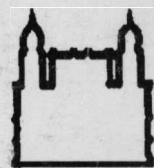




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DA SALIVA
DE *L. longipalpis* UTILIZANDO O MODELO DO BOLSÃO
INFLAMATÓRIO**

CLARISSA ROMERO TEIXEIRA

Salvador - Bahia - Brasil

2006



001661

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DA SALIVA
DE *L. longipalpis* UTILIZANDO O MODELO DO BOLSÃO
INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada ao Curso de pós-
graduação em Patologia para a
obtenção do grau de Doutor.

CLARISSA ROMERO TEIXEIRA

ORIENTADOR: Dr. MANOEL BARRAL-NETTO

Salvador - Bahia - Brasil
2006

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Teixeira, Clarissa Romero
T266a Avaliação da atividade inflamatória da saliva de *L. longipalpis* utilizando o modelo do bolsão inflamatório [manuscrito] / Clarissa Romero Teixeira. - 2006.
84 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barral-Netto. Laboratório de

1. Flebótomo 2. Saliva 3. Leishmaniose. 4. Inflamação. Quimiocinas. I. Título.

CDU 595.77:591.131.3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DA SALIVA DE *L. longipalpis* UTILIZANDO O MODELO DO BOLSÃO INFLAMATÓRIO.

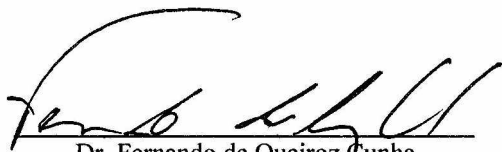
CLARISSA ROMERO TEIXEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

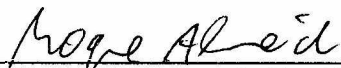
COMISSÃO EXAMINADORA



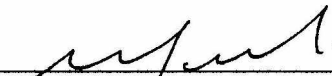
Dr. George Alexandre dos Reis
Professor Titular
UFRJ



Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Professor Titular
USP



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Pesquisador Titular
HUPES



Dr. José Orivaldo Mengele Junior
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Manoel Barral Netto
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Dr. Manoel Barral-Netto

Pela orientação, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Cláudia Brodskyn

Pela orientação, apoio e sugestões valiosas para realização deste trabalho.

Dra. Aldina Barral

Pela incentivo e apoio no dia-a-dia do laboratório.

Dra. Camila Indiani de Oliveira

Pelo incentivo e amizade durante todos estes anos.

Dr. Jesus Valenzuela (NIH - EUA)

Pela colaboração e disponibilização das proteínas recombinantes e construções de cDNA.

Dr. João Santana da Silva (Ribeirão Preto - USP)

Pela colaboração valiosa que permitiu a realização de parte deste trabalho.

Dr. Angelo Guglielmotti (Angelini Farmaceutici, ACRAF SpA - Itália)

Pelas sugestões e fornecimento do bindarit utilizado neste trabalho.

Regis Gomes

Pelo companheirismo, incentivo e amizade em todos os momentos.

Maria Jania Teixeira

Pela amizade inestimável, colaboração e incentivo.

José Carlos Miranda, Edivaldo Passos, Joíza Brizon

Pela apoio no fornecimento de glândulas e realização dos experimentos.

Bruno Bezerril Andrade, Claire Santos, Camila Góes e Imbroinise Raffaele-Netto (LIMI)

Tatiana Moura, Deboraci Prates e Dirceu Costa (LIP)

Pela amizade e apoio na realização de vários experimentos importantes para este trabalho.

Cecília Favali e Sandra Gadelha

Pela eterna e inestimável amizade.

Vera Vinhas e Jorge Clarêncio

Pela amizade e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Jackson Lemos, Elze Leite, Camila Mota e José Carlos Andrade Cardoso

Pela eficiência nos trabalhos da Secretaria do LIMI/LIP

Aos demais amigos e companheiros do LIM/LIP: **Sílvia Andrade Cardoso** (*in memoriam*), **Jorge Lessa Tolentino**, **Jackson Costa**, **Johan Van Weyenberg**, **Theolis Barbosa**, **Lourdes Farré**, **Valéria Borges**, **Gyselle Baccan**, **Andréa Bomura Rosato**, **Lucas Nogueira**, **Robson Amaro**, **Maria José Menezes**, **André Báfica**, **Fabiano Oliveira**, **Sebastião Neto**, **João Paulo de Oliveira**, **Ricardo Khouri**, **Viviane Boaventura**, **Manoel Medeiros**, **Fernanda Novais**, **Ana Cristina Bahia**, **Ana Paula de Souza**, **Lilian Afonso**, **Gilvanéia Santos**, **Gisélia Santana**, **Daniele Decanine**, **George Santana**, **Adriana Almeida**, **Aline Báfica**, **Aline Clara**, **Natália Tavares** e **Sarah Falcão**.

Rosália Meire, Iumara Evangelista e Lana Abreu

Pela e apoio e eficiência nos trabalhos da secretaria do Curso de Pós-graduação em Patologia

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ.

Pelo suporte nos trabalhos da biblioteca.

Todos os funcionários do Biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo apoio no fornecimento e cuidados com os animais do Biotério.

Todos os professores, colegas e funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo incentivo, disponibilidade e colaborações durante todos estes anos.

Toda minha família (Carlos Augusto, Eliana, Ivan e Luis)

Por todo o carinho e apoio que estas pessoas tão especiais me deram sempre.

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq e FIOCRUZ

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Leishmaniose.....	01
1.2. Mecanismos de resistência e suscetibilidade na LV experimental.....	02
1.3. A saliva dos flebotomíneos na alimentação sanguínea.....	04
1.4. Atividade imunomodulatória sa saliva.....	05
1.5. A saliva dos flebotomíneos na infecção pela Leishmania.....	06
1.6. Resposta imune do hospedeiro contra a saliva do vetor.....	07
1.7. Quimiocinas e seus receptores.....	09
1.8. Quimiocinas e a resposta inflamatória na leishmaniose.....	11
1.9. Modelo do bolsão de ar.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 HIPÓTESE.....	18
4 OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivo Geral.....	18
4.2. Objetivos Específicos.....	18
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1. Animais.....	19

5.2. Parasita.....	19
5.3. Obtenção e preparo do SGH de <i>L. longipalpis</i>	19
5.4. Modelo do Bolsão de Ar.....	20
5.5. Western Blot.....	20
5.6. ELISA para detecção de IgG anti-SGH de <i>L. longipalpis</i>	21
5.7. Isolamento de RNA e RT-PCR.....	21
5.8. Detecção de mRNA para quimiocinas.....	22
5.9. Cultura de macrófagos J774.....	23
5.10. Imunohistoquímica.....	24
5.11. Tratamento com bindarit e anticorpo monoclonal anti-CCL2/MCP-1.....	24
5.12. Obtenção de soro anti-SGH de <i>L. longipalpis</i>	25
5.13. Imunização com saliva de <i>L. longipalpis</i>	25
5.14. Imunização com os plasmídeos de cDNA da saliva de <i>L. longipalpis</i>	25
5.15. Construção dos plasmídeos de cDNA e descrição do vetor VR2001-TOPO.....	26
5.16. Expressão das proteínas recombinantes de <i>L. longipalpis in vitro</i>	27
5.17. Análise estatística.....	28
6 RESULTADOS.....	29
6.1. Efeito da saliva de <i>L. longipalpis</i> no recrutamento celular <i>in vivo</i>	29
6.2. Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas induzido pelo SGH.....	33
6.3. Avaliação da produção de CCL2/MCP-1 <i>in vitro</i>	37
6.4. Inibição de CCL2/MCP-1.....	39
6.5. Inibição do recrutamento com soro anti-SGH.....	41
6.6. Inibição do recrutamento induzido pelo SGH por anticorpos anti-SGH naturalmente induzidos.....	43

6.7. A atividade inflamatória do SGH de <i>L. longipalpis</i> é mediado por componente protéico.....	45
6.8. Avaliação da imunização com construções de cDNA da saliva de <i>L. longipalpis</i> na neutralização do efeito do SGH.....	46
6.9. Avaliação do papel das construções de cDNA da saliva de <i>L. longipalpis</i> no recrutamento celular <i>in vivo</i>	50
6.10. Avaliação do papel das proteínas recombinantes da saliva de <i>L. longipalpis</i> no recrutamento celular <i>in vivo</i>	53
6.11. Efeito do SGH no recrutamento celular induzido pela <i>L. chagasi in vivo</i>	56
6.12. Avaliação da expressão de quimiocinas induzido pela <i>L. chagasi</i> na presença do SGH.....	59
7 DISCUSSÃO.....	62
8 CONCLUSÕES.....	73
9 BIBLIOGRAFIA.....	74
10 ANEXOS.....	89
10.1. Anexo I: Saliva from <i>Lutzomyia longipalpis</i> induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment.....	89
10.2. Anexo II: Influência da saliva dos flebotomíneos na leishmaniose experimental e humana.....	90
10.3. Anexo III: Haematophagus arthropod saliva and host defense system a tale of tear and blood.....	91
10.4. Anexo IV: Chemokines in host parasite interactions in leishmaniasis.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Efeitos da saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> no hospedeiro vertebrado.....	16
Figura 2	Infiltração leucocitária em camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com o SGH de <i>L. longipalpis</i>	30
Figura 3	Expressão de quimiocinas induzido pelo SGH.....	34
Figura 4	Produção de CCL2/MCP-1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	37
Figura 5	Inibição de CCL-2/MCP-1.....	39
Figura 6	Inibição específica do recrutamento de macrófagos após estimulação com SGH.....	42
Figura 7	Inibição do efeito do SGH <i>in vivo</i> em camundongos BALB/c sensibilizados pela exposição a picadas de <i>L. longipalpis</i>	43
Figura 8	Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c estimulado com SGH previamente tratado com Proteinase K.....	45
Figura 9	Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c imunizados com construções de cDNA da saliva de <i>L. longipalpis</i>	47
Figura 10	Infiltração leucocitária no bolsão de ar em camundongos BALB/c estimulados com construções de cDNA da saliva de <i>L. longipalpis</i>	51
Figura 11	Infiltração leucocitária no bolsão de ar em camundongos BALB/c estimulados com proteínas recombinantes da saliva de <i>L. longipalpis</i> ..	54
Figura 12	Efeito do SGH no recrutamento induzido pela <i>Leishmania chagasi</i> em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	57
Figura 13	Expressão de quimiocinas induzido pelo SGH e <i>L. chagasi</i>	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos primers e tamanho dos produtos do PCR.....	23
-----------------	---	-----------

RESUMO

Avaliação da atividade inflamatória da saliva de *L. longipalpis* utilizando o modelo do bolsão inflamatório. CLARISSA ROMERO TEIXEIRA. A saliva do vetor flebotômico contém uma grande variedade de moléculas que modulam a resposta hemostática, imune e inflamatória do hospedeiro influenciando o estabelecimento do parasita. Neste trabalho, utilizamos o modelo do bolsão de ar em camundongos BALB/c e C57BL/6 com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória induzida pelo homogeneizado de glândula salivar (SGH) de *Lutzomyia longipalpis*. Em nossos resultados, foi possível observar uma cinética diferente de recrutamento celular entre as duas linhagens. Enquanto em BALB/c ocorreu o recrutamento significativo de macrófagos e eosinófilos após doze horas, apenas neutrófilos foram recrutados em C57BL/6. Analisando as quimiocinas que poderiam estar envolvidas neste recrutamento diferenciado, detectamos um aumento na expressão de CCL2/MCP-1 induzido em BALB/c mas não em C57BL/6. Este dado foi confirmado quando camundongos BALB/c foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CCL2/MCP-1 ou bindarit, uma droga que inibe a síntese de CCL2/MCP-1. Estes tratamentos induziram uma redução no recrutamento de macrófagos, e na expressão de CCL2/MCP-1. A produção de CCL2/MCP-1 também foi observada *in vitro* quando macrófagos J774 foram expostos ao SGH. O efeito do SGH também foi neutralizado após pré-incubação com soro contendo anticorpos anti-SGH e também em camundongos pré-expostos a picadas de *L. longipalpis*. Com o objetivo de avaliar qual(is) molécula(s) da saliva estariam envolvidas neste efeito, utilizamos construções de cDNA e proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* como estímulo. Observamos que a proteína recombinante de 11kDa da saliva de *L. longipalpis*, assim como o seu cDNA, parece ter uma atividade inflamatória mais inicial. As proteínas recombinantes da família “yellow” e de 61kDa e os cDNA equivalentes a estas proteínas teriam um efeito mais tardio. A combinação do SGH com a *L. chagasi* resultou em um efeito aditivo no recrutamento de neutrófilos e macrófagos quando comparado à resposta inflamatória induzida apenas pela *L. chagasi* nas duas linhagens. O SGH também modificou o perfil de expressão de CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL11/eotaxina e CXCL1/KC induzida pelo parasita nas duas linhagens de camundongo. Estes resultados sugerem que a saliva de *L. longipalpis* desempenharia papel importante na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro induzida pelo parasita resultando no recrutamento de uma maior quantidade de células inflamatórias para o local da picada.

Palavras-chave: flebótomo, saliva, leishmaniose, inflamação, quimiocinas.

ABSTRACT

Evaluation of the inflammatory activity from *L. longipalpis* saliva in the air pouch model.
CLARISSA ROMERO TEIXEIRA. Saliva of blood feeding arthropods contains a great variety of hemostatic, inflammatory and immunomodulatory molecules and has been incriminated in facilitating the establishment of the parasite in their host. We report on the leukocyte chemoattractive effect of salivary gland homogenate (SGH) from *Lutzomyia longipalpis* using an air pouch model in BALB/c and C57BL/6 mice. We were able to observe a different kinetics of cell recruitment between the two mouse strains. While SGH induced a significant increase in macrophage and eosinophil influx in BALB/c mice after twelve hours, only neutrophils were observed in the C57BL/6 exudate. Analyzing the expression of chemokines responsible for this differentiated effect, we observed an increased expression of CCL2/MCP-1 in BALB/c but not in C57BL/6 mice. In fact, treatment with Bindarit, an inhibitor of CCL2/MCP-1 synthesis, and also with a specific anti-MCP-1 mAb resulted in a drastic reduction of macrophage recruitment and inhibition of CCL2/MCP-1 expression in the lining tissue. CCL2/MCP-1 production was also seen *in vitro* when J774 murine macrophages were exposed to SGH. The SGH effect was abrogated by pre-incubation with serum containing anti-SGH IgG antibodies as well as in mice previously sensitized with *L. longipalpis* bites. To investigate which salivary molecules were responsible for this effect, we stimulated the air pouch using cDNA constructions and protein recombinants from *L. longipalpis* saliva. We observed that the 11kDa recombinant and its cDNA, induced an early inflammatory response, while recombinants and cDNA from the yellow family and 61kDa protein induced a late response. The combination SGH with *L. chagasi* resulted in no additive effect on leukocyte recruitment when compared to *L. chagasi* alone in both mouse strains. SGH also modified CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL11/eotaxin and CXCL1/KC expression induced by the parasite in both mouse strains. These results suggest that *L. longipalpis* saliva plays an important role in modulating host's inflammatory response induced by the parasite recruiting more inflammatory cells to the site of inoculation.

Key words: sand fly, saliva, leishmaniasis, inflammation, chemokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CD	“Cell Differentiation Molecule”
cDNA	Ácido dexoribonucleico complementar
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GRO	“Growth-regulated oncogene”
HLA	Antígeno do leucócito humano
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP-10	“Interferon-inducible protein-10”
KC	“Keratinocyte chemokine”
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Leishmaniose difusa
LJL	<i>Lutzomyia jacobina</i> “large cDNA library”
LJM	<i>Lutzomyia jacobina</i> “medium cDNA library”
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídio
LV	Leishmaniose visceral
MCP	“Monocyte chemoattractant protein”
MDC	“Macrophage-derived chemokine”
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIG	“Monokine induced by interferon- γ ”
MIP	“Macrophage inflammatory protein”
NK	“Natural Killer”
NO	Óxido nítrico
PGE2	Prostaglandina E 2

RANTES	“Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted”
RHT	Reação de hipersensibilidade tardia
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	“Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction”
SGH	Homogeneizado de glândula salivar
TGF	Fator transformador do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1. A LEISHMANIOSE

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma promastigota flagelada e extracelular, encontrada no trato digestivo do vetor, flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (LAINSON et al., 1987); e a forma amastigota e intracelular parasitando células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos onde multiplicam-se por divisão binária. A transmissão do parasita ocorre quando a fêmea do vetor flebotomíneo infectado, ao realizar seu repasto sangüíneo, pica um determinado hospedeiro mamífero e inocula junto com a saliva as formas promastigotas infectantes (ALEXANDER et al., 1999).

A leishmaniose exibe manifestações clínicas diversas envolvendo o tegumento como na forma cutânea (LC), mucocutânea (LMC) ou difusa (LD) à uma forma visceral (LV) potencialmente fatal (PEARSON et al., 2000). Encontra-se presente em todos os continentes, com exceção da Oceania, sendo endêmica em 88 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia. Por muitos anos, o impacto das leishmanioses na saúde pública tem sido grosseiramente subestimado em parte devido à falha no registro de casos que é obrigatório em apenas 32 dos países afetados. Estima-se que mundialmente 350 milhões de pessoas correm risco de infecção, cerca de 12 milhões apresentam alguma forma da doença e aproximadamente 1,5-2 milhões de novos casos de leishmaniose surgem por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

No Brasil, os vetores responsáveis pela transmissão da *L. (L.) chagasi* ao homem são as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que a *L. longipalpis* é a principal espécie transmissora (BADARÓ et al., 1986; EVANS et al., 1992). A LV apresenta uma média anual de 3.156 casos distribuídos em 17 estados principalmente pelo Nordeste com 66% deles ocorrendo nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (COSTA et al., 2005). Os casos de LV podem ser encontrados na área rural e peri-urbana atingindo áreas urbanas nos últimos anos. É um problema crescente de saúde pública no

país, com uma média anual de casos de 3.156 caso, incidência de dois casos/100.000 habitantes e letalidade em torno de 10% nos últimos dez anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A situação crítica em que a leishmaniose ainda se encontra, além do tratamento problemático e ausência de vacina eficaz tem incentivado a busca por novos candidatos ao controle da doença. Nos últimos anos, a saliva do vetor e seus componentes têm despertado interesse como novo alvo em potencial para o controle da transmissão do patógeno através do desenvolvimento de novos candidatos a vacina.

1.2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E SUSCETIBILIDADE NA LV EXPERIMENTAL

O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da leishmaniose permitiram a obtenção de evidências sobre os mecanismos envolvidos na resistência ou suscetibilidade a infecção pela *Leishmania*.

Na LC, por exemplo, a resistência a infecção pela *L. major* no modelo murino foi associado a capacidade de linfócitos T CD4+ em gerar IFN- γ que ativa os macrófagos parasitados resultando na eliminação dos parasitas intracelulares (HEINZEL et al., 1989 e 1991). Por outro lado, na LV, o modelo murino não reflete os aspectos da infecção ativa na LV humana. Camundongos considerados suscetíveis (BALB/c, C57BL/10) apresentam no início da infecção por *L. donovani* aumento da carga parasitária que é controlada numa fase tardia. Este controle é mediado pela produção de IFN- γ produzido por células T esplênicas de camundongos BALB/c com a participação de células CD4+ e CD8+ (BARBOSA et al., 1987; MURRAY et al., 1982; STERN et al., 1988). A formação de granulomas hepáticos, geração de óxido nítrico (NO) e TNF- α também são responsáveis pelo controle parasitário nestes animais numa fase tardia da infecção (SQUIRES et al., 1989; TUMANG et al., 1994). A incapacidade de controlar a replicação por *L. donovani* no curso inicial da infecção em BALB/c está associada à diminuição da capacidade das células esplênicas produzirem IFN- γ *in vitro*, mas não IL-4 ou IL-5 (KAYE et al., 1991). Com o desenvolvimento da infecção, entretanto, a capacidade de produzir IFN- γ contra o parasita é recuperada (MELBY et al., 2001). A IL-12, citocina

que estimula células T e NK a produzirem IFN- γ , também desempenha um papel importante no controle da infecção neste modelo (TRINCHIERI, 1993; ENGWERDA et al., 1998; MURRAY, 1997). Os camundongos resistentes, como o CBA, são capazes de controlar a infecção pela *L. donovani* pelo desenvolvimento de uma resposta celular específica mediada por linfócitos T CD4+ e também por T CD8+. A produção endógena de IFN- γ e TNF- α , a formação de granulomas hepáticos (KAYE et al., 1991; SQUIRES et al., 1989). Experimentos de re-infecção em animais que controlaram a infecção mostram que o fígado se torna resistente ao desafio, enquanto o baço não controla a infecção, sugerindo a existência de resposta imune órgão-específica (MURRAY et al., 1992; ROUSSEAU et al., 2001).

Apesar do extenso uso do camundongo em estudos para LV, este modelo não reproduz as características da LV no homem. Uma das principais conseqüências da LV humana ativa é a supressão da resposta imune celular, acompanhada de uma intensa replicação parasitária no fígado, baço e medula óssea. Por outro lado, em áreas endêmicas, um grande número de indivíduos adquire a infecção subclínica, associada ao desenvolvimento de uma resposta celular antígeno específica, acompanhada da produção de IFN- γ que os torna resistentes à infecção (CARVALHO et al., 1981 e 1985; BADARÓ et al., 1986). O camundongo, mesmo as linhagens consideradas suscetíveis, controlam a infecção por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. Devido a estas limitações, o modelo murino de LV é considerado um bom modelo apenas para a avliação dos mecanismos que levam a replicação inicial do parasita e infecção sub-clínica. Estas características, no entanto, não o qualificam para estudos da progressão da doença como observada na LV humana ativa. As características clinicopatológicas da infecção do hamster com *L. donovani* resulta no crescimento lento da carga parasitária, caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e supressão da resposta de células T a antígenos de *Leishmania* (PEARSON et al., 1990). Neste aspecto, o hamster tem sido caracterizado como um modelo de suscetibilidade para LV que apresenta características semelhantes a doença ativa no homem.

