figura 2). Em um estudo feito por (KRAMER et al., 2011) com saliva de *Dermacentor variabilis*, apresentou redução da fagocitose de partículas de zymosan nas maiores diluições utilizadas em seu trabalho, sendo 1 µl/ml e 2 µl/ml, mas não na sua menor diluição de 0,5 µl/ml. Em outro trabalho realizado por (KOTÁL et al., 2015a) onde foi avaliado a fagocitose de espiroquetas de *Borrelia afzelii*, foi demonstrado que a fagocitose é parcialmente inibida pelo estrato de glândula salivar de *Ixodide ricinus* em diferentes concentrações. Porém em um estudo feito *in vivo* com glândula salivar de *Phebotomo papatasi*, houve um aumento da migração de células como macrófagos e neutrófilos, levando ao aumento

da fagocitose (THIAKAKI et al., 2005). É provável que tanto a internalização quanto os mecanismos de morte de fagócitos sejam afetados pela saliva de carrapato, o que resulta em maiores taxas de sobrevivência do patógeno no local de alimentação. Quando o carrapato fixa em seu hospedeiro para realizar sua alimentação injeta grande quantidade de saliva para conseguir modular o microambiente imunológico no local da picada. Com isso há grande migração de células, como macrófagos e intensa fagocitose, até que as proteínas da saliva consigam diminuir essa resposta. É provável que a maior fagocitose apresentada no estudo em questão seja pela concentração de saliva utilizada, e a quantidade de proteínas presente que variam de uma espécie para outra.

Em relação ao NO, foi observado um aumento principalmente nas menores concentrações em diferentes tempos de dosagem. Foi realizado um trabalho com saliva de *Rhipicephalus sanguineus* onde utilizaram a concentração de 10 µg/ml; 20 µg/ml e 50 µg/ml e isso inibiu significativamente a produção de NO pelos macrófagos em efeito dose dependente (FERREIRA; SILVA, 1998). Outro estudo com saliva de *Ixodide scapularis* mostrou a diminuição do óxido nítrico produzido pelos macrófagos (KRAUSE et al., 2009).

Sabe-se que carrapatos apresentam expressões de proteínas em concentrações diferentes dependendo do seu estágio de alimentação, sendo assim os valores elevados de NO podem corresponder com proteínas diferentes que tenham sido expressas nas menores concentrações. Como já discutido anteriormente houve um aumento da fagocitose nas menores concentrações do tratamento com saliva, sendo compatível com a elevação dos níveis de NO, uma das principais substâncias microbicidas produzidas pelos macrófagos para eliminar microrganismos intracelulares, principalmente *Leishmanias*, sendo assim supõe-se que há uma maior polarização para um perfil Th1 de resposta imunológica.

As citocinas são moléculas de suma importância no sistema imunológico, através das mesmas o organismo consegue orquestrar sua resposta imunológica e realizar a polarização do perfil imunológico. Pensando nisso no presente trabalho foi observada a modulação de algumas citocinas com a saliva *per se* (Figura 4). Em trabalhos realizados por (CARVALHO-COSTA et al., 2015) e (OLIVEIRA et al., 2010) foi visto a mesma modulação somente da saliva em diferentes concentrações em células dendríticas.

A citocina IL-12 é produzida por macrófagos ativados, levando a uma polarização do perfil imunológico Th1. Há estudos indicando que a saliva de carrapatos inibe a produção de IL-12, como observado em estudos realizados com macrófagos murinos e

saliva de *Ixodide scapularis* (KOTÁL et al., 2015b) e *R. sanguineus* (FERREIRA; SILVA, 1998). No presente trabalho foi visto que na concentração de 0,01µg/ml a um aumento significativo em relação as demais, porem nas concentrações de 0,01µg/ml e 0,001µg/ml apesar de não apresentarem significância, tendem a aumentar, enquanto as maiores concentrações, 10 µg/ml, 5 µg/ml e 1 µg/ml estão sendo expressas em menores quantidades que a produção basal. O que se leva a pensar que nas menores concentrações de saliva, proteínas que antes eram menos expressadas, passam a exercer sua função devido a uma menor competição entre as proteínas salivares (Figura 4 A).