1.3. A SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS NA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA

Os flebotomíneos, assim como os demais artrópodes hematófagos, necessitam da alimentação sanguínea para sobrevivência e maturação de seus ovos. A obtenção de sangue pelo vetor flebotomíneo tem como maior desafio enfrentar as barreiras impostas pelo hospedeiro. Os animais vertebrados desenvolveram mecanismos eficientes de hemostasia para evitar a perda de sangue provocada por lesão vascular: agregação plaquetária, coagulação sanguínea e vasoconstricção. Como os flebotomíneos possuem peça bucal muito curta, são incapazes de penetrar nas camadas mais profundas da pele. Eles provocam a laceração dos capilares superficiais para que ocorra a ingestão do sangue (ADLER et al., 1926; LEWIS et al., 1975).

Para garantir o acesso ao alimento sanguíneo, a saliva inoculada no local da picada possui uma grande diversidade de substâncias farmacologicamente ativas com atividade vasodilatadora, anti-agregante plaquetária e anti-coagulante permitindo a formação de um “lago sanguíneo” (RIBEIRO et al., 1987 e 1995; STARK et al., 1998). Algumas destas moléculas já foram descritas e caracterizadas como a apirase, uma ATP/ADPase que inibe a agregação plaquetária encontrada na saliva de *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Além da apirase, outros componentes como a prostaglandina E2 (PGE₂) e prostaciclina também bloqueiam a agregação plaquetária e promovem a dilatação vascular (VALENZUELA et al., 2001). Existe uma certa diversidade nas moléculas com atividade anti-hemostática em flebotomíneos da mesma família. Enquanto os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* possuem AMP e proteína fosfatases com atividade (PP)-1/2A, a saliva de *L. longipalpis* possui níveis significantes de atividade (PP)-1/2A, mas não de AMP e adenosina (KATZ et al., 2000). Por outro lado, uma atividade tipo 5'-nucleotidase foi demonstrada em *L. longipalpis* mas não em *P. papatasi* (CHARLAB et al., 1999). Dentre as substâncias vasodilatadoras, os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* possuem adenosina como vasodilatador enquanto o gênero *Lutzomyia* possui o maxadilan (peptídeo de aproximadamente 7kDa), caracterizado como um potente vasodilatador responsável pelo eritema observado no local da picada logo após a alimentação sanguínea (LERNER et al., 1991). O maxadilan também apresenta uma

grande variação antigênica dentro da mesma espécie de flebotomíneos (LANZARO et al., 1999).

A composição complexa da saliva, e o efeito combinado destes componentes que possuem atividade anti-hemostática, vasodilatadora e anti-coagulante são essenciais para sobrevivência e adaptação destes artrópodes hematófagos permitindo a obtenção de sangue como alimento.

1.4. ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DA SALIVA

A saliva também exerce um efeito direto sobre a função de células do sistema imune individualmente (Figura 1). A saliva de *L. longipalpis* foi capaz de inibir a produção de IL-10 e TNF- α e elevar a produção de IL-6, IL-8 e IL-12p40 por monócitos e células dendríticas humanas estimuladas com LPS. A expressão de moléculas co-estimulatórias, importantes na ativação e manutenção da resposta de linfócitos T também foi alterada em monócitos (elevação de CD86 e HLA-DR) e macrófagos (redução de CD80 e elevação de HLA-DR). A redução na expressão destas moléculas também foi observada na diferenciação de células dendríticas e na maturação induzida por CD40L (COSTA et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que a cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c incubadas com a saliva de *P. papatasi*, *P. sergenti* ou *L. longipalpis* reduziu a proliferação de linfócitos induzida por concanavalina A, assim como a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-4. Embora a saliva destas três espécies tenha sido capaz de induzir alterações na resposta linfocitária e na produção de citocinas a intensidade da atividade imunomodulatória foi diferente para as três espécies (ROHOUSOVÁ et al., 2005).

A saliva dos flebotomíneos também é capaz de induzir um processo inflamatório inicial no hospedeiro, levando ao recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Recentemente, foi demonstrado um intenso infiltrado inflamatório no local da picada em camundongos BALB/c expostos a repetidas picadas de *L. longipalpis*. A inoculação de soro proveniente destes animais picados por *L. longipalpis* e previamente incubado com SGH do mesmo vetor provocou uma resposta inflamatória inicial com a presença quase

que exclusiva de neutrófilos, sugerindo a participação de imunocomplexos em gerar uma resposta inflamatória (SILVA et al., 2005). Esta atividade pró-inflamatória da saliva também já havia sido observada na saliva de *P. duboscqi*, *L. longipalpis* e *P. papatasi* onde o recrutamento de macrófagos resultou em benefício para a *Leishmania* (ANJILI et al., 1995; ZER et al., 2001). O recrutamento celular inicial é um fator importante no estabelecimento da infecção por *Leishmania*, já que a composição celular resultante poderá facilitar ou dificultar o crescimento do parasita no interior destas células.

1.5. A SALIVA DE FLEBOTOMÍNEOS NA INFECÇÃO PELA *Leishmania*

Durante o processo de alimentação do flebotomíneo, a *Leishmania* também é inoculada na derme junto com a saliva. A modificação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro pela saliva favorece também o parasita, desempenhando papel relevante no estabelecimento da infecção. Em modelos experimentais já foi demonstrado que a co-inoculação do homogeneizado de glândula salivar (SGH) de *L. longipalpis* com *Leishmania major* resultou em uma exacerbação significativa da lesão e da carga parasitária. Este efeito tornava-se ainda mais evidente quando baixos inóculos (10^1 a 10^2) do parasita eram utilizados na infecção (BELKAID et al., 1998; TITUS et al., 1988). Posteriormente foi demonstrado que o maxadilán co-inoculado com *L. major* levava a um aumento da lesão sugerindo que uma única molécula seria responsável pelo efeito exacerbador da lesão (MORRIS et al., 2001). A infecção pela *L. braziliensis*, que mesmo em camundongos suscetíveis termina em cura espontânea, na presença do SGH de *L. longipalpis* resultou na formação de lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos (LIMA et al., 1996; DONNELLY et al., 1998; SAMUELSON et al., 1991). A inoculação da saliva de *L. longipalpis* com *L. amazonensis* também levou a formação lesões maiores que se desenvolveram rapidamente com um número maior de parasitas na orelha de camundongos BALB/c (THIAKAKI et al., 2005).

1.6. RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO CONTRA A SALIVA DO VETOR

Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição do hospedeiro a saliva dos flebotomíneos resulta em uma resposta imune contra seus componentes. Esta resposta é ampla, abrangendo desde uma resposta humoral com a produção de anticorpos específicos, até uma resposta celular com a produção de uma reação de hipersensibilidade tardia (RHT). Em animais expostos a picadas de flebótomos ou inoculados com o SGH, ocorre o desenvolvimento de níveis elevados de anticorpos anti-saliva (BELKAID et al., 1998; GHOSH et al., 1998; BELKAID et al., 2000; VALENZUELA et al., 2001; VOLF et al., 2001). Camundongos BALB/c expostos a picadas de *L. longipalpis* produziram anticorpos anti-saliva com um predomínio de IgG, particularmente IgG1, mas não de IgG2a e IgG2b anti-saliva (MONTEIRO et al., 2005). A IgG total presente nestes animais reagiu predominantemente com três bandas protéicas presentes no SGH de *L. longipalpis* (16, 44 e 45 kDa). Recentemente foi demonstrado que camundongos expostos a picadas de *P. papatasi*, *P. sergenti* ou *L. longipalpis* produziram anticorpos específicos contra os antígenos únicos da saliva de cada vetor (THIAKAKI et al., 2005).

A produção de resposta imune contra a saliva também desempenha um papel importante na proteção contra a infecção pelo parasita. Diversos trabalhos têm demonstrado que ao mesmo tempo que a saliva dos flebotomíneos exacerba a infecção pela *Leishmania*, a pré-exposição a saliva ou a picadas de flebotomíneos não-infectados resulta em redução drástica da lesão a uma infecção subsequente (TITUS et al., 1988; BELKAID et al., 1998 e 2000). A pré-exposição de camundongos a picadas de *P. papatasi* ou inoculação do SGH deste mesmo vetor, foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major* (BELKAID et al., 1998 e 2000; VALENZUELA et al., 2001). Camundongos BALB/c imunizados com a saliva de *L. longipalpis* desenvolveram proteção parcial contra desafio com *L. amazonensis* e a saliva resultando em lesões menores que se desenvolveram lentamente (THIAKAKI et al., 2005). O exato papel destes anticorpos na exacerbação ou proteção à infecção por *Leishmania* ainda não está totalmente esclarecido. Em áreas endêmicas para leishmaniose, a exposição a picadas de flebótomos não-infectados pode influenciar a epidemiologia da doença. A presença de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* foi

detectada no soros de crianças que residem numa área endêmica para LV no Maranhão, e uma forte correlação foi encontrada entre altos níveis de anticorpos IgG anti-saliva e uma reação de hipersensibilidade tardia (RHT) anti-*Leishmania*, sugerindo que anticorpos anti-saliva de flebotomíneos no homem podem servir como marcadores importantes de exposição a vetores da leishmaniose nestas áreas (BARRAL et al., 2000). Posteriormente em outro trabalho nesta mesma área endêmica, crianças que tinham RHT anti-*Leishmania* positivo, e, portanto, estariam protegidos contra a infecção, desenvolveram uma resposta de anticorpos IgG anti-saliva de *L. longipalpis*. Por outro lado, crianças da mesma área que apresentavam somente resposta sorológica positiva para antígenos de *Leishmania* e RHT anti-*Leishmania* negativo apresentam baixos níveis de anticorpos anti-saliva. No soro dos indivíduos que converteram o RHT para *Leishmania*, foram detectados principalmente as subclasse IgG1 e IgE caracterizando uma resposta mista (Th1/Th2) que também tem sido descrita em indivíduos expostos a picadas de outros vetores. Os antígenos salivares reconhecidos pelos anticorpos anti-saliva presentes nos soros estava dispostos no grupo de proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 45, 44, 43, 35, 27 e 16 kDa (GOMES et al., 2002). Recentemente foi observada a presença de altos níveis de IgG anti-saliva de *P. sergenti* e *P. papatasi* em indivíduos residentes em uma área endêmica para *L. tropica* em Sanliurfa (Turquia). Neste estudo, indivíduos com lesões ativas causadas por *L. tropica* apresentavam níveis mais elevados de IgG anti-*P. sergenti* do que indivíduos saudáveis da mesma área, enquanto os níveis de IgG anti-*P. papatasi* foram semelhantes para ambos os grupos (ROHOUSOVÁ et al., 2005). A produção de anticorpos contra moléculas da saliva parece também dificultar a alimentação sanguínea do vetor em animais sensibilizados. O repasto sanguíneo de *P. argentipes* em hamsters imunizados com picadas deste mesmo vetor resultou em redução no percentual de ingestão sanguínea e aumento da mortalidade dos flebotomos a medida que os níveis de anticorpos anti-saliva aumentaram nestes animais (GHOSH et al., 1998).

Exposições repetidas à saliva do flebotomíneo, também levam ao desenvolvimento de imunidade celular no hospedeiro contra os produtos salivares, caracterizada por uma RHT com a presença de células inflamatórias recrutadas para o local da picada. O desenvolvimento de RHT também pode refletir uma adaptação do vetor à resposta imune do hospedeiro, já que o desenvolvimento deste tipo de resposta

facilita a alimentação do vetor devido a um aumento do fluxo sanguíneo no local da reação (BELKAID et al., 2000). Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento de uma RHT, é a proteção contra *Leishmania* que ela promove em animais que desenvolvem preferencialmente este tipo de resposta. Esta reação tornaria o local da picada em um ambiente inóspito para o estabelecimento da infecção pela *Leishmania*, ou modificaria o microambiente, contribuindo para o desenvolvimento dos eventos iniciais que iriam influenciar a resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania*. A importância do desenvolvimento de uma RHT na proteção contra a infecção foi evidenciada quando uma proteína de 15 kDa, isolada da saliva de *P. papatasi* (PpSP15), foi capaz de bloquear a transmissão da *L. major*. Animais imunizados com PpSP15 ou o plasmídeo contendo a sequência SP15, tornaram-se resistentes a um desafio posterior constituído do parasita mais saliva. Os animais imunizados apresentaram uma intensa resposta celular (RHT) e alta produção de anticorpos. Mesmo camundongos deficientes de células B, quando imunizados com o plasmídeo, mostraram proteção contra um desafio posterior, sugerindo que a resposta imune celular, caracterizada por RHT, recrutaria células inflamatórias para o sítio da infecção, como por exemplo, macrófagos ativados, que produziriam NO, radicais livres de oxigênio e IL-12 resultando em um ambiente inóspito para o estabelecimento da *Leishmania* (VALENZUELA et al., 2001).

Até o momento, o estudo da saliva em modelos experimentais ou *in vitro* tem esclarecido mecanismos importantes, que envolvem aspectos diversos da doença como a imunidade contra a *Leishmania* e o estabelecimento do parasita no hospedeiro que até então eram estudados apenas com relação ao parasita isoladamente. Estes novos aspectos também abrem novas perspectivas quanto a possíveis novos candidatos para a construção de uma vacina eficaz em combinação com antígenos do parasita (Anexo I).

1.7. QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

As quimiocinas constituem uma superfamília de proteínas com baixo peso molecular (8 a 17 kDa) responsáveis pelo controle da migração e ativação de leucócitos. Atualmente, as quimiocinas e moléculas de adesão são reconhecidas como os principais controladores da migração leucocitária (MOSER et al., 2004). As quimiocinas foram

originalmente isoladas e identificadas como citocinas capazes de atrair e recrutar seletivamente populações de leucócitos. Também desempenham funções que vão além do recrutamento de leucócitos. Têm participação essencial na organogênese, crescimento e metástase de células tumorais, na recirculação homeostática de leucócitos e na interação vírus e células hospedeiras (CHRISTOPHERSON II et al., 2001; ROSSI et al., 2000). Na sua maioria, são secretadas por uma variedade de células, incluindo leucócitos, células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e outros tipos celulares em resposta a vários estímulos exógenos e endógenos como citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos e diversos patógenos (MOSER et al., 2004).

As quimiocinas podem ser classificadas de acordo com a posição de resíduos de cisteína localizados na região N-terminal destas moléculas. São designadas, CC, CXC e CXXXC, onde o C representa o número de resíduos de cisteína e X representa outros aminoácidos. As famílias das CXC e CC quimiocinas englobam a maioria das quimiocinas. As quimiocinas CXC são divididas em duas sub-famílias: ELR, que possui uma seqüência de três aminoácidos (Glu-Leu-Arg) que precede as duas primeiras cisteínas da molécula, e não-ELR que não possui esta seqüência. A presença desta seqüência está relacionada a um efeito predominante sobre a atração de neutrófilos e a ausência desta seqüência está relacionada com a migração de linfócitos (BAGGIOLINI et al., 2001). As quimiocinas CC atraem principalmente monócitos e linfócitos T, apesar de serem também quimiotáticas para basófilos, eosinófilos e células NK. Dois outros grupos menores não fazem parte destas famílias, sendo designadas como família C e família CX3C (MACKAY et al., 1997; ROLLINS et al., 1997). A quimiocina XCL1/linfotactina, da família C, tem sido descrita como sendo quimiotática para subpopulações específicas de linfócitos B e T. A CX3CL1/Fractalcina, única quimiocina CX3C, tem potente atividade quimiotática para linfócitos T, células NK e monócitos (KENNEDY et al., 1995; BAZAN et al., 1997; HEDRICK et al., 1997).

As quimiocinas exercem suas funções pela ligação a receptores presentes na superfície das células. A mensagem transmitida pelas quimiocinas é decodificada por receptores que iniciam uma sinalização que irá resultar em múltiplas respostas celulares que envolvem quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos. Os 21 receptores de quimiocinas descritos pertencem à família de receptores que atravessam sete vezes a

membrana celular, com a porção intracelular ligada à proteína G (SAUNDERS et al., 1999; MURDOCH et al., 2000). A família das quimiocinas e seus receptores é caracterizada como um sistema redundante onde a maioria dos receptores de quimiocinas liga mais de uma quimiocina, além disso, diferentes tipos de células podem expressar vários destes receptores, de modo que se um ligante ou um receptor estiver defeituoso, um conjunto de quimiocinas ou receptores alternativos podem efetuar a função biológica na célula (MANTOVANI et al., 1999). Outra característica interessante deste sistema é que a função resultante de um mesmo receptor pode variar dependendo do ligante, assim como do microambiente em que ele se encontra (KENAKIN et al., 2003).

Microorganismos infecciosos podem diretamente estimular a produção de citocinas por células residentes como células dendríticas, macrófagos e linfócitos T $\gamma\delta$ pelo reconhecimento através de receptores como os tipo Toll (JANEWAY et al., 2002). A quimiocinas desempenham papel importante na resposta imune contra diferentes patógenos através da regulação e mobilização de subpopulações apropriadas de leucócitos capazes de exercer mecanismos antimicrobianos nos tecidos infectados (MANHHEIMER et al., 1996; ALIBERTI et al., 1999; RITTER et al., 2000). Portanto, a produção local de quimiocinas pode ser considerada como alvo fundamental para ação dos mecanismos de escape de patógenos que podem criar um microambiente favorável para a progressão e cronicidade da infecção.

1.8. QUIMIOCINAS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LEISHMANIOSE

Na leishmaniose, o desenvolvimento de uma resposta celular é fundamental para a defesa do hospedeiro e controle da doença. Neste aspecto, as quimiocinas desempenham papel relevante como o recrutamento de leucócitos e ativação celular, participação na imunidade mediada por células e atividade leishmanicida.

A resposta inflamatória é iniciada no local da picada onde a saliva do vetor e o parasita são depositados. Neste local, células residentes são capazes de produzir rapidamente quimiocinas e citocinas, desencadeando rapidamente uma resposta inflamatória (SPELLBERG et al., 2000). Logo nas primeiras horas após a infecção, a

primeira população celular que migra para o local da picada é formada basicamente por neutrófilos recrutados pela produção de quimiocinas que atraem preferencialmente este tipo celular. Na infecção experimental com *L. major* ocorre uma produção rápida de MIP-2 e CXCL1/KC na pele de animais infectados (MULLER et al., 2001). A infecção de macrófagos *in vitro* também resulta em uma rápida produção de IL-8 por macrófagos humanos e CXCL1/KC por macrófagos murinos (BADOLATO et al., 1996; RACOOSIN et al., 1997). No homem, neutrófilos infectados com *L. major* também secretam IL-8, o que resulta no recrutamento de mais neutrófilos para o local (LAUFS et al., 2002). A própria *Leishmania* libera um fator quimiotático para neutrófilos conhecido como fator quimiotático da *Leishmania* que também contribui para uma intensa migração inicial de neutrófilos (VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Todas estas quimiocinas recrutam preferencialmente neutrófilos que são capazes de fagocitar e destruir o parasita rapidamente. Os neutrófilos também podem ser infectados levando a produção de CCL4/MIP-1 β e apoptose tardia destas células (AGA et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). A produção de CCL4/MIP-1 β induz a migração de macrófagos para o local para fagocitose dos neutrófilos apoptóticos, o que leva a produção de TGF- β e PGE2. A produção destas moléculas resulta na desativação de macrófagos caracterizando uma entrada “silenciosa” da *Leishmania* no hospedeiro (FADOK et al., 1998; LASKAY et al., 2003; RIBEIRO-GOMES et al., 2004).

Após a migração inicial de neutrófilos, os macrófagos formam a segunda população de leucócitos que migra para o local da infecção. A infecção por *L. major* induz a produção de CCL2/MCP-1 por macrófagos humanos e murinos (BADOLATO et al., 1996; RACOOSIN et al., 1997). Comparando o padrão de expressão de quimiocinas na lesão de indivíduos com LC e LD causadas por *L. mexicana* foi possível observar que as lesões dos indivíduos com LC apresentavam expressão aumentada de CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10; enquanto nas lesões de indivíduos com LD predominava CCL3/MIP-1 α (RITTER et al., 1996). Camundongos C57BL/6 (resistentes) e BALB/c (suscetíveis) apresentaram expressões significativamente diferentes de várias quimiocinas após infecção pela *L. major*. Os linfonodos de camundongos resistentes infectados com *L. major* expressavam significativamente mais CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e XCL1/linfotactina que os linfonodos de camundongos suscetíveis, indicando que estas

quimiocinas podem ter um papel importante no desenvolvimento da imunidade do hospedeiro contra *L. major*.

As células NK também migram rapidamente para o local da infecção atraídas pela expressão de CXCL10/IP-10 induzida pela infecção pela *L. major* e *L. braziliensis* (LASKAY et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2004). Estas células são produtoras de IFN- γ e sua produção precoce pode influenciar a definição de uma resposta Th1. A importância desta quimiocina na infecção foi demonstrada quando a administração de CXCL10/IP-10 recombinante em camundongos BALB/c aumentou a atividade das células NK e a resistência contra *L. major* (VESTER et al., 1999). Outra quimiocina, o CCL5/RANTES, também foi relacionado a resistência à infecção por *L. major*. O tratamento de camundongos resistentes infectados com *L. major* com met-RANTES, um antagonista funcional dos receptores desta quimiocina, tornou esses animais suscetíveis à infecção (SANTIAGO et al., 2004).

Na leishmaniose visceral, o padrão de quimiocinas encontrado no baço e fígado de camundongos infectados é diferente, o que sugere uma participação importante destas proteínas no processo de formação de granuloma e controle da parasitemia nestes órgãos. Esta diferença foi observada quando camundongos infectados com *L. donovani* desenvolveram uma rápida produção de CCL3/MIP-1 α , CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 (COTTERELL et al., 1999). Os macrófagos atraídos pela produção de CCL3/MIP-1 α e CCL2/MCP-1, após estimulação com IFN- γ , parecem ser a fonte de produção de quimiocinas que favorecem uma resposta Th1 como o CXCL10/IP-10. A expressão de CXCL10/IP-10 permanece elevada durante a fase tardia, o que permite a formação do granuloma no fígado. Entretanto, no baço de animais infectados, ocorre a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2, o que é compatível com a expressão contínua de CCL2/MCP-1 e não CXCL10/IP-10 sugerindo que o recrutamento de macrófagos e não de linfócitos T para o baço resultaria na persistência do parasita no baço e não no fígado (ROUSSEAU et al., 2001). A produção de CXCL10/IP-10, amplificada por células T também foi essencial para permitir a formação do granuloma hepático e na resposta inflamatória, conferindo resistência a esses animais (COTTERELL et al., 1999). Em outro trabalho foi demonstrado que camundongos deficientes de CCR2, CCR5 ou

CCL3/MIP-1 α , infectados com *L. donovani*, apresentaram uma baixa produção de IFN- γ durante a fase inicial da infecção. Durante a fase crônica da doença, as concentrações de IFN- γ aumentaram nos camundongos deficientes de CCR5 e CCL3/MIP-1 α , e o aumento desta citocina foi correlacionada com uma diminuição da carga parasitária, sugerindo que CCR2, CCR5 e CCL3/MIP-1 α teriam papel importante na geração de IFN- γ participando da defesa do hospedeiro contra *L. donovani* (SATO et al., 1999). A ausência do receptor CCR2 em camundongos infectados com *L. donovani* também está associada à migração reduzida de células de Langerhans para o linfonodo, resultando em uma redução nonúmero de células dendríticas CD8 α + (SATO et al., 2000).

As quimiocinas e seus receptores também podem exercer papel importante na polarização do padrão de resposta imune (SALLUSTO et al., 1998). Em camundongos suscetíveis à infecção pela *L. major*, a migração de células dendríticas para o linfonodo e baço que é dependente de CCR2 e CCR7, é bloqueada em camundongos deficientes para CCR2 que apresentam redução significativa na sensibilização de linfócitos Th1 (SATO et al., 2000). Camundongos infectados pela *L. donovani* também apresentam expressão de CCR7 reduzida nas células dendríticas, impedindo sua migração e resultando em progressão da infecção (ATO et al., 2002). O CCR1 também parece desempenhar papel importante na produção de citocinas do tipo Th2 na infecção pela *L. major* mas não para mediar a migração de macrófagos para os linfonodos ou para a lesão (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2003). Já o CXCR3 parece ter um papel importante na defesa contra a infecção pela *L. major*. Camundongos deficientes para CXCR3 não são capazes de controlar a infecção pois apesar de desenvolverem uma resposta Th1 ocorre um bloqueio na produção de IFN- γ na lesão (ROSAS et al., 2005).

Na leishmaniose, algumas quimiocinas também apresentam a capacidade de ativar macrófagos induzindo atividade leishmanicida. Este efeito foi observado na produção de CCL2/MCP-1 durante a infecção por *L. major* e *L. donovani* (RITTER et al., 1996 e 2000). A produção de CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1 α também estão relacionadas ao controle da infecção *in vitro* pela *L. infantum* e na infecção pela *L. donovani* por um mecanismo que envolve a produção de óxido nítrico (BHATTACHARYYA et al., 2002).

A avaliação do papel de quimiocinas e receptores na leishmaniose confirmam a importância destas proteínas em mediar a resposta inflamatória. O perfil de quimiocinas

produzidas pode ser modificado dependendo da espécie e virulência do parasita o que resulta no recrutamento de uma determinada população de leucócitos como células hospedeiras ou células que mediarão a destruição do parasita (Anexo II).

1.9. MODELO DO BOLSÃO DE AR

O modelo do bolsão de ar ou “air pouch” foi desenvolvido inicialmente por Selye e colaboradores em 1953 para estudar mecanismos da hidrocortisona na resistência dos tecidos a agressões utilizando o óleo de cróton como estímulo. Uma grande vantagem que este modelo de inflamação *in vivo* oferece é a criação de um ambiente delimitado por uma estrutura que recobre o limite interno semelhante a uma membrana sinovial. A formação desta cavidade permite a coleta e análise fenotípica das células que migram em resposta a uma pequena quantidade de estímulo (TESSIER et al., 1998; MATTE et al., 2002; FORGET et al., 2005). A formação da membrana sinovial é resultante do rompimento mecânico do tecido conectivo subcutâneo devido a inoculação repetida de ar. Seis dias após a formação inicial do bolsão de ar, já é possível observar a formação desta membrana o que permite o estudo de estímulos com atividade inflamatória (EDWARDS et al., 1981; SEDGWICK et al., 1983). Uma desvantagem do modelo é a ausência de mastócitos como células residentes que podem influenciar a resposta inflamatória através da produção de citocinas e quimiocinas (CARVALHO et al., 2005).

Vários trabalhos tem utilizado este modelo para estudos que avaliam o efeito de estímulos na inflamação aguda e crônica até a formação de tecido de granulação (GILROY et al., 1998). A estimulação do bolsão de ar com lipídio A permitiu a avaliação do papel do CD44 e IL-1 α na resposta inflamatória induzida por este estímulo (MATSUKURA et al., 1998). Em um trabalho que comparava o efeito de três corticóides *in vivo*, foi possível detectar diferenças na velocidade e intensidade anti-inflamatória das drogas testadas (RULL et al., 2003).

Recentemente, diversos trabalho têm demonstrado a utilidade do modelo do bolsão de ar também na avaliação da resposta inflamatória induzida pela *Leishmania*. A utilização deste modelo possibilitou a detecção de diferenças na resposta inflamatória

inicial e produção de citocinas e quimiocinas induzida entre a *L. major* e *L. donovani* ou entre cepas de *L. braziliensis* (MATTE et al., TEIXEIRA et al., 2005b). Em outro trabalho mais recente também foi possível observar o efeito modulatório da *Leishmania* na indução da proteína tirosina fosfatase (SHP-1) do hospedeiro utilizando o modelo do bolsão de ar (FORGET et al., 2005).

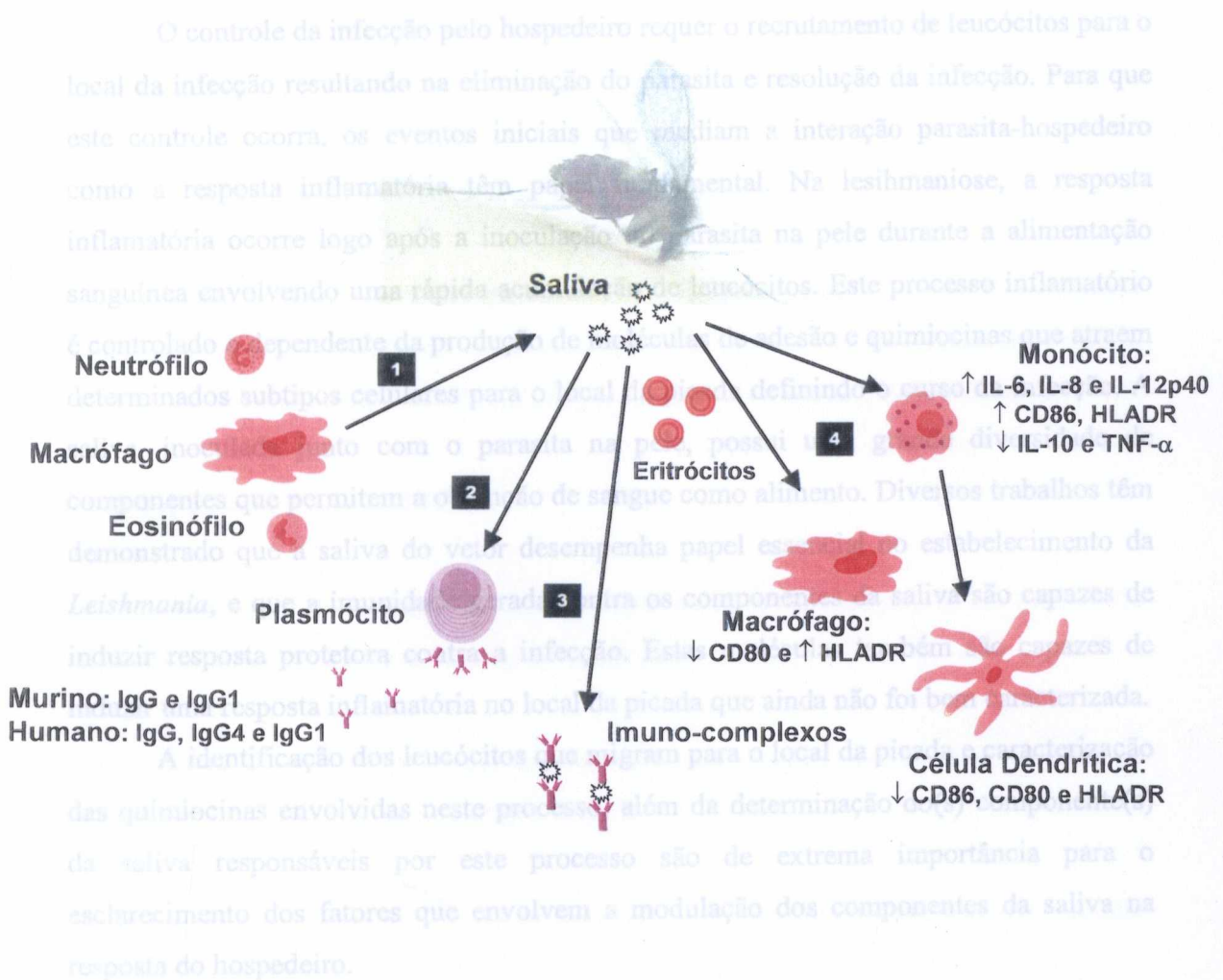


Figura 1: Efeitos da saliva de *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado. (1) Infiltrado inflamatório, (2) resposta imune humoral, (3) formação de imuno-complexos e (4) regulação da expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas nas células apresentadoras de antígenos (TEIXEIRA et al., 2005a).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose permanece como um problema grave de saúde pública mundial ainda sem perspectivas para um novo tratamento ou vacina. Recentemente, o estudo da saliva do vetor tem aberto caminhos na busca por novos candidatos à vacina.

O controle da infecção pelo hospedeiro requer o recrutamento de leucócitos para o local da infecção resultando na eliminação do parasita e resolução da infecção. Para que este controle ocorra, os eventos iniciais que mediam a interação parasita-hospedeiro como a resposta inflamatória têm papel fundamental. Na leishmaniose, a resposta inflamatória ocorre logo após a inoculação do parasita na pele durante a alimentação sanguínea envolvendo uma rápida acumulação de leucócitos. Este processo inflamatório é controlado e dependente da produção de moléculas de adesão e quimiocinas que atraem determinados subtipos celulares para o local da picada definindo o curso da infecção. A saliva, inoculada junto com o parasita na pele, possui uma grande diversidade de componentes que permitem a obtenção de sangue como alimento. Diversos trabalhos têm demonstrado que a saliva do vetor desempenha papel essencial no estabelecimento da *Leishmania*, e que a imunidade gerada contra os componentes da saliva são capazes de induzir resposta protetora contra a infecção. Estas moléculas também são capazes de induzir uma resposta inflamatória no local da picada que ainda não foi bem caracterizada.

A identificação dos leucócitos que migram para o local da picada e caracterização das quimiocinas envolvidas neste processo, além da determinação do(s) componente(s) da saliva responsáveis por este processo são de extrema importância para o esclarecimento dos fatores que envolvem a modulação dos componentes da saliva na resposta do hospedeiro.

3 HIPÓTESE

A saliva de *Lutzomyia longipalpis* induz uma resposta inflamatória diferenciada no local da picada em camundongos BALB/c e C57BL/6 resultando em um perfil mais permissivo à infecção pela *Leishmania chagasi*.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do homogeneizado de glândula salivar (SGH) de *Lutzomyia longipalpis* no recrutamento de diferentes tipos celulares e sua influência na resposta inflamatória induzida pela *Leishmania chagasi* utilizando o modelo do bolsão de ar.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar o efeito do SGH de *L. longipalpis* no recrutamento celular no modelo do bolsão de ar induzido em camundongos BALB/c e C57BL/6;

4.2.2. Avaliar o perfil de quimiocinas produzidas em resposta ao SGH no modelo do bolsão de ar induzido em camundongos BALB/c e C57BL/6;

4.2.3. Avaliar o efeito de moléculas da saliva de *L. longipalpis* no recrutamento celular utilizando o modelo do bolsão de ar;

4.2.4. Investigar o efeito do SGH no perfil de expressão de quimiocinas e no recrutamento celular induzido pela *L. chagasi*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Camundongos BALB/c e C57BL/6, machos (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM - FIOCRUZ.

5.2. Parasita

Promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR00/MER/STRAIN2) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal 20% (Cripion, Brasil), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e streptomicina 100µl/ml (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

5.3. Obtenção e preparo do SGH de *L. longipalpis*

Fêmeas de *L. longipalpis* com 5-7 dias (cepa Cavunge) foram mantidas no Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia/CPqGM. Os machos foram alimentados com uma solução de glicose e as fêmeas alimentadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) anestesiados. As glândulas salivares foram obtidas de fêmeas mantidas no laboratório com 5-7 dias após eclosão das larvas. Após dissecação, as glândulas foram estocadas em uma solução PBS estéril a -70°C. Imediatamente antes do uso, as glândulas são sonicadas e centrifugadas a 10,000g por 2 minutos e o sobrenadante (SGH, homogeneizado de glândula salivar) utilizado para os experimentos.

5.4. Modelo do Bolsão de Ar

O bolsão de ar foi realizada pela inoculações de 4 ml de ar na superfície dorsal de camundongos BALB/c e C57BL/6. Cem microlitros de SGH (0.5 par/animal), salina estéril, LPS (20 µg/ml; Calbiochem, Behring Diagnostics, La Jolla, CA, EUA), *L. chagasi* (10^6), *L. chagasi* + SGH, cDNA (10µg) ou proteínas recombinantes (100ng) foram inoculados no bolsão de ar imediatamente após a injeção de ar como descrito previamente (MULLER et al., 2001; MATTE et al., 2002). Após 2, 4, 6, 12 e 24 horas (experimentos com salina, LPS e SGH) ou 12, 24, 48 e 72 horas (experimentos com *L. chagasi* e SGH); 3-5 animais por grupo experimental foram sacrificados e o bolsão de ar lavado com 5 ml de salina estéril possibilitando a coleta do exudato leucocitário. Este exudato foi centrifugado a 100g por 10 min a 4°C e o sedimento celular ressuspense em uma solução de PBS + BSA10% (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

5.5. Western Blot

A eletroforese com SGH de *L. longipalpis* (80 pares de glândula) foi realizado em um gel de Tris-glicina a 16% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a transferência para membrana de nitocelulose foi realizado o bloqueio com uma solução com 5% de leite desnatado em PBS-tween 0,05% durante a noite a 4°C. A membrana foi posicionada em um sistema mini-proteam II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e incubada com soro (1:50) em tampão de bloqueio por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada adição do anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:1000) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por uma hora. A visualização de bandas específicas foi realizada utilizando um substrato de fosfatase alcalina (Promega, Madison, WI, EUA) e a reação foi parada com a adição de água deionizada.

5.6. ELISA para detecção de IgG anti-SGH de *L. longipalpis*

Placas de 96 poços (Limbro[®]/Titertek[®], Aurora, OH, EUA) foram sensibilizadas (70µl/poço) com SGH (5µg/ml) por uma hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 0,05% e bloqueio (250µl) por duas horas com uma solução de PBS-tween 0,05% e BSA 3% (Sigma, St. Louis, MO, EUA), as amostras foram adicionadas (soros, 1:50) e incubadas durante a noite. Após nova lavagem, foi adicionado o anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubada durante uma hora a 37°C, seguido do substrato de fosfatase alcalina (p-nitrofenil fosfatase, Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após 15 minutos, a reação foi parada com NaOH 3m (50µl) e reação lida a 405 nm.

5.7. Isolamento de RNA e RT-PCR

O RNA total foi extraído da parede interna do bolsão de ar utilizando reagente de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após a lise celular o RNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol a 70% e solubilizado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração do RNA e a pureza foram determinadas pela leitura a A_{260} e A_{280} e as amostras armazenadas a -70°C. A síntese de cDNA foi realizada com aproximadamente 1-2 µg de RNA em um volume total de 20 µl contendo 2,5 µM de oligonucleotídeos iniciadores, oligo (dT)₁₂₋₁₈, 1 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), 20 U de inibidor de ribonuclease e 50U de transcriptase reversa (Superscript II, Gibco, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada a 42°C por 50 minutos e encerrada a 95°C por 5 minutos.

5.8. Detecção de mRNA para quimiocinas

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para quimiocinas murinas (β -actina, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina, CXCL1/KC e CCR2) foram utilizados para amplificar os cDNA através do PCR. A β -actina murina foi utilizado como controle para avaliar a expressão de genes. Os oligonucleotídeos iniciadores foram preparados pela empresa Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brasil), baseado em seqüências (Tabela 1) publicadas anteriormente (KAWAKAMI et al., 1997; NEUMANN et al., 1998).

A expressão de mRNA foi analisada pela reação de transcrição reversa da polimerase em cadeia (RT-PCR) da seguinte forma: uma alíquota de 5 μ l do cDNA obtido foi amplificada em uma reação de 25 μ l contendo tampão para PCR 1x (5 nmol KCL, 1 nmol Tris-HCL, pH 8,4, 1,5 nmol MgCL₂), 0,2 nmol de cada dNTP, 200 nmol de cada oligonucleotídeo iniciador e *Taq* DNA polimerase (1U) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em um termocilcador PTC-100 (MJ Research Inc., Waltham, Mass., USA). As condições da reação foram: 30 ciclos por 1 minuto a 94⁰C, 1 minuto a 54 a 55⁰C, e 2 minutos a 72⁰C, com uma extensão final de 7 minutos a 72⁰C. Para cada reação, uma amostra negativa (água) foi adicionada em paralelo. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% com uma solução de nitrato de prata a 10%. O tamanho do produto do RT-PCR foi confirmado com um peso moleuclar de 100-pb adicionado em paralelo com as amostras. A intensidade da banda do produto amplificado foi analisada pelo programa EagleSight[®], versão 3.2 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). O resultado da expressão de CCL2/MCP-1 e CCR2 após doze horas (grupos estimulados com salina, LPS e SGH) foi expresso como a razão da expressão das quimiocinas com a expressão da β -actina das mesmas amostras.

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos do PCR

Oligonucleotideo	Oligonucleotideo iniciador Sense (5'-3')	Oligonucleotideo iniciador Anti-sense (3'-5')	Tamanho do Produto (pb)
β -Actina	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C	TAA AAA GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	349
CXCL1/KC	CC TTG ACC CTG AAG CTC CCT TGG TTC	CGT GCG TGT TGA CCA TAC AAT ATG	422
CCL11/eotaxina	AGT CCT TGG GCG ACT GGT GC	GCA GAG CTC CAC AGC GCT TC	243
CCL2/ MCP-1/JE	CTA AGG ACC ACT TGC CAT GGA	CTG GTA GCT CTC TGC CCT GTT T	445
CCL3/MIP-1 α	C CGG AAG ATT CCA CGC CAA TTC	T GAG GAA CGT GTC CTG AAG	427
CCL3/MIP-1 β	CCT GCT GCT TTT CTT ACA CC	CAC CTA ATA CAA TAA CAC GGC	427
CCL5/RANTES	C CCA CGT CAA GCA GTA TTT C	CTG GTT TCT TGG GTT TGC TGT G	506
CCR2	CTA CGA TGA TGG TGA GCC TTG T	ACC AAT GTG ATA GAG CCC TGT G	368

5.9. Cultura de macrófagos J774

A linhagem celular J774E foi mantida a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 10% (HyClone, Logan, Utah, EUA), HEPES 25mM, penicilina 100 U/ml e streptomina 100 µg/ml (Gibco, Carlsbad, CA, USA). As células (4x10⁵ /ml) foram distribuídas em placas para cultura de 24 poços (Costar, Cambridge, Michigan, EUA), contendo lamínulas redondas com 13 mm de diâmetro em duplicatas (Novocastra Laboratories, UK). Após 24 horas, os macrófagos foram tratados ou não com LPS (50 µg/ml) ou SGH (0,5 par/poço) ou SGH pré-incubado por 1 hora a 37°C com soro anti-SGH específico. Oito horas após a estimulação as lamínulas foram removidas e fixadas em metanol por 5 minutos.

5.10. Imunohistoquímica

As lamínulas contendo os macrófagos J774 ou cortes do tecido da parede interna do bolsão de ar fixadas em lâminas foram desparafinizadas e incubadas com uma solução de leite desnatado a 10% por 20 min a temperatura ambiente para o bloqueio das ligações inespecíficas. Os anticorpos primários (50 µl, 1:100) para CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES ou CCR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS contendo 0.01% de saponina, adicionados e incubados durante a noite a 4°C. As lâminas foram lavadas três vezes com uma solução de PBS contendo Triton-X-100 a 1% (Amresco, Solon, Ohio, EUA), e o anticorpo secundário (50 µl, 1:300, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) foi adicionado e incubado por 45 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas três vezes com uma solução de PBS contendo Triton-X-100 a 1%. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação em H₂O₂ a 3% por 20 min a temperatura ambiente, e então 50 µl de streptavidina-peroxidase (Vectastain ABC kit, mouse IgG, Vector Laboratories) foi adicionado por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada com uma solução de 3-3'diaminebenzidine (kit DAB, Vector Laboratories) e a contra-coloração realizada com hematoxilina. Os macrófagos J774 estimulados com LPS (50 µg/ml) foram utilizados como controle positivo. Os anticorpos monoclonais foram substituídos por anticorpo murino irrelevante como controle negativo.

5.11. Tratamento com bindarit e anticorpo monoclonal anti-CCL2/MCP-1

Bindarit ou ácido 2-metil-2-[[1-fenilmetil]-1H-indazol-3-yl]metoxi}propiónico (Angelini Farmaceutici - ACRAF, Aprilia, Itália) foi administrado na dose de 200 mg/kg intraperitonealmente uma hora antes e sete horas depois da indução do bolsão de ar induzido com a estimulação do SGH (0,5 par/animal). A dose de bindarit foi determinada baseada em trabalhos anteriores que demonstravam sua inibição preferencial da síntese de CCL2/MCP-1 (SIRONI et al., 1999; GUGLIELMOTTI et al., 2002; BHATIA et al., 2005). Para o tratamento com anticorpo monoclonal anti-MCP-1, os animais receberam injeção i.p. com o anticorpo anti-MCP-1 neutralizante (R&D Systems, Minneapolis, MN,

EUA) em um volume final de 200 μ l (100 μ g) uma hora antes da indução do bolsão de ar e estimulação com SGH (0,5 par/animal).

5.12. Obtenção de soro anti-SGH de *L. longipalpis*

Para obtenção de soro anti-SGH, hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram expostos a picadas de fêmeas de *L. longipalpis* (cepa Cavunge, 5-7 dias). Os animais foram anestesiados e expostos três vezes a aproximadamente 50 flebotomíneos a cada quinze dias. Quinze dias após a última exposição, os animais foram sacrificados e o soro coletado para determinação de IgG anti-SGH por ELISA.