A citocina TNF- $\alpha$  é um importante mediador de resposta inflamatória aguda que estimula a atividade microbicida dos macrófagos e o recrutamento dos mesmos. Foi observado uma diminuição dessa citocina no presente estudo nas concentrações de 5µg/ml e 1µg/ml (Figura 4B). Em estudos realizados com saliva de diferentes carrapatos e flebotomíneos observou-se a diminuição dessa citocina. Em um estudo realizado com saliva de *R.sanguineus* na diluição de 1:20 em culturas de células dendríticas, observou-se a diminuição significativa das expressões dessa citocina (OLIVEIRA et al., 2011). Pensando na alimentação do *A. cajennense*, a diminuição dessa citocina é bastante importante para que não tenha resposta imunológica efetiva no local e ele consiga realizar sua alimentação completa.

A citocina IL-10 está relacionada com o perfil de resposta Th2, onde não há resposta imune aguda ou inflamação. Foi observado diminuição dessa citocina na concentração de 5µg/ml e uma tendência ao aumento nas outras concentrações (Figura 4C). De acordo com estudos realizados em espécies de flebotomíneos *P. papatasi* a saliva atua principalmente em células dendríticas e induz a produção de IL-10 por um mecanismo dependente da PGE<sub>2</sub>. Em outro estudo feito com saliva de *Dermatocentor variabilis* estimulou a produção de IL-10 em células semelhantes a macrófagos (KRAMER et al., 2011). É característico do *A. cajennense* a polarização para o perfil Th2 da resposta imune, por isso acredita-se que a tendência ao aumento da IL-10 na saliva *per se* seja uma forma de evasão do sistema imunológico, presente principalmente nessa espécie

A MCP-1 está relacionada diretamente com a quimioatração de macrófagos para o sítio de infecção. Nesse estudo percebeu-se uma modulação negativa, dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração da saliva, menor a produção (Figura 4 D). Em outro estudo com glândula salivar de *Lutzomia longipalpis*, foram observados resultados

similares, onde camundongos C57BL/6 tratados com glândula salivar de *L. longipalpis* tiveram menor expressão de MCP1, podendo estar relacionado com produção prévia de quimiocinas e, funcionar como um mecanismo regulador (TEIXEIRA et al., 2005). Há ainda na literatura, estudos que contradizem os resultados encontrado no presente trabalho, tal como, o estudo onde demonstraram que a saliva de *I. ricinus* culmina com o aumento da quimiocina MCP-1 (KOTÁL et al., 2015a). Acredita-se que esse é um mecanismo de defesa utilizado pelo *A. cajennense* através de componentes de sua saliva, afim de evitar a quimioatração de macrófagos para o local e a consequente resposta inflamatória, levando a interrupção da sua alimentação (FRANCISCHETTI et al., 2010). Quanto menos macrófagos chegarem no local de alimentação do carrapato, mais tempo de alimentação ele possui.

No ensaio realizado com os macrófagos infectados com *L. major* e tratados com diferentes concentrações de saliva, observou-se o aumento de todas as citocinas e quimiocina citadas (Figura 4). Nas citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  foi visto um aumento das mesmas em todas as concentrações utilizadas. Embora mostrado por (KOTÁL et al., 2015a)), (FERREIRA; SILVA, 1998; OLIVEIRA et al., 2011) que a saliva diminui essas citocinas e tendem a uma mudança do perfil Th1 para o Th2. Contudo levando em consideração estudos realizados com saliva de *Phlebotomus papatasi* onde a saliva do mesmo se mostrou protetora em casos de infecção de *L. amazonensis in vivo* (THIAKAKI et al., 2005). Pode-se pensar que as proteínas salivares do carrapato ao entrarem em contato com as proteínas presentes na membrana da *L. major* levaram a uma polarização do perfil Th1 aumentando as citocinas e a consequente produção da quimiocina MCP-1 para atrair mais macrófagos para o local onde a *L. major* se encontra. Esses resultados foram mostrados mais intensamente quando a citocina IL-10 apresentou-se significativa somente na concentração de 0,1 $\mu$ g/ml, mostrando que o perfil predominante é pró inflamatório (Figura 4).

Com isso conclui-se que a saliva do *A. cajennense* possui capacidade imunomoduladora o que provavelmente favorece o parasitismo de vários tipos de hospedeiros; que algumas proteínas em menores concentrações podem produzir um efeito maior pela diminuição de competição; que a saliva de *A. cajennense* pode ter uma implicação protetora em infecções com *L. major in vitro*; e que a saliva de *A. cajennense* consegue modular biologia de macrófagos infectados com *L. major*.