5.13. Imunização com saliva de *L. longipalpis*

Camundongos BALB/c anestesiados (Avertina, Acrós Organics, NJ, EUA) foram sensibilizados através da exposição natural a picadas de 15 fêmeas de *L. longipalpis* não-infectadas na orelha esquerda, cinco vezes com intervalos de dez dias. Uma semana após a última exposição o soro foi coletado para avaliar a presença de IgG anti-SGH. Os animais considerados positivos (cut-off = 0.045) foram utilizados para realização dos experimentos.

5.14. Imunização com os plasmídeos de cDNA da saliva de *L. longipalpis*

Grupos de camundongos BALB/c foram sensibilizados intradermicamente na orelha direita com cDNA que codificam produtos da saliva de *L. longipalpis*. Os plasmídios LJM17, LJM19, LJM11 e LJL11 (10 μ g) foram inoculados isoladamente ou em combinação, ou com 0,5 par de SGH em 10 μ l de salina. Cada grupo foi vacinado três vezes com intervalos de 14 dias. Catorze dias após a última imunização uma alíquota de soro foi coletada para determinação de anticorpos anti-SGH por ELISA e Western blot. Os animais considerados positivos (cut-off = 0.045) foram utilizados para realização dos experimentos.

5.15. Construção dos plasmídeos de cDNA e descrição do vetor VR2001-TOPO

A obtenção dos plasmídeos de cDNA contendo as seqüências das proteínas da glândula salivar de *L. longipalpis* foi realizada no laboratório do Dr. Jesus Valenzuela (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). O cDNA codificando para uma determinada proteína salivar foi amplificado a partir de cDNA de *L. longipalpis* por PCR, utilizando *Taq* polymerase (Gibco, Carlsbad, CA, USA) e oligonucleotídeos específicos. O produto de PCR foi visualizado em um gel de agarose 1,5% e imediatamente clonado no vetor de clonagem, denominado VR2001-TOPO. As células foram incubadas durante a noite a 37°C. Oito colônias foram pescadas e misturadas com 10 µl de água estéril. Cinco µl de cada amostra foi transferido para o meio de cultura Luria com Kanamicina (100 µg/ml) e incubadas a 37° C. Os outros 5 µl de foram usados como modelo para uma reação de PCR utilizando dois oligonucleotídeos específicos para o vetor VR2001-TOPO, com a finalidade de confirmar a presença do inserto e para análise seqüencial. Após a visualização do produto do PCR em um gel de agarose 1,1%, os oito produtos de PCR foram sequenciados utilizando um seqüenciador de DNA CEQ2000 (Beckman Coulter). Foi escolhida uma amostra que continha a seqüência que era iniciada do N-terminal até o codon de parada dos cDNA das proteínas salivares. As células contendo o plasmídeo carreando os genes de interesse foram cultivados em meio Luria durante a noite a 37° C com Kanamicina e a purificação do plasmídeo foi feita usando um kit de isolamento de plasmídeo “mega prep endofree” (Qiagen, Alemanha). O plasmídeo VR2001 contém o gene resistente a Kanamicina, o promotor do citomegalovírus humano e o peptídeo sinal ativador do plasminogênio tecidual acima do sítio de clonagem. Após o isolamento do plasmídeo, a amostra e o plasmídeo controle (VR2001 sozinho) foram lavados 3 vezes com água ultrapura. As concentrações das amostras foram medidas por absorbância em UV. Antes de serem estocadas a -70°C, as amostras foram esterilizadas por filtração com filtros de 0.2µ.

5.16. Expressão das proteínas recombinantes de *L. longipalpis* *in vitro*

As proteínas recombinantes de 11 kDa, 43kDa, 44kDa e 45kD da saliva de *L. longipalpis* foram produzidas no laboratório do Dr. Jesus Valenzuela (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) como descrito anteriormente (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2005). Resumidamente, as proteínas foram obtidas pela transfecção de células “FreeStyle 293-F cells” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizando o sistema “Rapid Translation System” (RTS500, Roche Molecular Biochemicals). Inicialmente, os respectivos cDNA foram amplificados por PCR. Para a expressão nas células 293-F, o cDNA foi clonado utilizando o vetor VR2001-TOPO, uma versão modificada do vetor VR1020 (Vical Inc., San Diego, CA, EUA) (OLIVEIRA et al., 2005), onde, para a expressão de RTS500, o mesmo cDNA foi clonado no vetor de expressão pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em ambos os casos, a orientação da inserção foi confirmada pelo sequenciamento. Após a purificação de 2-4 µg do DNA utilizando o “EndoFree™ Plasmid MEGA prep kit” (Qiagen, Alemanha), 30 µg do plasmídeo VR2001 purificado foi utilizado para transfectar células 293-F e 50 µg do plasmídeo pCRT7/NT purificado foi utilizado para RTS500 de acordo com as instruções do fabricante. As células 293-F transfectadas foram crescidas por 48-72 h a 37 °C e 8% de CO₂. Após este tempo, o sedimento celular e o sobrenadante foram coletados. O sobrenadante foi concentrado aproximadamente 20-25 vezes utilizando o filtro Centricon Plus-20 (cut-off 5 kDa) (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). O sedimento celular e o sobrenadante concentrado foram mantidos a 4 °C. A expressão com o sistema RTS500 foi realizado por 24 h (30°C) a 120 rpm. em um RTS ProteoMaster (Roche Molecular Biochemicals). Aproximadamente 1,0 ml do produto *in vitro* foi removido do compartimento da câmara de reação e centrifugado por 2 h a velocidade máxima (16.000 g). O sedimento foi lavado diversas vezes com 1,0 ml de Tris 50mM (pH 8.0), EDTA 20 mM (pH 8.0) e mix de inibidor de protease “Complete Protease Inhibitor Mix” TE 50/20/PI (Roche Molecular Biochemicals). Para cada lavagem, a amostra foi centrifugada por uma hora em velocidade máxima. Antes da última rotação, 10 µl da amostra foram retirados e separados em um gel NuPAGE 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e

corado com Gel Code Blue Stain reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) para confirmar a presença da proteína recombinante.

5.17. Análise estatística

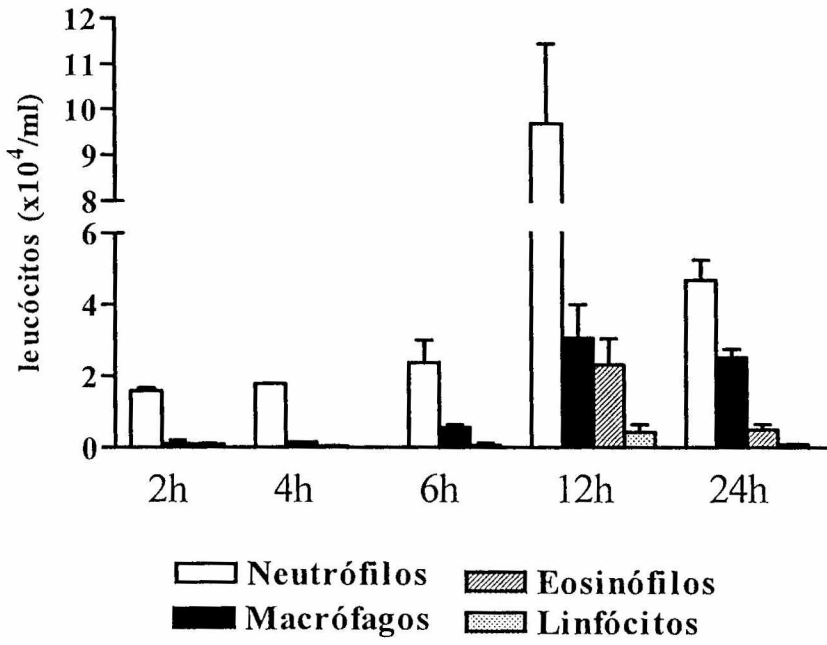
Os dados obtidos estão representados como a média \pm erro padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0.05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições.

6 RESULTADOS

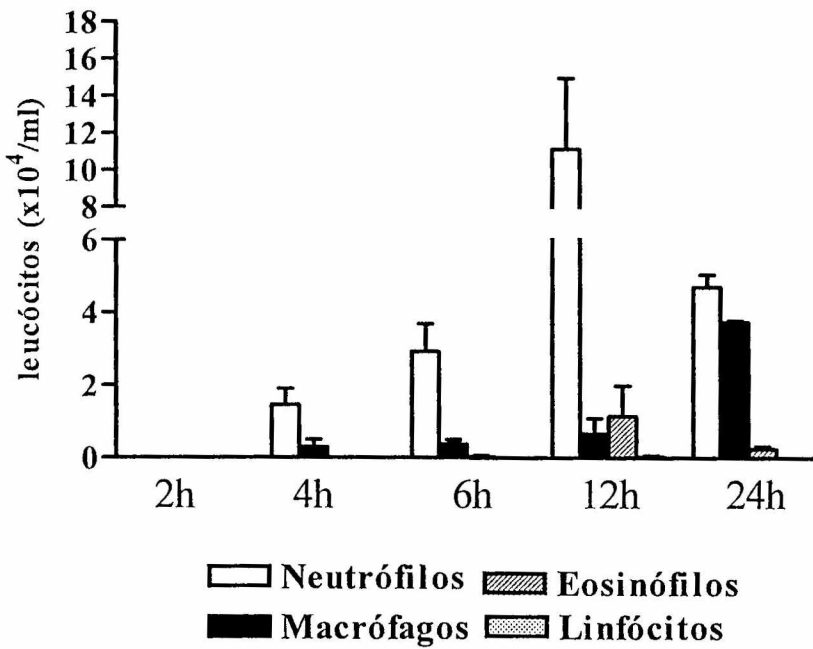
6.1. Efeito da saliva de *L. longipalpis* no recrutamento celular *in vivo*

Para avaliar a atividade inflamatória do SGH de *L. longipalpis* nós utilizamos o modelo do bolsão de ar induzido no dorso de camundongos BALB/c e C57BL/6 através da injeção de ar em conjunto com o SGH (0,5 par/ml), LPS (20 µg/ml) ou salina e após 2, 4, 6, 12 e 24h o exudato foi coletado para contagem e determinação do perfil de recrutamento celular. O SGH induziu o recrutamento celular diferencial nas duas linhagens de camundongo testadas. Enquanto em camundongos BALB/c o recrutamento celular foi iniciado duas horas após a estimulação e o pico máximo após doze horas (Fig. 2A), em camundongos C57BL/6 o recrutamento celular foi iniciado após quatro horas e o pico de recrutamento ocorreu somente após 12 horas para neutrófilos e 24 horas para macrófagos (Fig. 2B). Enquanto poucos leucócitos foram encontradas no exudato quando os animais foram estimulados com salina, o SGH de *L. longipalpis* mostrou-se um forte recrutador de neutrófilos em camundongos BALB/c (Fig. 2C) e C57BL/6 mice (Fig. 2D). Entretanto, apenas o estímulo com o SGH levou a um aumento do número de macrófagos e eosinófilos em camundongos BALB/c após 12 horas. Este efeito não foi observado em camundongos C57BL/6 que neste mesmo tempo de avaliação apresentava um exudato composto apenas por neutrófilos. Este resultado foi reforçado com a comparação do recrutamento de macrófagos e eosinófilos entre BALB/c e C57BL/6 (Fig. 2E). Estes resultados sugerem que o SGH de *L. longipalpis* apresenta uma importante atividade inflamatória diferenciada dependendo da linhagem de camundongo utilizada.

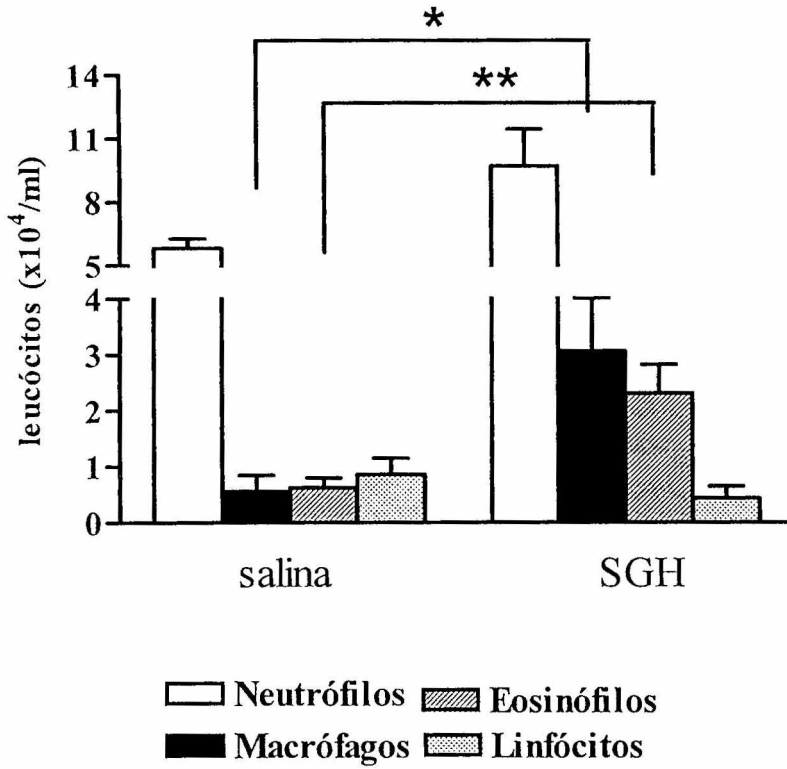
(A)



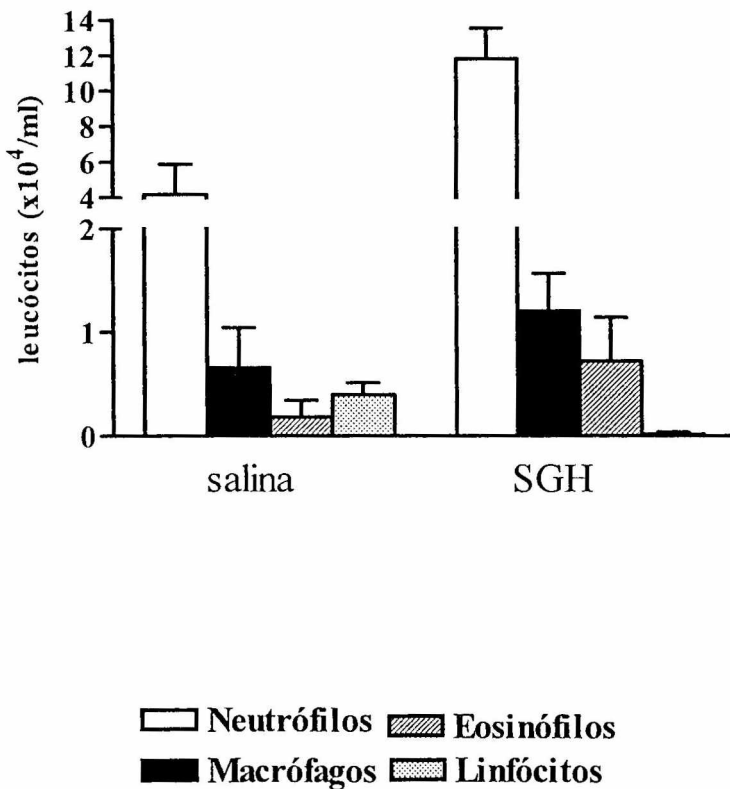
(B)



(C)



(D)



(E)

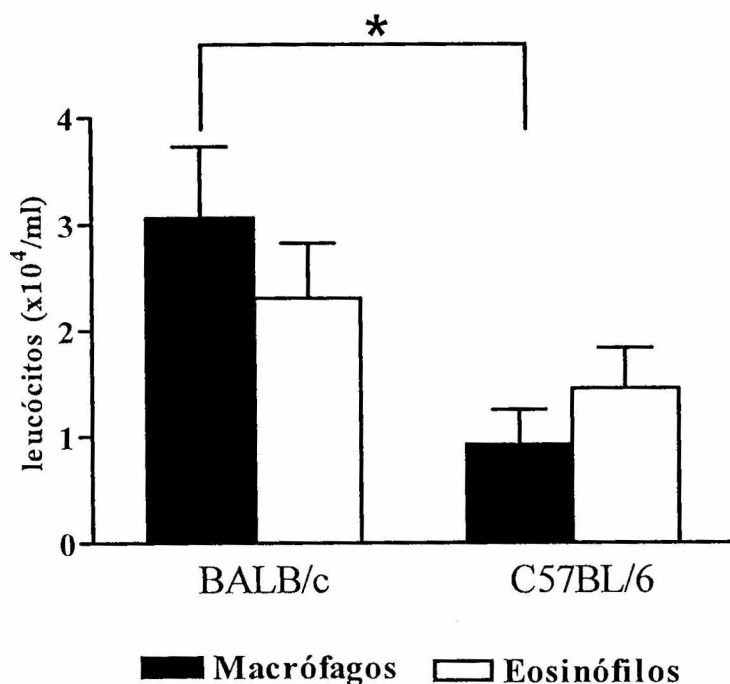


Figura 2: Infiltração leucocitária em camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com o SGH de *L. longipalpis*. Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) estimulados com 0,1 ml de SGH de *L. longipalpis* (0,5 par/animal) após 2, 4, 6, 12 e 24h. Recrutamento celular em camundongos BALB/c (C) e C57BL/6 (D) 12h após estimulação com salina ou SGH. Diferença significativa para macrófagos (*, $p = 0,0390$) e eosinófilos (**, $p = 0,0210$) entre o valor do grupo estimulado com o controle negativo (salina) e o estimulado com SGH. (E) Representação da diferença do recrutamento entre macrófagos e eosinófilos após estimulação com SGH em camundongos BALB/c e C57BL/6. Diferença significativa para macrófagos (*, $p = 0,0280$) entre BALB/c e C57BL/6. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

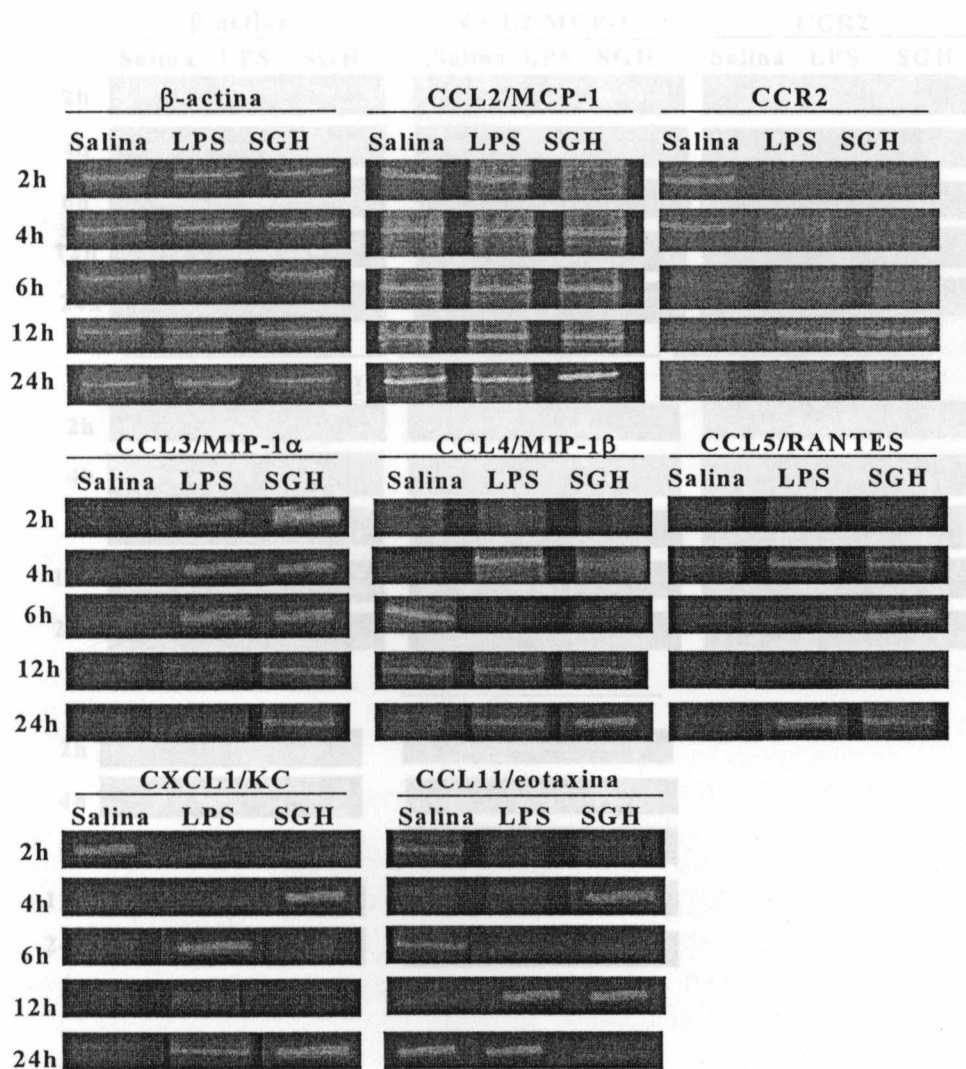
6.2. Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas induzido pelo SGH

Após a determinação do perfil de células encontradas no exudato em resposta ao estímulo com o SGH, nós avaliamos a participação de quimiocinas possivelmente envolvidas neste recrutamento. Nos pontos de avaliação da cinética, o tecido que reveste a parede interna do bolsão de ar foi retirado para extração de RNA e avaliação da expressão das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CXCL1/KC, CCL11/eotaxina e CCR2. Com os resultados obtidos, foi possível observar que o SGH induziu um padrão de expressão de quimiocinas diferente em camundongos BALB/c e C57BL/6. Enquanto em BALB/c a injeção do SGH no bolsão de ar induziu uma expressão de CCL3/MIP-1 α após 2 horas, CCL4/MIP-1 β após 4 e 12 horas e CCL5/RANTES após 4 e 6 horas, estas quimiocinas não foram induzidas quando camundongos C57BL/6 foram estimulados com SGH (Fig. 3A e B). Não observamos diferença significativa na expressão de CXCL1/KC entre as duas linhagens. Por outro lado, a expressão de CCL11/eotaxina foi observada em C57BL/6 após 2, 4 e 24 horas e apenas 4 e 24 horas em BALB/c. A expressão de CCL2/MCP-1 também foi diferente nas duas linhagens. Enquanto em BALB/c o CCL2/MCP-1 foi detectado em quase todos os pontos avaliados (4, 6, 12 e 24 horas), foi detectado apenas após 2 e 4 horas em C57BL/6. O receptor para CCL2/MCP-1, CCR2, também foi detectado após 12 horas em BALB/c e após 4h em C57BL/6. A análise densitométrica após 12 horas em camundongos BALB/c revelou um aumento na expressão de CCL2/MCP-1 nos animais tratados com o SGH quando comparado com o controle (salina) mas não tão elevado quanto ao estímulo com o LPS (Fig. 3C), enquanto o aumento na expressão de CCR2 nos camundongos tratados com SGH foi similar aos controles (Fig. 3D). Mesmo quando a expressão de CCL2/MCP-1 foi detectada em camundongos C57BL/6, a análise densitométrica da expressão desta quimiocina induzida 2 e 4 horas nesta linhagem foi menos intensa quando comparada a expressão após 12h em BALB/c. A expressão de uma maior diversidade de quimiocinas que recrutam preferencialmente mononucleares, principalmente CCL2/MCP-1, para o local da picada em camundongos BALB/c sugere

um participação importante desta quimiocina no aumento do recrutamento de macrófagos induzido pelo SGH observado anteriormente.

(B)

(A)



(B)

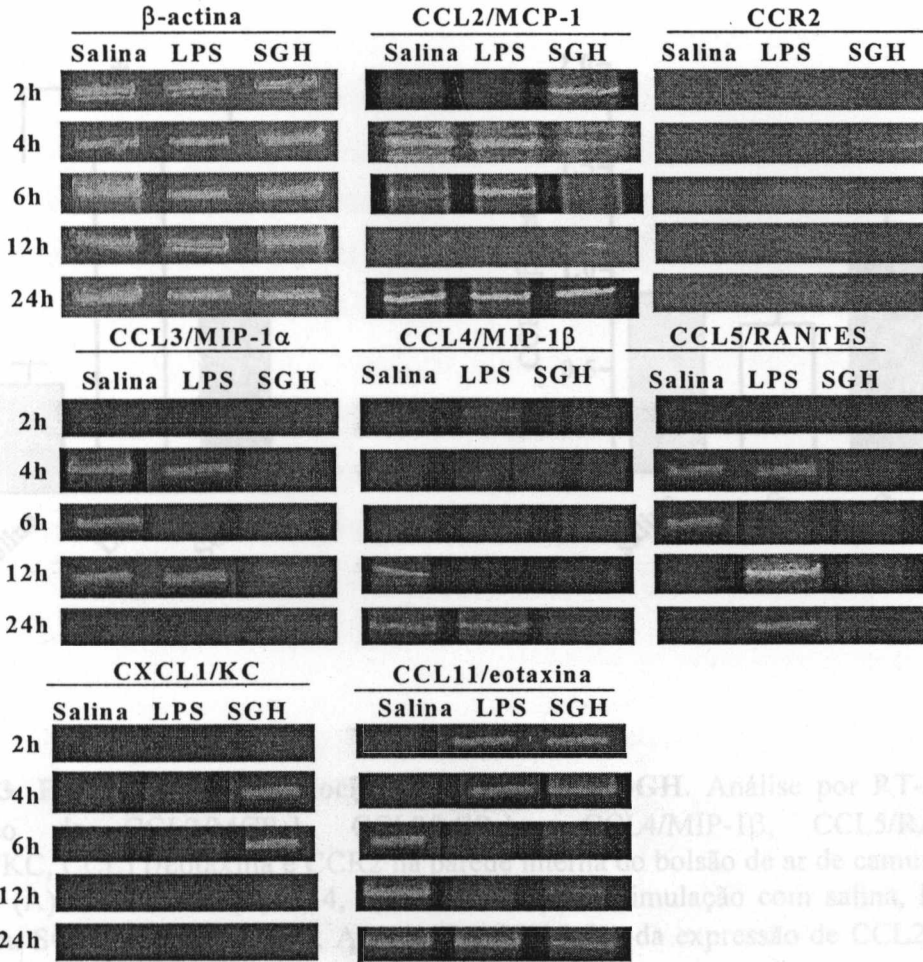


Figura 3. Análise por RT-PCR da expressão de CCL2/MCP-1 (C), CCL3/MIP-1 α (D), CCL4/MIP-1 β (E), CCL5/RANTES (F), CXCL1/KC (G) e CCL11/eotaxina (H) em camundongos BALB/c em um bolsão de ar de camundongos BALB/c após 12h de estimulação com salina, LPS (20 μ g/ml) (C) ou CCR2 (D) em camundongos BALB/c após 12h representado como a média \pm SEM da razão entre a expressão da banda da quimiocina ou receptor e da β -actina da mesma amostra representativa de pelo menos dois experimentos independentes. Diferença significativa (*, $p < 0,0033$) entre o valor do controle negativo (salina) e o grupo tratado com SGH.

6.3. Avaliação da produção de CCL2/MCP-1 *in vivo*

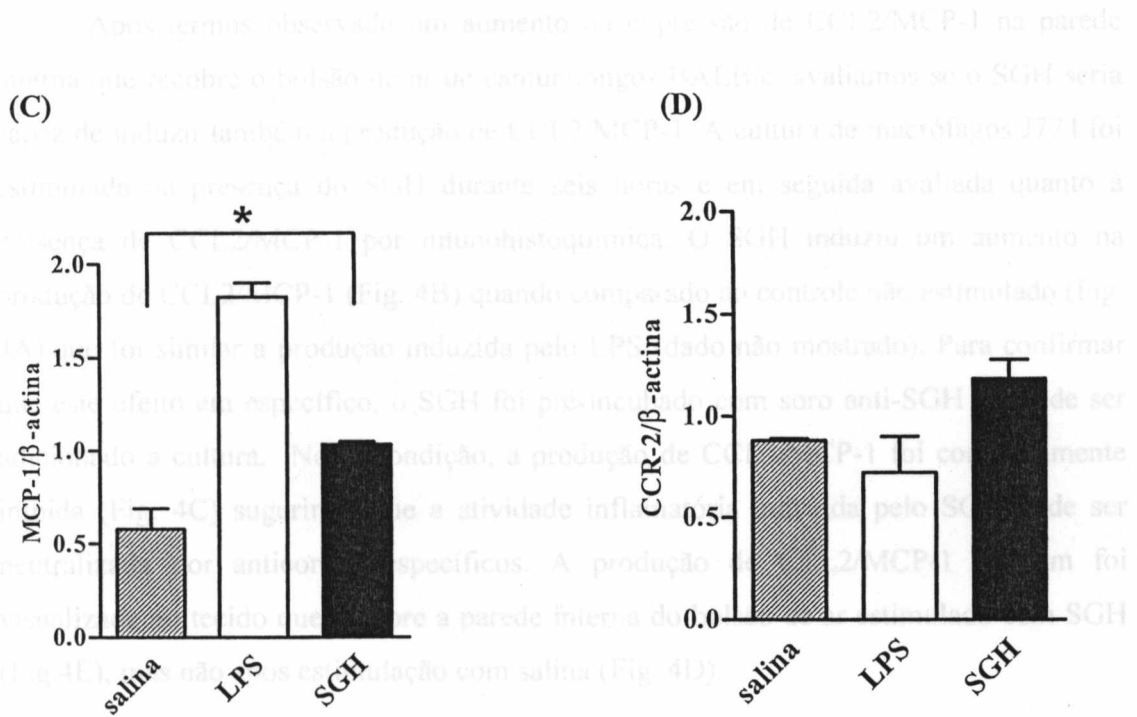
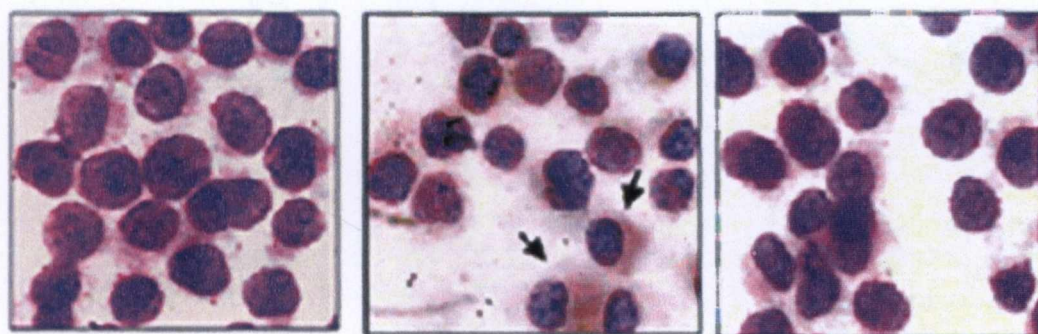


Figura 3. Expressão de quimiocinas induzido pelo SGH. Análise por RT-PCR da expressão de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CXCL1/KC, CCL11/eotaxina e CCR2 na parede interna do bolsão de ar de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) 2, 4, 6, 12 e 24h após estimulação com salina, LPS (20 μ g/ml) ou SGH (0,5 par/animal). Análise densitométrica da expressão de CCL2/MCP-1 (C) ou CCR2 (D) em camundongos BALB/c após 12h representado como a média \pm SEM da razão entre a expressão da banda da quimiocina ou receptor e da β -actina da mesma amostra representativo de pelo menos dois experimentos independentes. Diferença significativa (*, $p = 0,0033$) entre o valor do controle negativo (salina) e o grupo tratado com SGH.

6.3. Avaliação da produção de CCL2/MCP-1 *in vitro*

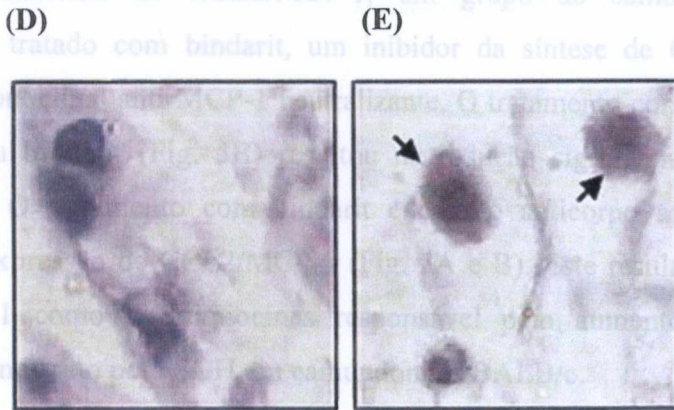
Após termos observado um aumento na expressão de CCL2/MCP-1 na parede interna que recobre o bolsão de ar de camundongos BALB/c, avaliamos se o SGH seria capaz de induzir também a produção de CCL2/MCP-1. A cultura de macrófagos J774 foi estimulada na presença do SGH durante seis horas e em seguida avaliada quanto à presença de CCL2/MCP-1 por imunohistoquímica. O SGH induziu um aumento na produção de CCL2/MCP-1 (Fig. 4B) quando comparado ao controle não estimulado (Fig. 4A) que foi similar a produção induzida pelo LPS (dado não mostrado). Para confirmar que este efeito era específico, o SGH foi pré-incubado com soro anti-SGH antes de ser adicionado a cultura. Nesta condição, a produção de CCL2/MCP-1 foi completamente inibida (Fig. 4C) sugerindo que a atividade inflamatória induzida pelo SGH pode ser neutralizada por anticorpos específicos. A produção de CCL2/MCP-1 também foi visualizada no tecido que recobre a parede interna do bolsão de ar estimulado com SGH (Fig.4E), mas não após estimulação com salina (Fig. 4D).

Figura 4. Produção de CCL2/MCP-1 *in vitro* e *in vivo*. A produção de CCL2/MCP-1 (setas) detectada por imunohistoquímica após estimulação com SGH. Macrófagos J774 foram cultivados sem estímulo (A) ou tratados com SGH (0,5 µg/poço) (B) ou com SGH pré-incubado com soro anti-SGH de *L. longipalpis* (C) por oito horas. A produção de CCL2/MCP-1 também foi avaliada *in vivo* na parede interna de camundongos BALB/c após 12 horas observada nos animais estimulados com salina (D) ou SGH (E).



6.4. Inibição de CCL2/MCP-1

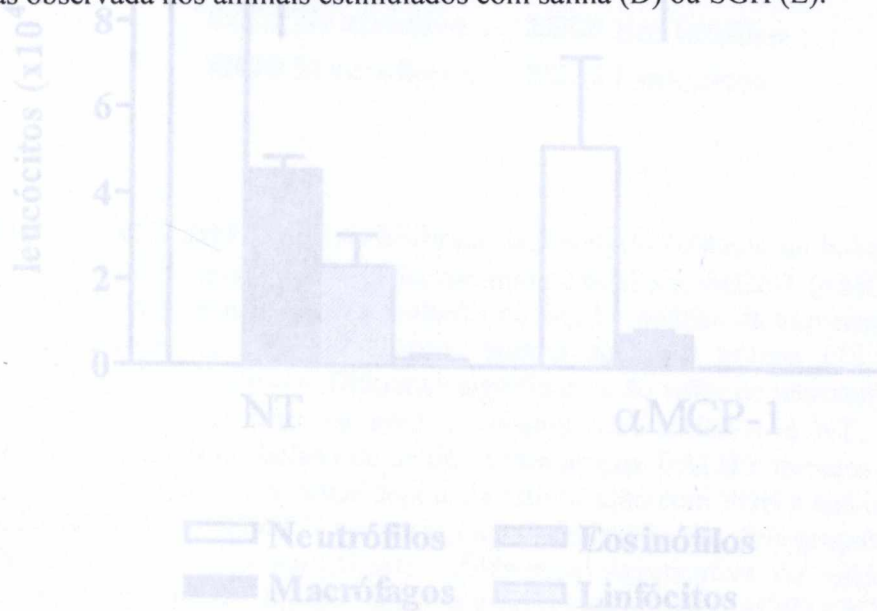
Para certificar que o recrutamento de macrófagos após estimulação com SGH é devido ao aumento de CCL2/MCP-1, um grupo de camundongos BALB/c foi previamente tratado com bindarit, um inibidor da síntese de CCL2/MCP-1, ou com anticorpo monoclonal anti-MCP-1. O tratamento com anticorpo anti-MCP-1 (Fig. 5A) ou com bindarit (Fig. 5B) resultou na inibição do recrutamento de macrófagos. O tratamento com anticorpo anti-MCP-1 resultou na inibição da expressão de CCL2/MCP-1 (Fig. 5C) e este resultado reforça o papel do CCL2/MCP-1 como quimioatratante responsável pelo aumento no recrutamento de macrófagos in vivo.



(A)

NT α MCP-1
CCL2/MCP-1

Figura 4. Produção de CCL2/MCP-1 *in vitro* e *in vivo*. A produção de CCL2/MCP-1 (setas) detectada por imunohistoquímica após estimulação com SGH. Macrófagos J774 foram cultivados sem estímulo (A) ou tratados com SGH (0,5 par/poço) (B) ou com SGH pré-incubado com soro anti-SGH de *L. longipalpis* (C) por oito horas. A produção de CCL2/MCP-1 também foi avaliada *in vivo* na parede interna de camundongos BALB/c após doze horas observada nos animais estimulados com salina (D) ou SGH (E).



6.4. Inibição de CCL2/MCP-1

Para certificar que o recrutamento de macrófagos após estimulação com SGH é devido ao aumento de CCL2/MCP-1, um grupo de camundongos BALB/c foi previamente tratado com bindarit, um inibidor da síntese de CCL2/MCP-1, ou com anticorpo monoclonal anti-MCP-1 neutralizante. O tratamento com anticorpo anti-MCP-1 (Fig. 5A) ou bindarit (Fig. 5B) resultou na redução significativa do recrutamento de macrófagos. O tratamento com bindarit e com o anticorpo anti-MCP-1 resultou na inibição da expressão de CCL2/MCP-1 (Fig. 5A e B). Este resultado reforça o papel do CCL2/MCP-1 como a quimiocinas responsável pelo aumento no recrutamento de macrófagos induzido pelo SGH em camundongos BALB/c.

(A)

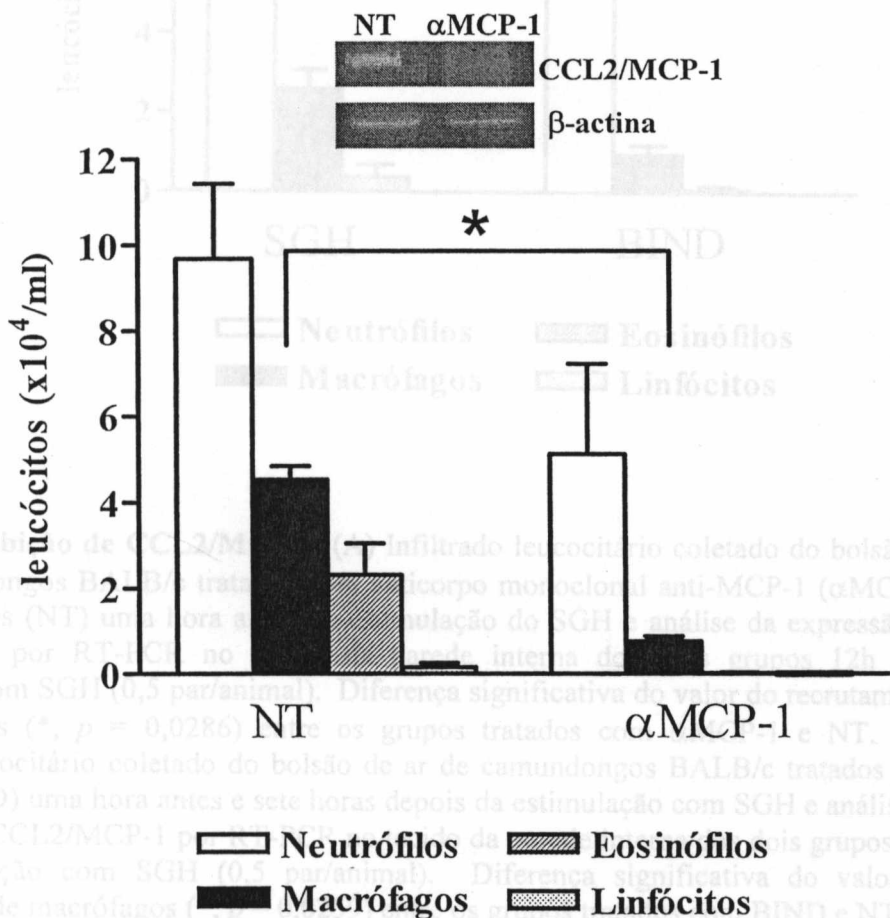


Figura 5. Inibição de CCL2/MCP-1 reduz o recrutamento de macrófagos. (A) Infiltrado leucocitário coletado do bolso de ar de camundongos BALB/c tratados com anticorpo monoclonal anti-MCP-1 (α MCP-1) ou não tratados (NT) uma hora antes da estimulação do SGH e análise da expressão de CCL2/MCP-1 por RT-PCR no tecido de interesse. Os grupos foram analisados 12h após estimulação com SGH (0,5 par/animal). Diferença significativa do valor do recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0286$) entre os grupos tratados com α MCP-1 e NT. (B) Infiltrado leucocitário coletado do bolso de ar de camundongos BALB/c tratados com bindarit (BIND) uma hora antes e sete horas depois da estimulação com SGH e análise da expressão de CCL2/MCP-1 por RT-PCR no tecido de interesse. Os grupos foram analisados 12h após estimulação com SGH (0,5 par/animal). Diferença significativa do valor do recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0286$) entre os grupos tratados com BIND e NT. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

(B)

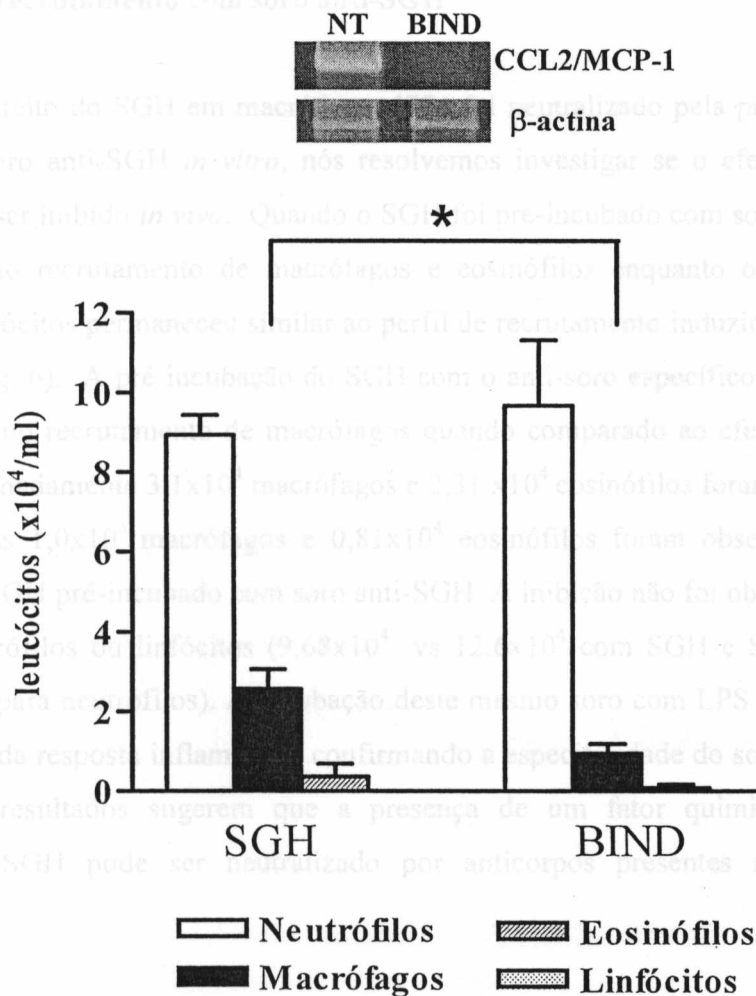


Figura 5. Inibição de CCL2/MCP-1. (A) Infiltrado leucocitário coletado do bolsão de ar de camundongos BALB/c tratados com anticorpo monoclonal anti-MCP-1 (α MCP-1) ou não-tratados (NT) uma hora antes da estimulação do SGH e análise da expressão de CCL2/MCP-1 por RT-PCR no tecido da parede interna dos dois grupos 12h após estimulação com SGH (0,5 par/animal). Diferença significativa do valor do recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0286$) entre os grupos tratados com α MCP-1 e NT. (B) Infiltrado leucocitário coletado do bolsão de ar de camundongos BALB/c tratados com bindarit (BIND) uma hora antes e sete horas depois da estimulação com SGH e análise da expressão de CCL2/MCP-1 por RT-PCR no tecido da parede interna dos dois grupos 12h após estimulação com SGH (0,5 par/animal). Diferença significativa do valor do recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0259$) entre os grupos tratados com BIND e NT. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

6.5. Inibição do recrutamento com soro anti-SGH

Como o efeito do SGH em macrófagos J774 foi neutralizado pela pré-incubação da saliva com soro anti-SGH *in vitro*, nós resolvemos investigar se o efeito do SGH também poderia ser inibido *in vivo*. Quando o SGH foi pré-incubado com soro anti-SGH houve redução no recrutamento de macrófagos e eosinófilos enquanto o número de neutrófilos e linfócitos permaneceu similar ao perfil de recrutamento induzido pelo SGH isoladamente (Fig. 6). A pré-incubação do SGH com o anti-soro específico resultou em 68% de redução no recrutamento de macrófagos quando comparado ao efeito do SGH. Enquanto aproximadamente $3,1 \times 10^4$ macrófagos e $2,31 \times 10^4$ eosinófilos foram recrutados pelo SGH apenas $1,0 \times 10^4$ macrófagos e $0,81 \times 10^4$ eosinófilos foram observados após estímulo com o SGH pré-incubado com soro anti-SGH. A inibição não foi observada com relação aos neutrófilos ou linfócitos ($9,68 \times 10^4$ vs $12,6 \times 10^4$ com SGH e SGH + soro, respectivamente para neutrófilos). A incubação deste mesmo soro com LPS não resultou na neutralização da resposta inflamatória confirmando a especificidade do soro anti-SGH (Fig. 6). Estes resultados sugerem que a presença de um fator quimiotático para macrófagos no SGH pode ser neutralizado por anticorpos presentes no anti-soro específico.