## Referências

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- AL-JAWABREH, A. et al. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 7, p. 812–816, 2004.
- ALECRIM, I. et al. Registro do Primeiro Caso de Infecção Humana por Babesia Spp no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 12, p. 11–29, 1983.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012.
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **Pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 41612, 2007.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.
- BARROS, E. M. et al. Detecção de Theileria equi e Babesia caballi e anticorpos anti-Ehrlichia spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 716–722, 2015.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.
- BEATI, L. et al. Amblyomma cajennense {(Fabricius,} 1787) {(Acari:} Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.

BOITE, M. C. et al. Distinct Leishmania Species Infecting Wild Caviomorph Rodents ( Rodentia : Hystricognathi ) from Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2014.

CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Immunosuppressive effects of Amblyomma cajennense tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.

CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation , maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, p. 235–245, 2005.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos : fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, p. 250–262, 2003.

CUNHA, A. P. et al. Controle Estratégico de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em Equinos, Minas Gerais, Brasil - Parte I. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 221–228, 2007.

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of Leishmania infantum in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy. **Revista de Parasitologia**, v. 106, p. 857–860, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.; BARROS-BATTESTI, D. The ticks {(Acari:} Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, n. 1, p. 30–46, 2009.

DARCI, B.-B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1º ed. São Paulo: [s.n.].

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.

- ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283–292, 2004.
- ESTRADA, D. et al. Rickettsiae detection in *Amblyomma* ticks {(Acari:} Ixodidae) collected in the urban area of Campinas City, {SP}. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68–71, 2006.
- FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- $\gamma$ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, jul. 1998.
- FILHO, J. R. E.; BECHARA, G. H.; TEODORO, R. L. Dermal Mast Cell Counts in F2 Holstein x Gir Crossbred Cattle Artificially Infested with the Tick *Boophilus microplus* ( Acari : Ixodidae ). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 478, p. 476–478, 2006.
- FIVAZ, B.; PETNEY, T.; HORAK, I. **Tick vector biology**. 1<sup>o</sup> ed ed. [s.l: s.n.].
- FRANCISCHETTI, I. M. . et al. The Role of Saliva in Tick Feeding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 2051–2088, 2010.
- FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **National Institutes of Health**, v. 71, n. 5, p. 493–512, 2009.
- GARCIA, G. et al. Genetic Characterization of Cacipacoré Virus From Ticks Collected in São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1783–1786, 2017.
- GEISSMAN, T. A. **Organic chemistry of secondary plant metabolism / by T.A. Geissman and D.H.G. Crout. - Version details - Trove**. 1<sup>o</sup> ed. São Francisco: [s.n.].
- GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America.

- Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. **The Hard Ticks of the World**. [s.l.] springer, 2014.
- GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 2001.
- HIDANO, A. et al. Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. **Insect Molecular Biology**, v. 23, p. 466–474, 2014.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The Global Importance of Tick. **Parasitology**, v. 129, p. S3–S14, 2004.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015a.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, out. 2015b.
- KRAMER, C. D. et al. Tick saliva regulates migration , phagocytosis , and gene expression in the macrophage-like cell line , IC-21. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 665–671, 2011.
- KRAUSE, P. J. et al. Dermatologic Changes Induced by Repeated *Ixodes scapularis* Bites and Implications for Prevention of Tick-Borne Infection. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 6, p. 603–610, 2009.
- LABRUNA, M. B. et al. Strategic control of the tick *Amblyomma cajennense* on horses. **Ciência Rural**, v. 34, p. 195–200, 2004.
- LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.

- MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- MASSARD, C.; FONSECA, A. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15–23, 2004.
- MATTOS, D. G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119–122, 2004.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033–1079, 1997.
- NAVA, S. et al. Description of a New Argasid Tick {(Acari:} Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089–1101, 2010.
- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Veterinary Parasitology Tick saliva induces regulatory dendritic cells : MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 288–297, 2010.
- OLIVEIRA, F. et al. Deconstructing Tick Saliva. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.
- OLIVER, J. H. Biology and systematics of ticks (acari:ixodida). **Annual Reviews**, v. 20, n. 7, p. 397–430, 1989.
- PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. DA S. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos \* Modulation of the host Immune system by ticks. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 35, n. August, p. 285–294, 2007.
- ROGERS, K. A. et al. **Type 1 and type 2 responses to Leishmania major**FEMS **Microbiology Letters**, 19 mar. 2002. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007646>>. Acesso em: 28 nov. 2018

SANTOS, A. P. et al. **Febre maculosa : dinâmica da doença , hospedeiros e vetores.**

Piracicaba: [s.n.].