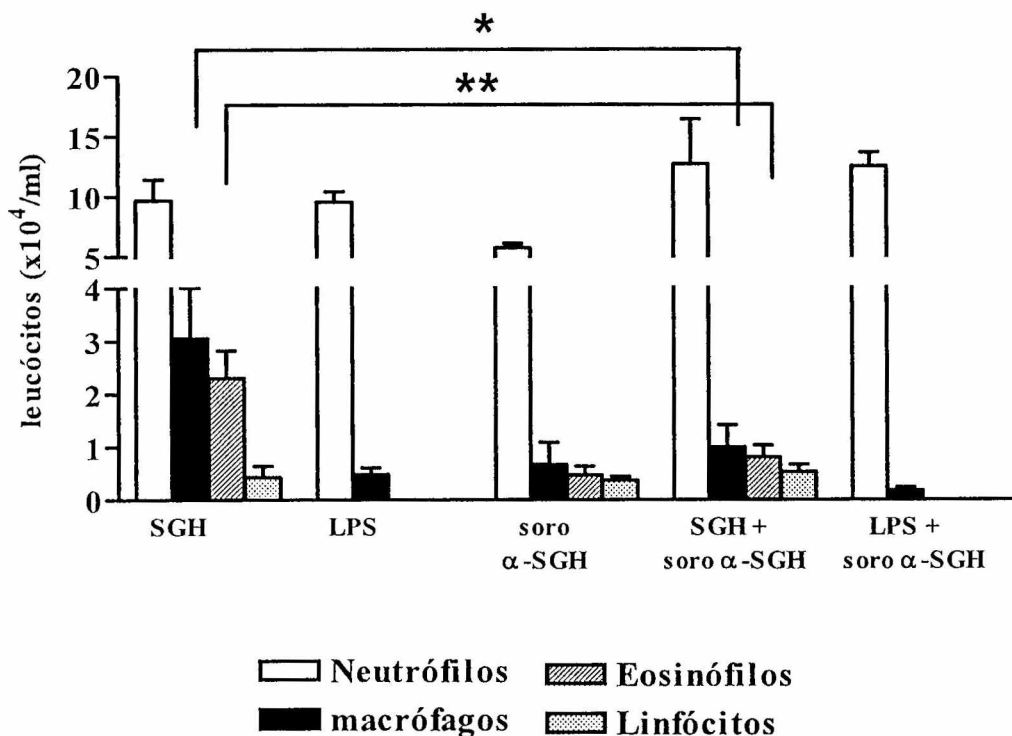
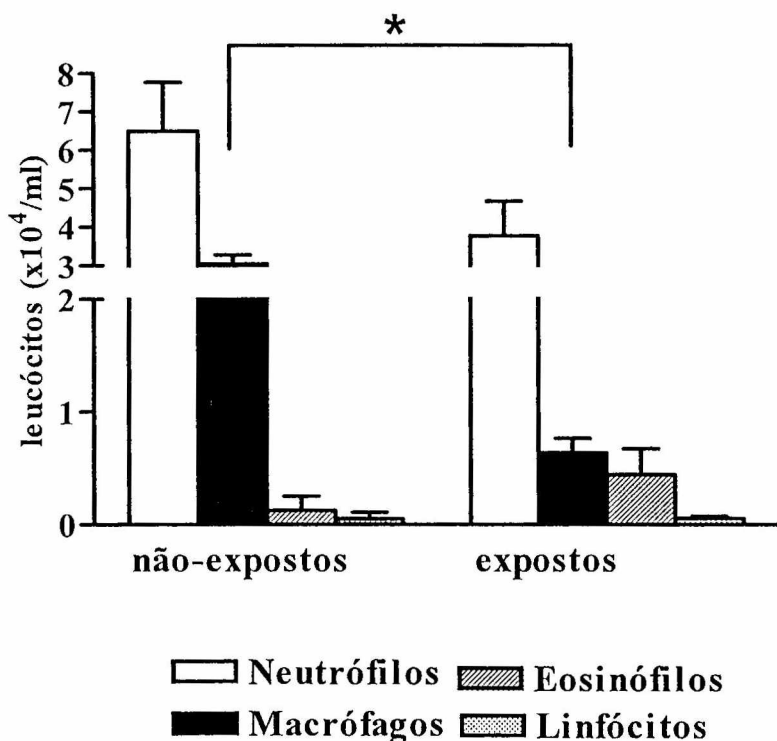


Figura 6. Inibição específica do recrutamento de macrófagos após estimulação com SGH. O bolsão de ar em camundongos BALB/c foi estimulado com LPS (20 µg/ml), SGH (0,5 par/animal), soro α-SGH, LPS ou SGH pré-incubado por 1h com soro anti-SGH. Diferença significativa entre o valor do recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0364$) e eosinófilos (**, $p = 0,0286$) entre os grupos estimulados com SGH e SGH + soro α-SGH.

6.6. Inibição do recrutamento induzido pelo SGH por anticorpos anti-SGH naturalmente induzidos

Para entender melhor o efeito dos anticorpos anti-SGH, testamos se a atividade quimiotática induzida pelo SGH também poderia ser inibido por anticorpos circulantes produzidos naturalmente em camundongos BALB/c após a pré-exposição a picadas de *L. longipalpis* não-infectados. O efeito quimiotático induzido pelo SGH foi drasticamente reduzido em camundongos pré-sensibilizados resultando em decréscimo no recrutamento de macrófagos (78.2% de inibição) enquanto os neutrófilos tiveram uma redução que não foi significativa (41.5% de inibição) (Fig. 7A). A expressão de CCL2/MCP-1 na parede interna do bolsão de ar nos animais expostos foi completamente inibida doze horas após a estimulação com SGH (Fig. 7B). Este resultado reforça a importância dos anticorpos anti-saliva produzidos pela exposição repetida a picadas do vetor na neutralização do recrutamento celular mediado pelo SGH.

(A)



(B) A atividade inflamatória do SGH de *L. longipalpis* é mediada por componente proteico

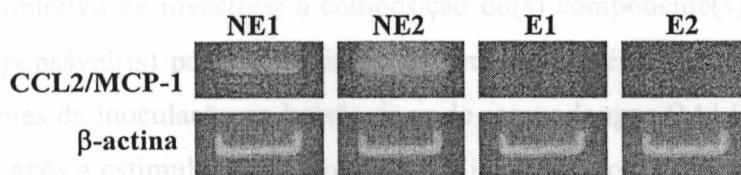


Figura 7. Inibição do efeito do SGH *in vivo* em camundongos BALB/c sensibilizados pela exposição a picadas de *L. longipalpis*. (A) Camundongos BALB/c foram expostos cinco vezes a picada de *L. longipalpis* (intervalo de 10 dias). Dez dias após a última exposição o bolsão de ar foi induzido e estimulado com SGH (0,5 par/animal). Diferença significativa entre o recrutamento de macrófagos (*, $p = 0,0366$) entre o grupo de expostos e os não-expostos. (B) Análise da expressão de CCL2/MCP-1 por RT-PCR do tecido que recobre a parede interna do bolsão de ar dos animais expostos (E) e não-expostos (NE) 12h após a estimulação com SGH. O resultado é representativo de pelo menos três experimentos.

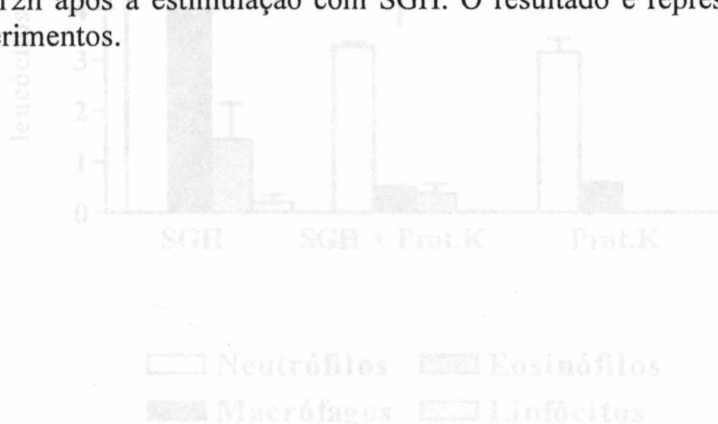


Figura 8: Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c estimulado com SGH previamente tratado com Proteinase K. Exudato inflamatório no bolsão de camundongos BALB/c estimulado com SGH, SGH tratado com Proteinase K (SGH + Prot.K) e Proteinase K (Prot.K) após 12h. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo. Diferença significativa (*, $p = 0,0286$) entre o valor do grupo estimulado com SGH e o estimulado com SGH + Proteinase K para macrófagos e neutrófilos.

6.7. A atividade inflamatória do SGH de *L. longipalpis* é mediado por componente protéico

Com o objetivo de investigar a composição do(s) componente(s) da saliva de *L. longipalpis* responsável(is) por sua atividade inflamatória, pré-incubamos o SGH com Proteinase K antes da inoculação no bolsão de ar de camundongos BALB/c. Observamos que doze horas após a estimulação com o SGH pré-incubado com a Proteinase K ocorreu uma redução no número total de leucócitos recrutados para o bolsão de ar. Analisando as sub-populações de leucócitos detectamos uma redução significativa no recrutamento de neutrófilos e macrófagos (Fig. 8). Este resultado sugere que o efeito do SGH no recrutamento leucocitário é induzido por componente(s) protéico(s).

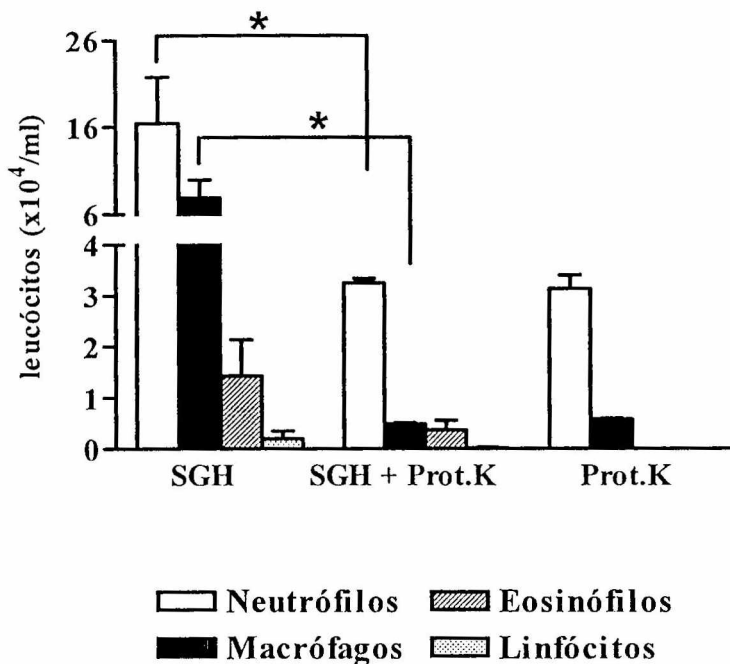


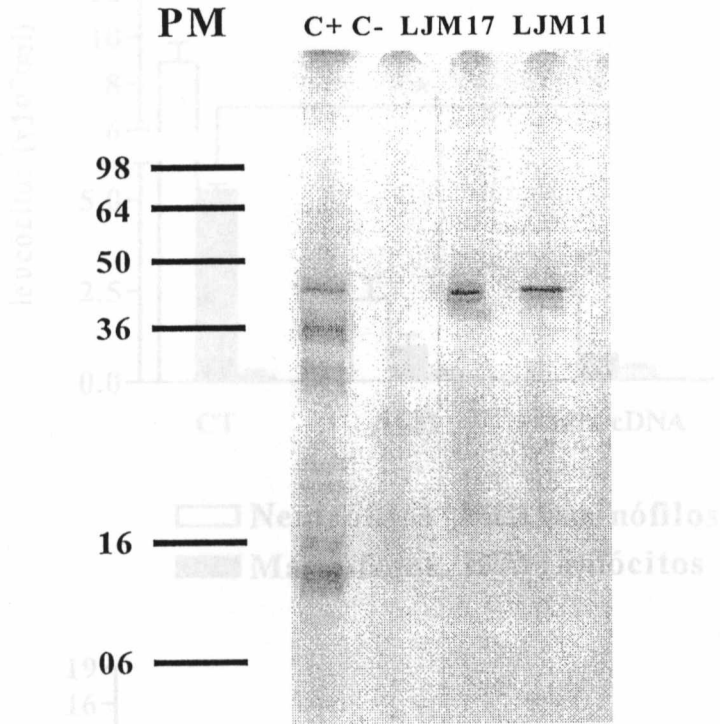
Figura 8: Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c estimulado com SGH previamente tratado com Proteinase K. Exudato inflamatório no bolsão de camundongos BALB/c estimulado com SGH, SGH tratado com Proteinase K (SGH + Prot.K) e Proteinase K (Prot.K) após 12h. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo. Diferença significativa (*, $p = 0.0286$) entre o valor do grupo estimulado com SGH e o estimulado com SGH + Proteinase K para macrófagos e neutrófilos.

6.8. Avaliação da imunização com construções de cDNA da saliva de *L. longipalpis* na neutralização do efeito do SGH

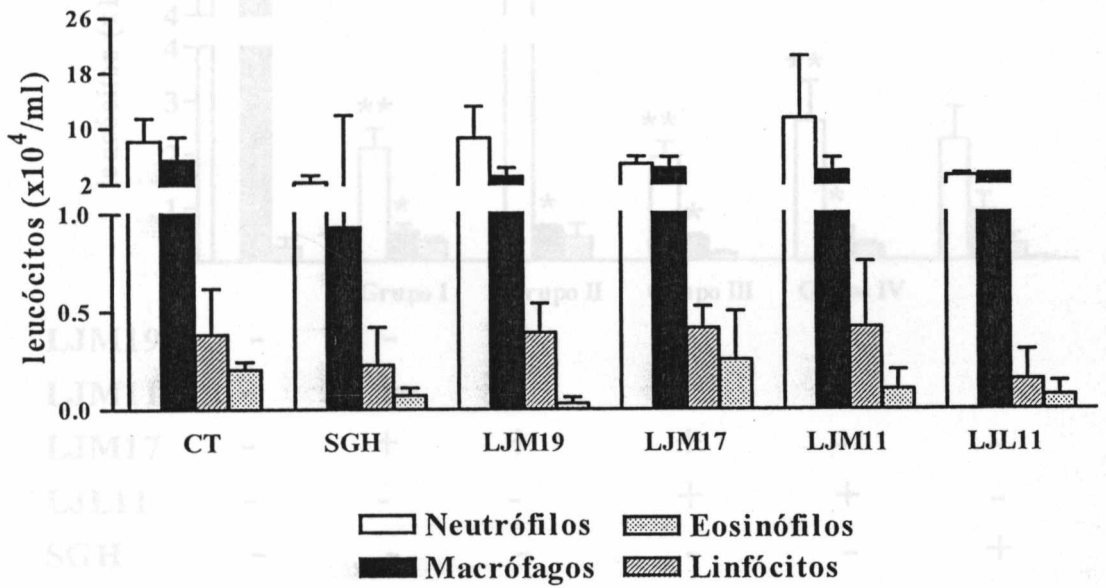
Como observamos a inibição do recrutamento induzido pelo SGH em animais expostos a picadas de *L. longipalpis* não infectados, decidimos investigar se a imunização contra construções de cDNA específicos para a saliva de *L. longipalpis* também seria capaz de neutralizar o recrutamento do SGH. Os animais foram submetidos a 3 imunizações com 10 μ g (i.d.) dos cDNA LJL19, LJM11, LJM17 ou LJL11 que codificavam para os componentes proteicos da saliva de 11kDa, 44kDa e 45kDa (família de proteínas “yellow” da saliva de *L. longipalpis*) e 61kDa, respectivamente. Os cDNA foram administrados isoladamente, em combinação em grupos ou todos juntos (mix de cDNA) com intervalos de 10 dias. Dez dias após a última imunização, coletamos soro dos animais para avaliar a produção de anticorpos IgG específicos anti-SGH. Dos grupos imunizados com os cDNA isoladamente apenas os imunizados com LJM11 e LJM17 induziram a produção de IgG anti-SGH (dados não-mostrados). O soro dos animais destes grupos também reconheceu banda específicas equivalentes as proteínas de 44 e 45kDa da saliva total de *L. longipalpis* respectivamente, como observado por Western Blot (Fig. 9A).

Após a imunização os animais foram desafiados com o SGH no bolsão de ar. Nos grupos imunizados com os cDNA isoladamente não houve inibição da atividade inflamatória do SGH sugerindo o possível envolvimento de mais de um componente da saliva. Quando todos os cDNA foram combinados na imunização de um novo grupo de animais (mix de cDNA), houve uma redução significativa do recrutamento celular de forma semelhante aos animais imunizados com o SGH (Fig. 9C). Resolvemos então, combinar os cDNA em grupos menores para detectar quais moléculas estariam sendo envolvidas neste fenômeno. Após desafio com o SGH, observamos a redução significativa no recrutamento de neutrófilos e macrófagos nos grupos I, III e IV semelhante ao observado no grupo imunizado com o SGH. Estes resultados sugerem que a atividade inflamatória do SGH seria mediado por mais de um componente da saliva já que apenas a imunização com a combinação dos cDNA foi capaz de neutralizar sua atividade.

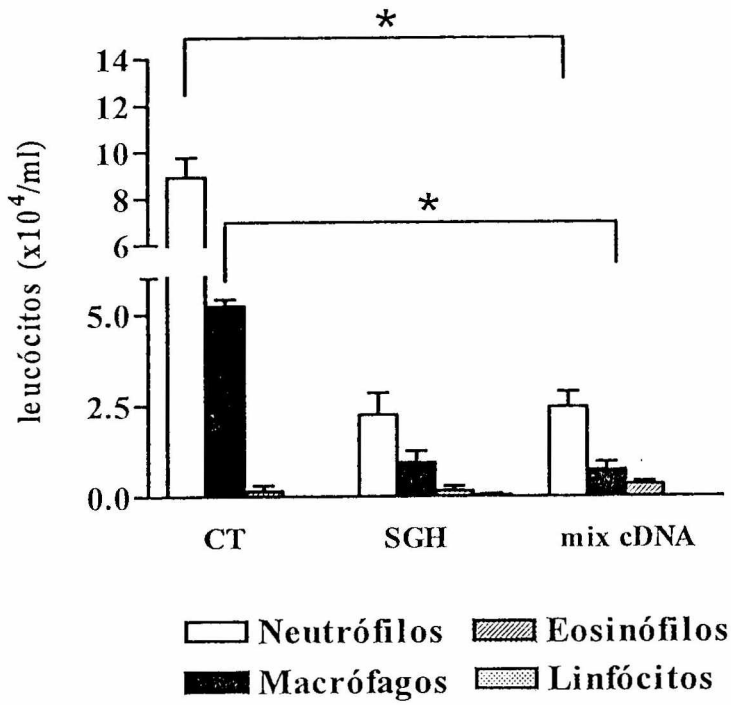
(A)



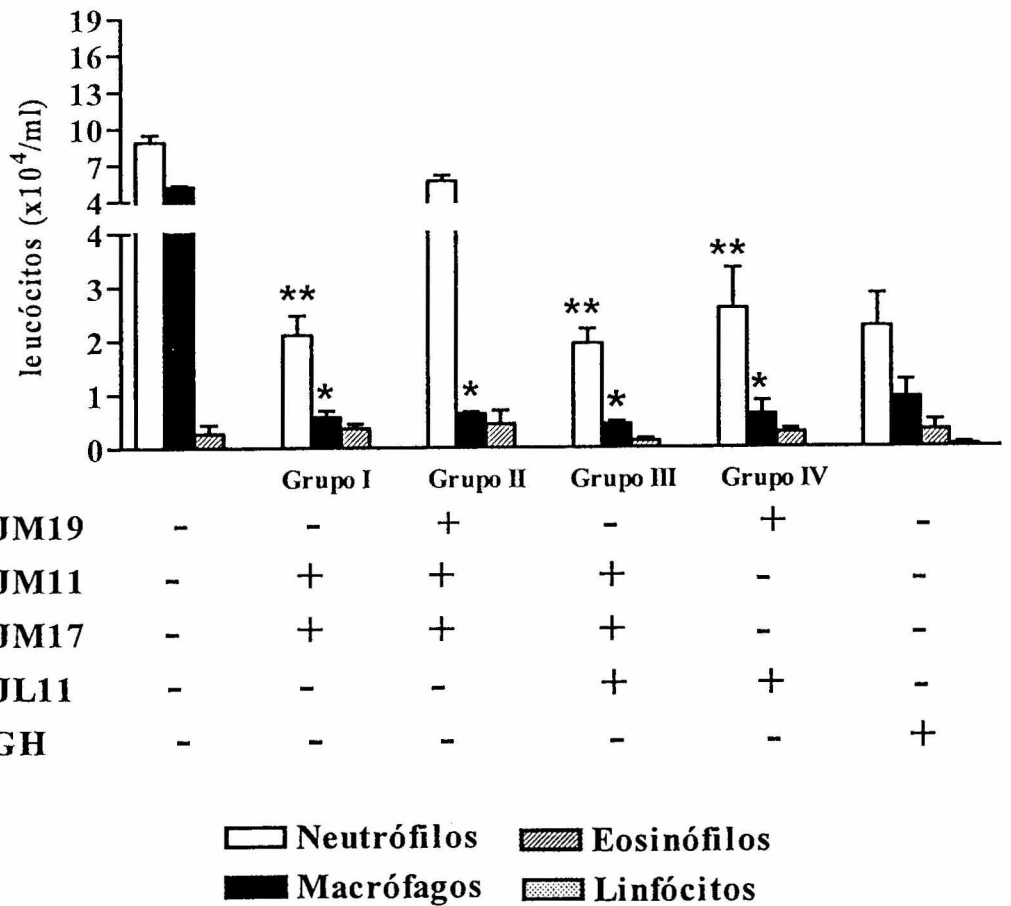
(B)



(C)



(D)



	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	
LJM19	-	+	-	+	-
LJM11	+	+	+	-	-
LJM17	+	+	+	-	-
LJL11	-	-	+	+	-
SGH	-	-	-	-	+

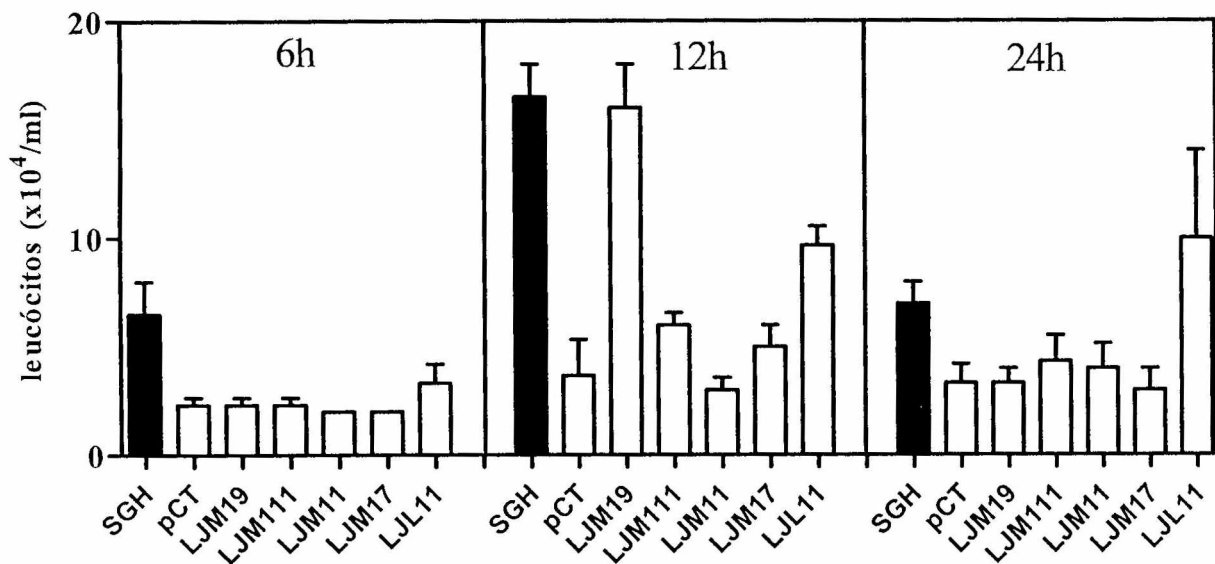
Figura 9. Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c imunizados com construções de cDNA da saliva de *L. longipalpis*. (A) Western Blot dos soros de camundongos imunizados com LJM17 ou LJM11. O soro de camundongos sensibilizados a picadas de *L. longipalpis* não-infectados foi utilizado como controle positivo (C+) e o soro de camundongos não-expostos foi utilizado como controle negativo (C-). Recrutamento celular no bolsão de ar induzido pelo SGH em camundongos imunizados com (B) os cDNA isoladamente, (C) com os cDNA em combinação (mix cDNA) ou (D) em grupos. Um grupo de animais não imunizados (CT) e imunizados com SGH (SGH) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Diferença significativa (*, $p = 0.0357$) no número de neutrófilos e macrófagos entre os grupos CT e mix cDNA e também entre o número de neutrófilos (*, $p = 0,0286$) entre o controle (CT) e os Grupos I, III e IV e macrófagos (**, $p = 0,0286$) nos Grupos I, II, III e IV. Todos os grupos foram estimulados com SGH (0,5 par) e após 12h o exudato coletado para determinação da contagem total e diferencial dos leucócitos. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

6.9. Avaliação do papel das construções de cDNA da saliva de *L. longipalpis* no recrutamento celular *in vivo*

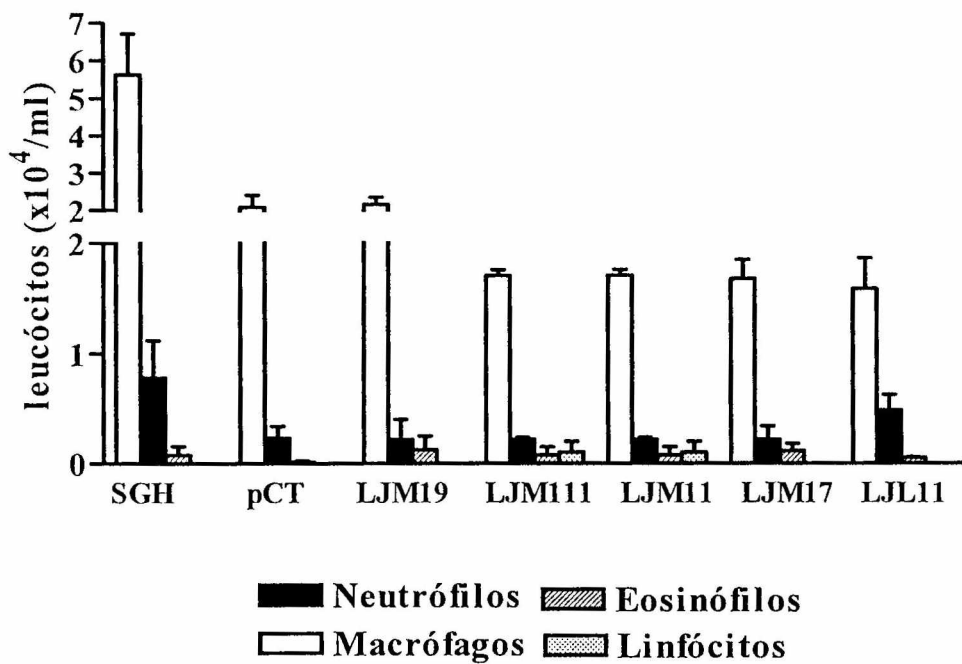
Após a observação que a imunização com a combinação das construções de cDNA testadas resultou na inibição do recrutamento induzido pelo SGH, avaliamos se os próprios cDNA utilizados como estímulo seriam capazes de induzir atividade inflamatória semelhante à induzida pela saliva total (SGH). Dez microgramas dos cDNA (LJM19, LJM111, LJM11, LJM17 e LJL11) foram inoculados no momento da indução do bolsão de ar de camundongos BALB/c e o exudato coletado após 6, 12 e 24 horas. Inicialmente observamos que após 6 horas, nenhum dos cDNA foi capaz de induzir resposta inflamatória significativa. Entretanto, após 12 horas, os cDNA LJM19 e LJL11 apresentaram um aumento no número total de leucócitos. Neste ponto de avaliação, a resposta induzida pelo LJM19 foi semelhante a induzida pelo SGH. Após 24 horas, observamos que o recrutamento celular permaneceu elevado apenas no grupo estimulado com LJL11 enquanto que nos demais grupos ocorreu uma redução no número total de leucócitos recrutados (Fig.10A).

Quanto a composição do exudato leucocitário nos tempos avaliados, observamos que após 6 horas, neutrófilos eram as células predominantes nos exudatos sem diferença significativa entre os grupos estimulados com os cDNA (Fig. 10B). Já no tempo de 12 horas, onde detectamos o pico de recrutamento celular com o SGH, observamos um aumento no número de macrófagos recrutados nos grupos estimulados com LJM19 e LJL11 semelhante ao observado no grupo estimulado com SGH (Fig. 10C). No último tempo avaliado (24h) ocorre uma queda nas populações de leucócitos recrutadas com exceção do grupo estimulado com LJL11 que apresentou um aumento no número de neutrófilos e macrófagos recrutados de forma semelhante ao SGH (Fig. 10D).

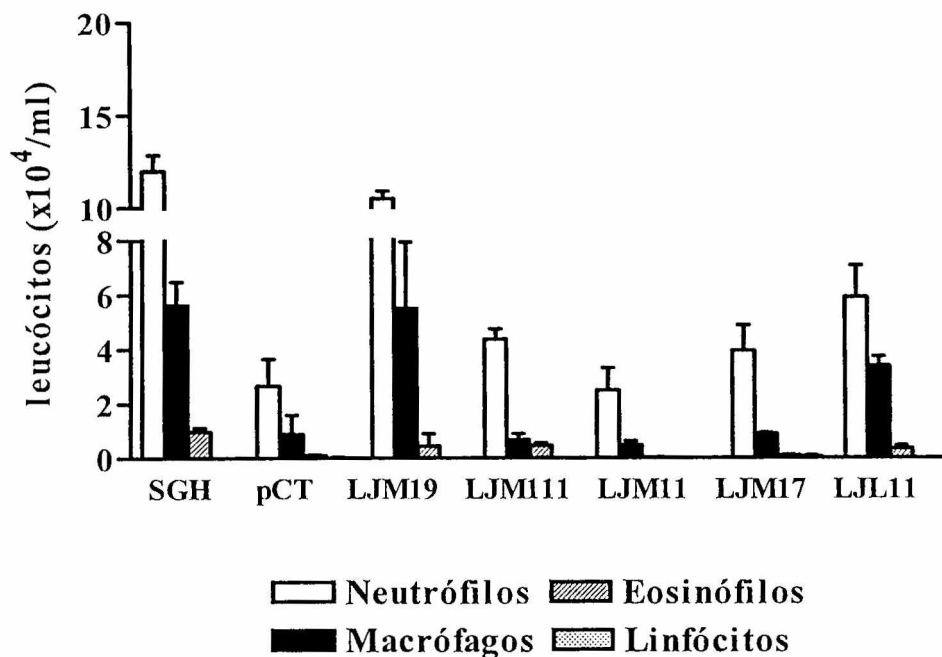
(A)



(B)



(C)



(D)

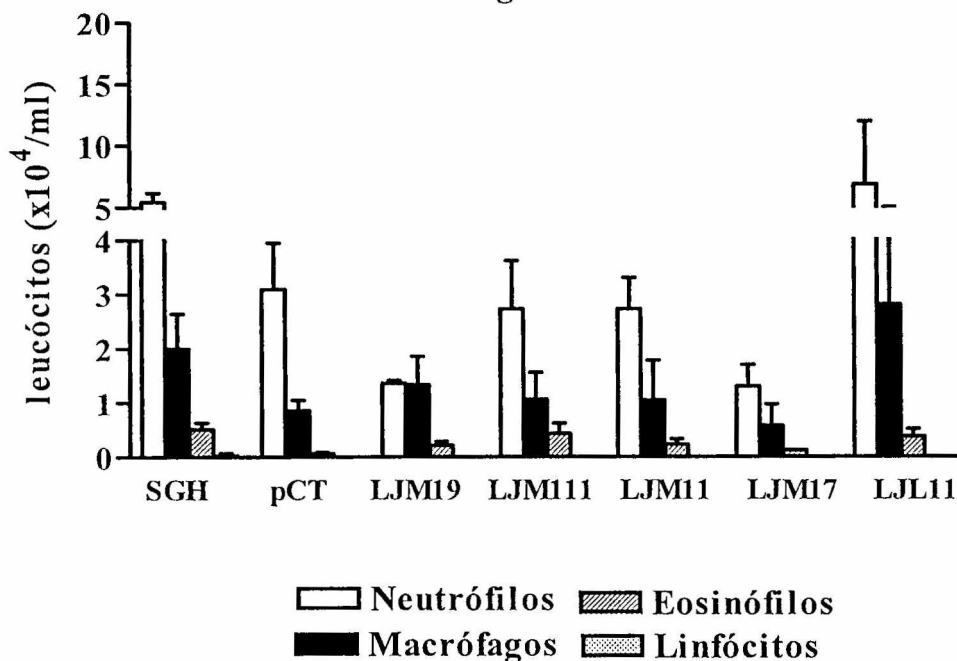


Figura 10. Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c estimulados com construções de cDNA da saliva de *L. longipalpis*. O bolsão de ar induzido em camundongos BALB/c foi estimulado diretamente com os cDNA isoladamente (LJM19, LJM111, LJM11, LJM17 e LJL11), SGH ou plasmídeo vazio (pCT). O exudato foi coletado para determinação da contagem total (A) e diferencial após (B) 6, (C) 12 e (D) 24 horas. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

6.10. Avaliação do papel das proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* no recrutamento celular *in vivo*

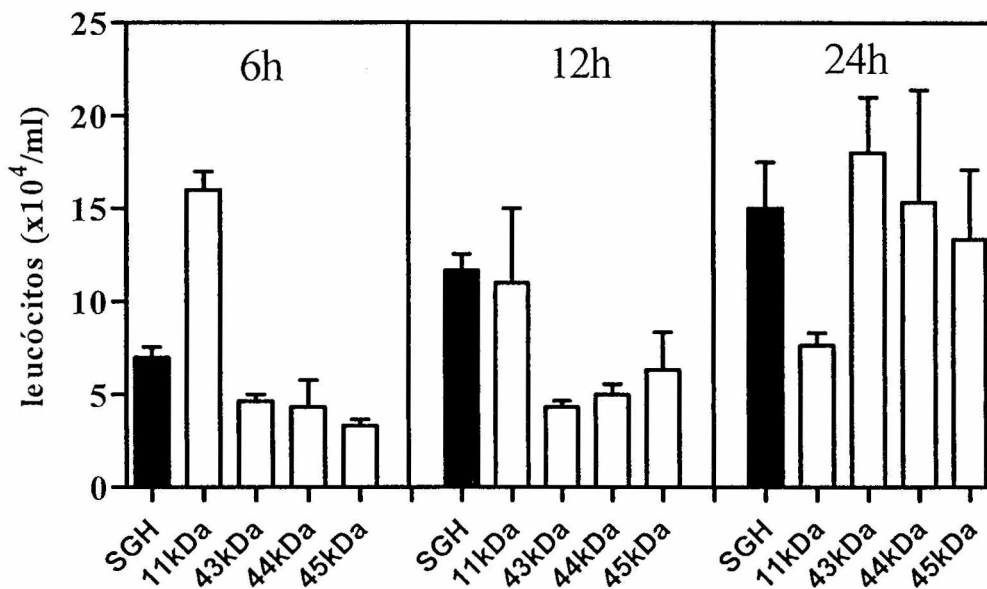
Com o mesmo objetivo de avaliar qual(is) seria(m) a(s) molécula(s) responsável(is) pela atividade inflamatória induzida pela saliva total (SGH), testamos o efeito de proteínas recombinantes no recrutamento celular. Os recombinantes de 11kDa, 43kDa, 44kDa e 45kDa foram utilizados como estímulo (100ng) no momento da indução do bolsão de ar por 6, 12 e 24 horas.

Quanto ao número total de leucócitos recrutados, observamos que logo após 6 horas ocorre um pequeno recrutamento celular induzido pelos recombinantes com exceção do 11kDa, que induziu recrutamento celular ($16 \times 10^4/\text{ml}$) superior ao grupo SGH controle ($7 \times 10^4/\text{ml}$). No tempo de 12 horas, apenas o grupo estimulado com o recombinante de 11kDa apresentou recrutamento celular semelhante ao induzido pelo SGH, enquanto o recrutamento induzido pelos demais recombinantes permaneceu sem alteração significativa. Entretanto, no último tempo avaliado (24 horas), ocorreu um aumento no número total de leucócitos recrutado pelos recombinantes 43kDa, 44kDa e 45kDa (família de proteínas “yellow” da saliva de *L. longipalpis*) semelhante ao encontrado com o SGH, enquanto o recrutamento induzido pelo recombinante de 11kDa foi reduzido neste tempo (Fig. 11A).

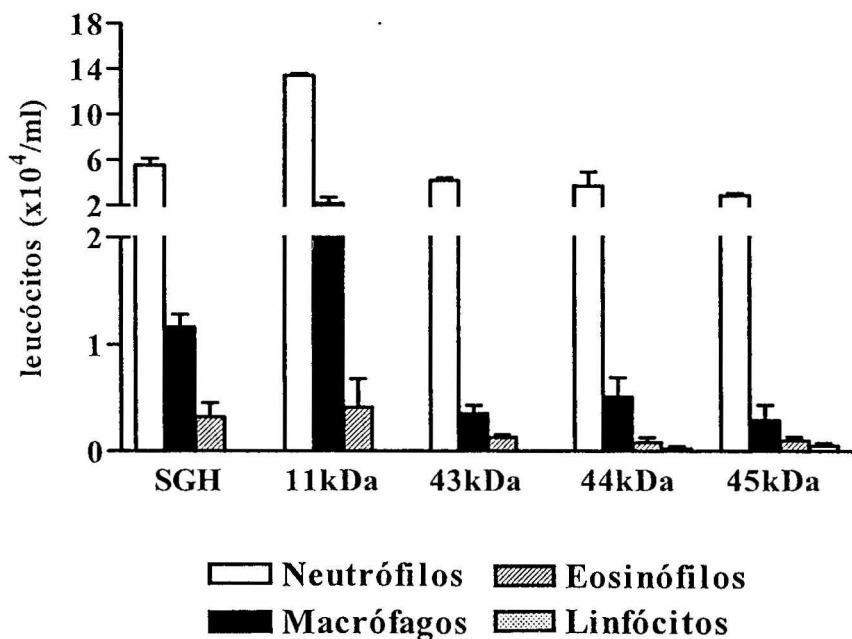
Na análise da composição de cada exudato observamos que no tempo de 12 horas apenas o grupo estimulado com o recombinante de 11kDa apresentou um recrutamento composto por neutrófilos e macrófagos e eosinófilos semelhante ao SGH, enquanto os demais recombinantes induziram recrutamento composto basicamente de neutrófilos e uma pequena quantidade de macrófagos e eosinófilos (Fig. 11B). No tempo de doze horas ocorreu um aumento no número de macrófagos recrutado pelos recombinantes onde apenas o recombinante de 11kDa apresentou novamente uma resposta semelhante a composição encontrada no SGH (Fig. 11C). No último ponto avaliado, o recrutamento de neutrófilos induzido pelo recombinante de 11kDa é reduzido enquanto o número de macrófagos permanece constante e ainda semelhante ao SGH. Nos demais grupos estimulados com os recombinantes de 43kDa, 44kDa e 45kDa detectamos um aumento no número de neutrófilos e macrófagos recrutados. Neste ponto de avaliação o grupo estimulado com o recombinante de 43kDa apresentou perfil de recrutamento semelhante

ao do SGH enquanto que no grupo estimulado com o recombinante de 45kDa apresentou um recrutamento de neutrófilos e macrófagos superior ao encontrado para o SGH (Fig. 11D).