ŠIMO, L. et al. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–23, 2017.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense* , Cayenne tick , with *Rickettsia rickettsii* , the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 139–151, 2012.

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annual Reviews of Immunology**, v. 23, p. 901–44, 2005.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines : facts beyond expression. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. October, p. 1–7, 2014.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 8346–8353, 2005.

THIAKAKI, M. et al. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis* -BALB / c mouse model. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 760–766, 2005.

VIEIRA, A. M. L. et al. **Manual de Vigilância Acarológica - Estado de São Paulo.** São Paulo: [s.n.].

WANG, L. F.; PRICE, C. W.; DOI, R. H. *Bacillus subtilis* dnaE encodes a protein homologous DNA primase of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3368–3372, 15 nov. 1985.

WIKEL, S. K.; AKSOY, S.; DIMOPOULOS, G. **Arthropod vector: controller of**

**disease transmission. Vector microbiome and innate immunity of arthropods. 2°**

ed. Estados Unidos: [s.n.].

## Anexo I

**CAMBRIDGE Instructions for Authors**

## Parasitology

## Scope

Parasitology publishes original papers on pure and applied parasitology, including biochemistry, molecular biology, immunology, genetics, physiology, epidemiology, ecology, vaccine and drug studies, and the control of parasitic infections, the application of new techniques, advances in the understanding of host-parasite relationships, theoretical studies and major systematic revisions. There is no minimum or maximum length for a paper but all manuscripts, including short ones, must be prepared in the standard format for this journal and any manuscript that is excessively long will be returned for shortening.

## Editorial Process

All manuscripts submitted to Parasitology are received by the Editor-in-Chief, Professor Stephen Phillips, who will make a first assessment of their suitability for the journal. At this stage a very small number of submissions are immediately rejected. Thereafter the manuscripts deemed appropriate for the journal are passed to the one of the Editors or retained by the E-in-C, to be then sent out to external reviewers for comment and advice. The referees are often members of the Editorial Board and their names and expertise are published on the Parasitology website. (The names of all of the Referees used each year are published in the journal.) The Editor detailed to process a manuscript will make the final decision although he or she might ask for advice from another Editor. An Editor who submits a manuscript to the journal takes no part in the refereeing process and has no access to the names of the referees involved.

Manuscripts are submitted electronically to Parasitology, allowing authors to benefit from faster review and quicker online publication. Authors should submit their manuscripts online to <http://mc.manuscriptcentral.com/par>. All enquiries should be directed to Professor Stephen Phillips by E-mail: [Stephen.Phillips@glasgow.ac.uk](mailto:Stephen.Phillips@glasgow.ac.uk).

Authors must follow these Instructions for Authors and should refer to a recent issue of Parasitology for the correct style. Authors of Reviews must follow these instructions with major headings in UPPER CASE and secondary headings in lower case italics.

The preferred word processing packages are Word or WordPerfect in either PC or Macintosh format. Please note: This journal does not accept Microsoft Word 2007 documents at this time. Please use Word's 'Save As' option to save your document as an older (.doc) file type.

Submission of a manuscript implies that it has been approved in its final form by all the named authors, that it reports on unpublished work and that it has not been published or submitted for publication, in whole or in part, elsewhere. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that these conditions are fulfilled. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved), and a copyright assignment form must be completed on acceptance of the paper. On acceptance the corresponding author will be asked to supply a final version of the manuscript. Once a proof has been returned only minor changes will be allowed. Authors should be aware that large numbers of changes may lead to the paper being returned to reviewers for approval, delaying publication, in addition to incurring costs associated with making the changes.

### Manuscript Format

Please note that failure to follow the Instructions for Authors will almost certainly result in the manuscript being returned to the author for correct formatting before it is sent out to the referees and hence there will be an unavoidable delay in the processing of your manuscript.

The manuscript should be organized as follows:

**TITLE PAGE.** The title page should contain (i) a concise and informative full title, (ii) the initials and name(s) of the authors and family names, (iii) the full postal address(es) of the institution(s) where the work was carried out, (iv) a short informative running title and (v) the name and address, telephone and fax numbers, and E-mail address of the corresponding author. Footnotes containing other addresses may be included. Nothing else should appear on the title page.

**SUMMARY.** This should not be more than about 150-200 words and its purpose is to summarize the main aims, results and conclusions in such a way that they could be understood by any interested reader and not only experts in the subject, and could be used by an abstracting journal. References to published or unpublished work and unnecessary abbreviations should be avoided. Appended to the Summary should be 3-10 relevant key words, suitable for indexing. Nothing else should appear on the Summary page.

**KEY FINDINGS** (only necessary for original articles not special issue articles). Distil the key results and/or conclusions of the study into 3 to 5 short bullet points of less than 90 characters each. These key points will give the editor and referees an immediate overview of the paper and an insight into the importance of your findings.

**INTRODUCTION.** This should be as short as possible, normally not more than 2-3 paragraphs, and should simply serve to introduce the reader to the purpose and significance of the work described. It should neither be a mini-review nor should it be so bland as to be uninformative. When making general statements, reference should be made to recent reviews, and specific references should be cited only if they are particularly relevant.

**MATERIALS AND METHODS.** Sufficient information for the reader to be able to repeat the work must be given, but techniques described in detail in other publications need not be repeated, provided that an adequate reference is cited. Major modifications to methods should be clearly described. The numbers of experiments, replicates, etc. and any statistical tests used should be stated.

The full binomial name should be given for all organisms, except those such as mice, rats and rabbits, commonly used in laboratories and domesticated animals such as cows, dogs and cats. Generic names should be given in full when first mentioned and subsequently if any confusion is likely to arise. If reference is made to an uncommon taxon the authority for the taxon and date should be stated. Abbreviations such as An. (for *Anopheles*) should be avoided unless absolutely essential, for example when referring to two or more generic names beginning with the same letter. Authors should follow International Rules for Nomenclature and, if new names are introduced, the International Code for Zoological Nomenclature. All strains and sources of hosts and parasites should be stated.

Abbreviations should be used sparingly and unambiguously. SI units should be used wherever appropriate and other standard statistical, chemical, biochemical and molecular abbreviations may also be used. In case of any doubt, authors are advised to spell out the term in full, followed by the abbreviation in parenthesis, when it is first used.

**RESULTS.** These should be confined to a factual account of the actual results obtained. Where necessary results should be analysed using an appropriate statistical test. Discussion and reference to other work should be left to the Discussion.

**Tables.** Each table, headed by a self-explanatory title, must be double spaced on a separate page and numbered consecutively. Rules, particularly vertical ones, should be avoided. Each table should be referred to consecutively as Table 1 etc in the text. The use of bold and italic text should be avoided unless absolutely necessary.

**Figures.** These may be line drawings or photographs and all should be referred to consecutively in the text as Fig. 1 etc. Component parts of figures should be labelled A, B, C etc. Legends for figures should be self-explanatory and must not contain details of results.

Line drawings should not be larger than twice the final size and in no circumstances should exceed 170 x 250 mm. Line drawings should be as simple as possible, lines should be bold enough to stand reduction to about 0.25-0.35 mm. Preferred symbols are open and filled circles, squares and triangles, and these should be used consistently. Lettering should be kept to a minimum and should be self-explanatory and unambiguous and of sufficiently high quality and size to be clearly visible after reduction to final size.

Photographs should be the same size as they will appear in the journal and should be selected to fit neatly into one column (80 mm) or two columns (166 mm). Photographs should be labelled and numbered as for line drawings. For microscopical preparations,

scale bars with appropriate units (e.g. 50µm) must be provided; statements of magnification are not acceptable.

Colour figures may be accepted provided that they are of a very high quality and scientifically necessary. The final decision for use of colour will be at the discretion of the Editors. Charges of £350 per page may apply. If colour figures are accepted, but are not deemed to be necessary for the print version, or funds are not available, we are able to publish articles in colour for the online version of the journal. In these instances two versions of the figures should be submitted (i.e., one set in colour and one set in black and white), ensuring that the figure legends provided are able to accurately describe the qualities of both.

**DISCUSSION.** The results (including further reference to figures and tables) should neither be repeated in detail nor should new information be introduced. Speculation is encouraged but should not go beyond reasonable and testable hypotheses. The Discussion should not attempt to be a mini-review.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** You may acknowledge individuals or organisations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

**FINANCIAL SUPPORT.** Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, “This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXX)”. Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with “and before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors’ initials. For example, “This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH). Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement “This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors.”

**REFERENCES.** It is essential that the appropriate reference format for Parasitology is adhered to precisely.

(i) References in the text.

References should be kept to an essential minimum. Only references to published work or work actually 'in Press' are permitted. Reference to unpublished work is acceptable but only as either 'unpublished results' or 'personal communication' and under no circumstances should references to unpublished work, work in preparation or un-refereed abstracts be included in the Reference List.

Lists of text references should be arranged in ascending date order and then alphabetically, please note the first line of references is no longer indented. e.g.:

Brown and Green, 1961; Black, 1995, 2011; Brown, 1995; Brown et al. 2001, 2002a,b, 2010

For papers with more than two authors et al. should be used. Brown, A. et al. (1992a)

When authors are not directly referred to the reference should be in parentheses as follows:

All currently known COI sequences of *G. salaris* from rainbow trout (Hansen et al. 2003; Meinilä et al. 2004) are haplotype F.

## (ii) List of References

References, which must be double spaced and listed alphabetically, should begin on a separate page following the Discussion and Acknowledgements. The accuracy and appropriateness of the references are solely the responsibility of the author and are not checked in the editorial office.

The format required by this journal is given below and, if in any doubt, authors should refer to a recent copy of the journal. Please note that the names of all authors should be given in bold font and that the journal name should be italicized and given in full, not abbreviated. Where known, the article Digital Object Identifier (doi) should be included, at the end of the entry (see example below).

### Journal References

Higgs, S., Snow, K. and Gould, E. A. (2003). The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 82-87. doi: 10.1016/S00359203(03)00004-X.

### Books

Smyth, J. D. (1994). *Introduction to Animal Parasitology*, 3rd Edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

### Chapters in Books

Grenfell, B. T., Dietz, K. and Roberts, M. G. (1995). Modelling the immuno-epidemiology of macroparasites in naturally-fluctuating host populations. In *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations* (ed. Grenfell, B. T. and Dobson, A. P.), pp. 362-383. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

### WHO publications

World Health Organization (1995). *Onchocerciasis and its Control*. WHO Technical Report Series No. 852. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

### When referencing Parasitology Supplements

Jenkins, D. J. and MacPherson, C. N. L. (2003). Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology* 127 (Suppl.), S63-S72. doi: 10.1017/S0031182003003871.

REVIEWS AND SPECIAL ISSUES: The headings\* for papers should be as follows:

Title page as described above

Summary (and key words)

Introduction

Additional headings and sub-headings as appropriate to each paper

Discussion

Conclusions/Future directions

Acknowledgements

Financial support

References

\*Headings (not in bold) are formatted as follows: primary - UPPER CASE; secondary sub-heading - lower case italics on separate line; tertiary sub-heading - lower case italics running on

ETHICAL AND REGULATORY GUIDELINES: policy on animal (vertebrates and higher invertebrates) use:

The authors must demonstrate the experimental procedures employed conform to the accepted principles of animal welfare in experimental science. The principles defined and explained in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and its appendix and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals should be followed. A statement acknowledging conformation to these standards and that the authors have involved the minimum number of animals to produce statistically reproducible results must be included in the covering letter to the Editor-in-Chief as well as in the 'Materials and Methods' section of the manuscript. If experimental methodology raises particular ethical or welfare concerns then the Editor will take additional guidance from Animals (Scientific Procedures) Act 1986, when making decisions. The Editor's decision with regard to ethics will be final.

### On Acceptance

On acceptance to the journal the final version of the manuscript containing the following should be submitted: Title Page, Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure legends.

In particular, each table should occupy a separate page.

Please ensure that your figures are submitted separately at final publication size (one column, 80mm) or two-column (166 mm) and are in the recommended file formats. Following these guidelines will result in high quality images being reproduced in both the print and the online versions of the journal. Please do not submit the final versions of figures in MS WORD, .jpeg or Powerpoint (.ppt) format.

Line artwork

Format: .tif or .eps  
Colour mode: black and white (also known as 1-bit)  
Resolution: 1000 dpi  
Combination artwork (line/tone)  
Format: .tif or .eps  
Colour mode: greyscale (also known as 8-bit)  
Resolution: 600 dpi  
Black and white halftone artwork  
Format: .tif  
Colour mode: greyscale (also known as 8-bit)  
Resolution: 300 dpi  
Colour halftone artwork  
Format: .tif  
Colour mode: CMYK colour  
Resolution: 300 dpi

For further information, please refer to the Cambridge Journals Artwork Guide, which can be found online at <http://journals.cambridge.org/artworkguide>.

#### Proofs

Page proofs will be forwarded as PDF files by E-mail to the corresponding author. It is the responsibility of the author to ensure that no errors are present. Only essential corrections should be made and authors will be charged for excessive alterations at the proof stage. If corrections are deemed to be substantial the paper will be rejected and the author asked to resubmit their work for peer review.

(Revised 11/01/13)