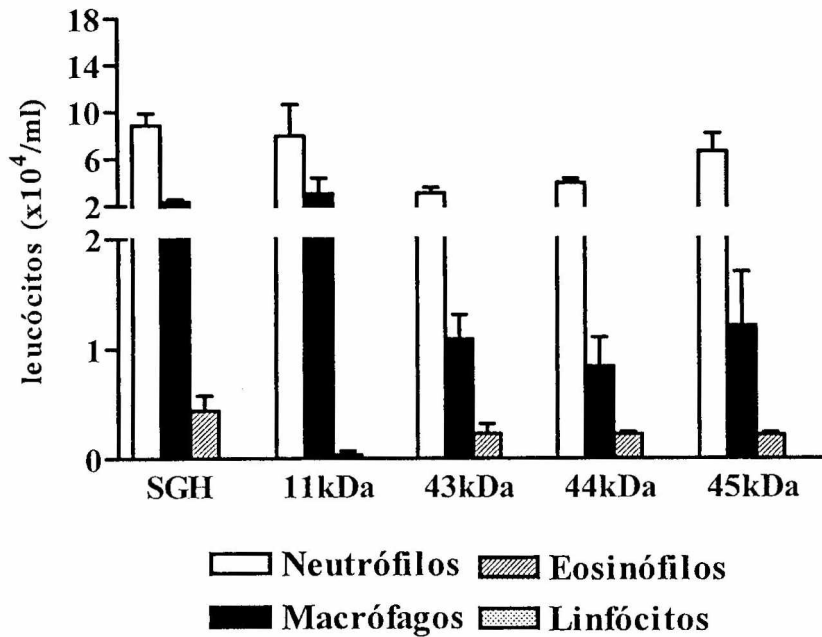
(A)



(B)



(C)



(D)

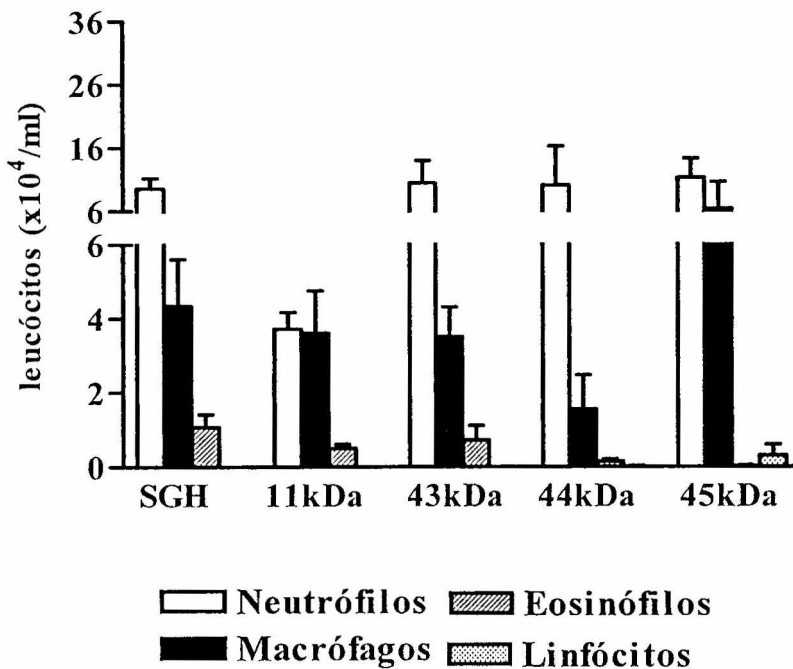
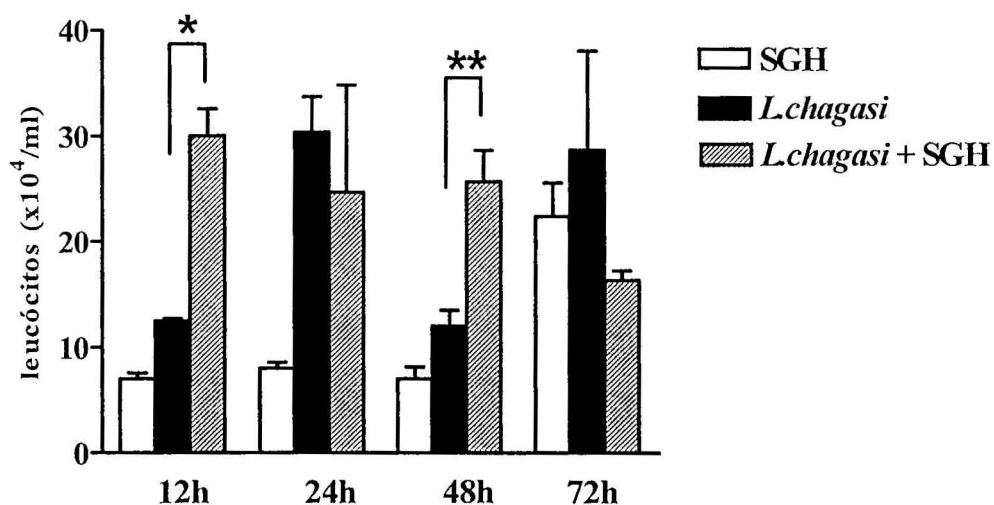


Figura 11. Infiltração leucocitária no bolsão de ar de camundongos BALB/c estimulados com proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis*. O bolsão de ar induzido em camundongos BALB/c foi estimulado diretamente com as proteínas recombinantes isoladamente (11kDa, 43kDa, 44kDa e 45kDa) ou SGH. O exudato foi coletado para determinação da contagem total (A) e diferencial após (B) 6, (C) 12 e (D) 24 horas. Os valores representam a média \pm SEM de 4 animais por grupo.

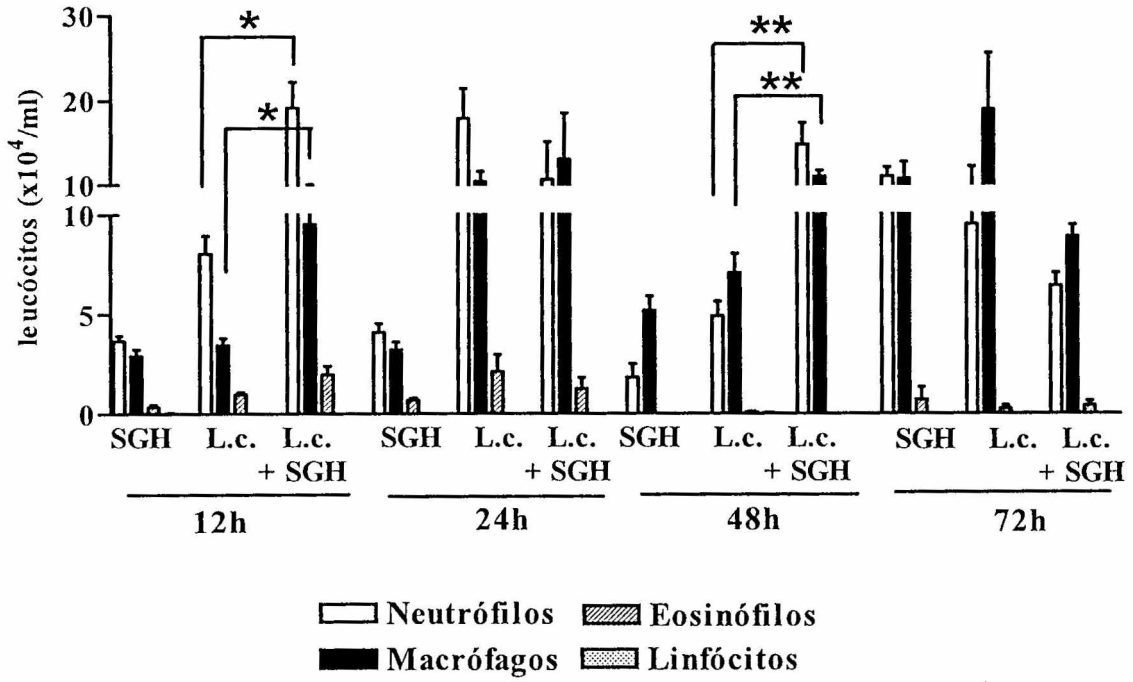
6.11. Efeito do SGH no recrutamento celular induzido pela *L. chagasi* in vivo

Como a *L. chagasi* é inoculada no local do repasto sanguíneo juntamente com a saliva do vetor, avaliamos a capacidade do SGH de *L. longipalpis* em modular a resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi*. Doze horas após a inoculação, foi possível observar que o exudato inflamatório apresentava um aumento significativo no número total de leucócitos recrutados quando o parasita foi inoculado junto com o SGH superior ao recrutamento induzido pelo SGH e *L. chagasi* isoladamente (Fig. 12A e C). Este efeito foi ainda mais evidente após 72 horas em C57BL/6 (Fig. 12C) o que não foi observado em BALB/c (Fig. 12D) neste mesmo tempo (76×10^4 e 16×10^4 /ml, respectivamente). Em todos os tempos avaliados, observamos que tanto o SGH quanto a *L. chagasi* induziram o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos em camundongos BALB/c e C57BL/6 (Fig. 12B e D). A combinação da *L. chagasi* com o SGH resultou em uma resposta inflamatória significativa no número total de leucócitos recrutados, principalmente quanto a neutrófilos e macrófagos após 12 e 48 horas em BALB/c e 12h em C57BL/6. Estes resultados sugerem que a saliva exerceria um efeito aditivo na resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi*.

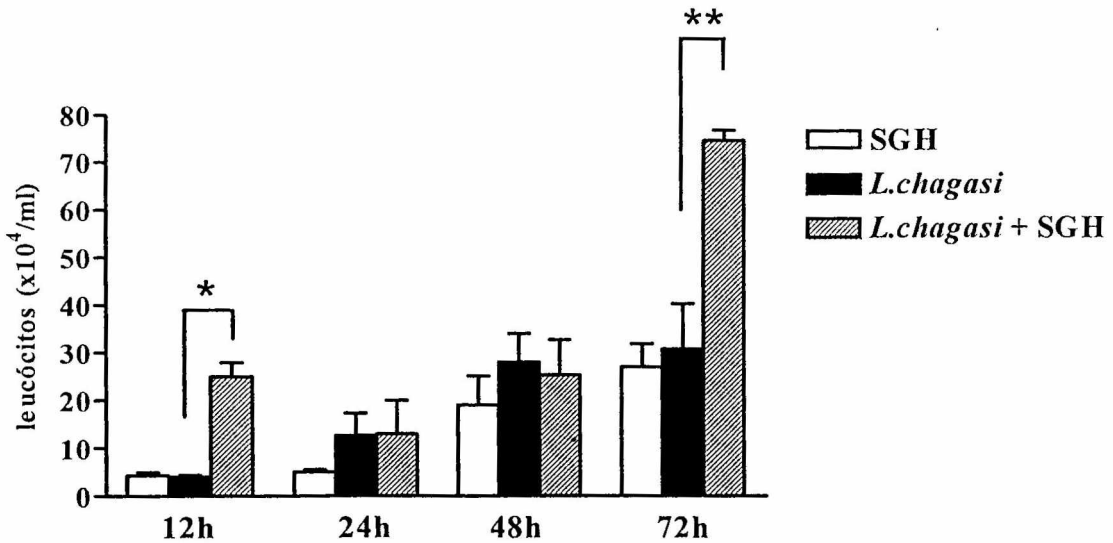
(A)



(B)



(C)



(D)

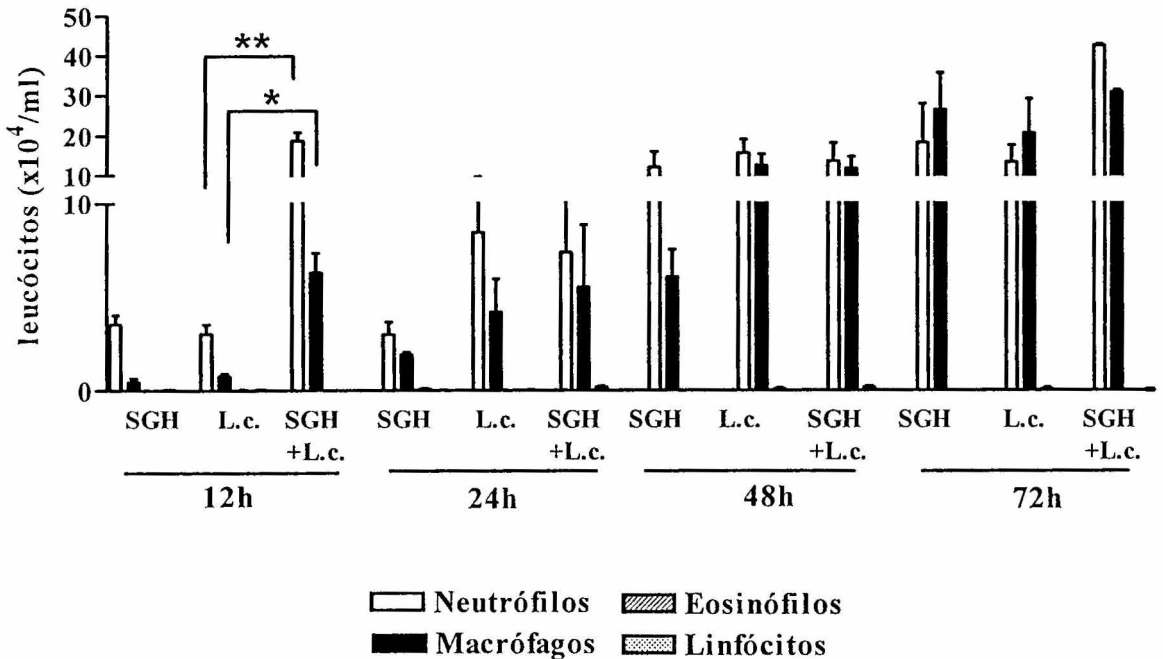


Figura 12. Efeito do SGH no recrutamento induzido pela *Leishmania chagasi* em camundongos BALB/c e C57BL/6. O bolsão foi estimulado com SGH (0,5 par), *L. chagasi* (10⁶ metacíclicas) ou *L. chagasi* + SGH por 12, 24, 48 e 72 horas de camundongos BALB/c (A e B) e C57BL/6 (C e D). Diferença significativa em (A) entre os grupos estimulados com *L. chagasi* e *L. chagasi* + SGH após 12h (*, $p = 0,0114$) e 48h (**, $p = 0,0273$); (B) número de neutrófilos e macrófagos entre os grupos estimulados com *L. chagasi* e *L. chagasi* + SGH após 12h (*, $p = 0,0273$) e 48h (**, $p = 0,0273$); (C) entre os grupos estimulados com *L. chagasi* e *L. chagasi* + SGH após 12h (*, $p = 0,0223$) e 72h (**, $p = 0,0241$) e (D) número de neutrófilos (**, $p < 0,0001$) e macrófagos (*, $p = 0,0154$) entre os grupos estimulados com *L. chagasi* e *L. chagasi* + SGH após 12h. Os valores representam a média \pm SEM do número total e diferencial de leucócitos recrutados para o bolsão de ar.

6.12. Avaliação da expressão de quimiocinas induzido pela *L. chagasi* na presença do SGH

Com a observação que a saliva de *L. longipalpis* é capaz de modificar a resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi* induzindo o recrutamento de um maior número de leucócitos, decidimos em seguida avaliar quais quimiocinas estariam envolvidas nesta resposta. Nos pontos de avaliação da cinética (12, 24, 48 e 72 horas) o tecido que reveste a parede interna do bolsão de ar foi retirado para extração de RNA e avaliação da expressão das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CCL11/eotaxina, CXCL1/KC e CCR2. Com os resultados obtidos, foi possível observar que o SGH induziu um padrão de expressão de quimiocinas diferente em camundongos BALB/c e C57BL/6 quando o SGH era combinado com a *L. chagasi*

Quanto às quimiocinas que recrutam preferencialmente macrófagos, podemos observar que o CCL2/MCP-1 foi induzido pela *L. chagasi* isoladamente apenas em C57BL/6 após 72 horas. Entretanto, quando o parasita foi co-inoculado com o SGH, detectamos CCL2/MCP-1 em BALB/c (24, 48 e 72 h) e C57BL/6 (12, 48 e 72h). Com relação a CCL4/MIP-1 β , observamos que em BALB/c nos tempos de 12 e 24 horas ocorreu uma inibição da expressão desta quimiocina quando o parasita era combinado com o SGH, o que não foi observado em C57BL/6, onde CCL4/MIP-1 β também foi expressa na presença do SGH. Não foi observada nenhuma expressão de CCL5/RANTES nos tempos avaliados.

Quanto às quimiocinas recrutadoras de granulócitos, observamos que em BALB/c enquanto CXCL1/KC era expresso 24 e 48 horas em todos os grupos. A CCL11/eotaxina foi expressa após 72 horas quando os estímulos foram co-inoculados (*L.c.*+ SGH). Um padrão diferente foi encontrado em C57BL/6 onde CXCL1/KC foi expresso após 72 horas, enquanto CCL11/eotaxina foi expressa em todos os tempos avaliados com exceção do ponto de 72 horas. Estes resultados sugerem que também ocorre a modificação do perfil de expressão de quimiocinas quando a *L. chagasi* é inoculada com o SGH no modelo do bolsão de ar, resultando consequentemente em um padrão de recrutamento diferenciado para o local da picada do vetor.

(A)

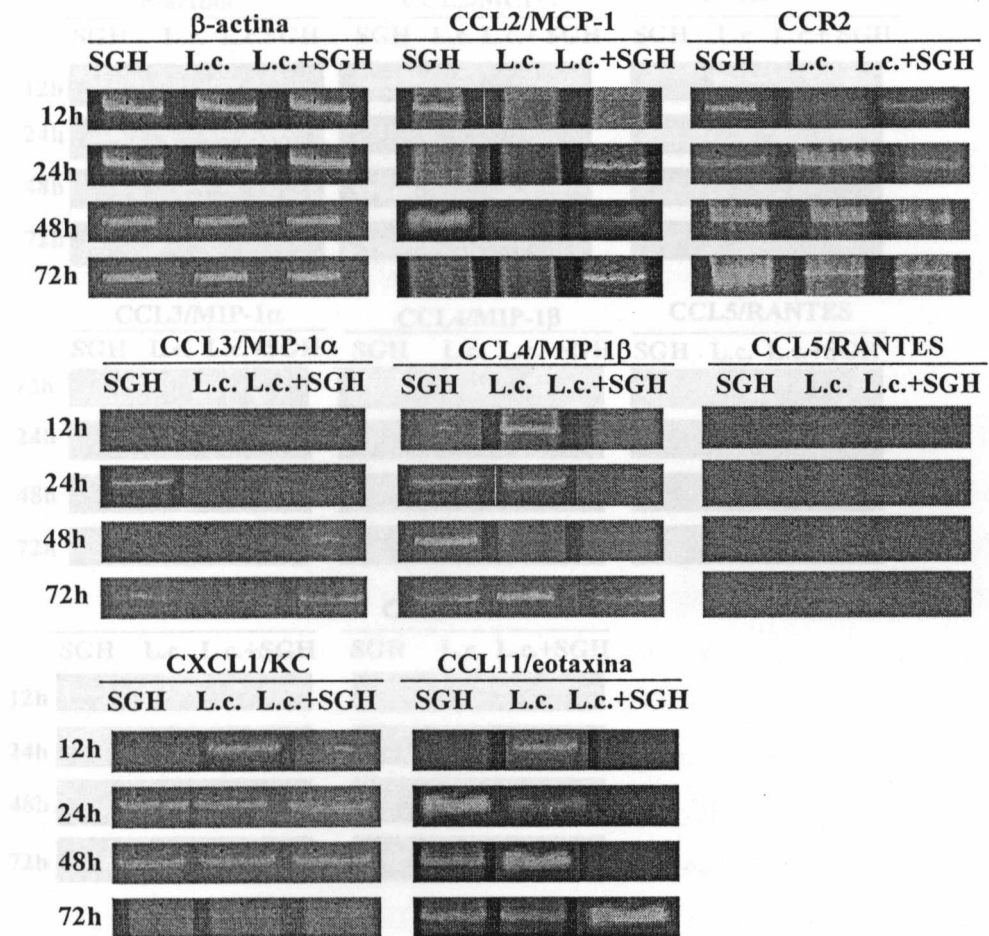


Figura 13. Expressão de quimiocinas induzido pelo SGH e *L. chagasi*. Análise por RT-PCR da expressão de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CXCL1/KC, CCL11/eotaxina e CCR2 na parede interna do bolso de ar de camundongos BALB/c (A) e C57Bl/6 (B) após estimulação com SGH (0,5 μ l/animal), *L. chagasi* (10⁷ metacistos) ou *L. chagasi* + SGH por 12, 24, 48 e 72 horas.

(B) INCISSADA

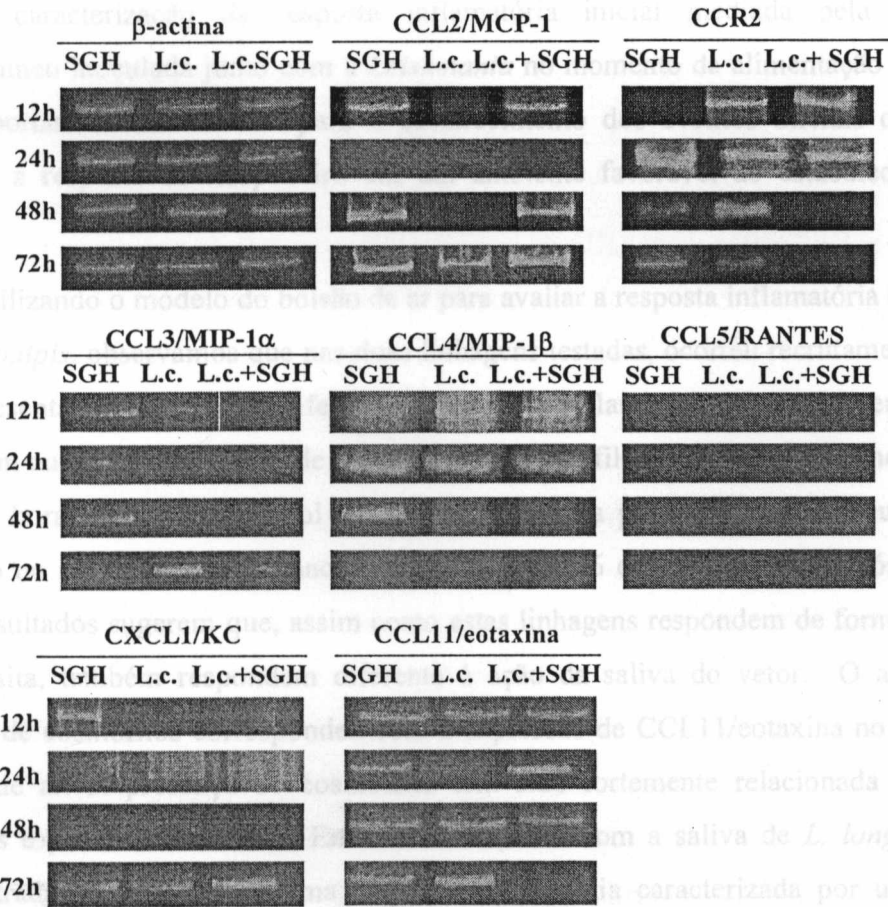


Figura 13. Expressão de quimiocinas induzido pelo SGH e *L. chagasi*. Análise por RT-PCR da expressão de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CXCL1/KC, CCL11/eotaxina e CCR2 na parede interna do bolsão de ar de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) após estimulação com SGH (0,5 par/animal), *L. chagasi* (10⁶ metacíclicas) ou *L. chagasi* + SGH por 12, 24, 48 e 72 horas.

7 DISCUSSÃO

A caracterização da resposta inflamatória inicial mediada pela saliva do flebotômico inoculada junto com a *Leishmania* no momento da alimentação sangüínea, tem importância fundamental para o esclarecimento dos eventos iniciais que podem modular a resposta do hospedeiro em um ambiente favorável ao estabelecimento do parasita.

Utilizando o modelo do bolsão de ar para avaliar a resposta inflamatória do SGH de *L. longipalpis*, observamos que nas duas linhagens testadas, ocorreu recrutamento celular que apresentava composição diferente do exudato inflamatório. Enquanto em BALB/c houve um aumento no número de macrófagos e eosinófilos recrutados atingindo um pico após 12 horas, em C57BL/6 foi detectada a presença predominante de neutrófilos. O aumento no recrutamento de macrófagos em C57BL/6 ocorreu somente após 24 horas. Estes resultados sugerem que, assim como estas linhagens respondem de forma diferente ao parasita, também respondem diferente à ação da saliva do vetor. O aumento no número de eosinófilos correspondeu com a expressão de CCL11/eotaxina no interior do bolsão de ar. A presença de eosinófilos tem sido fortemente relacionada às reações alérgicas e picadas de insetos. Em cães inoculados com a saliva de *L. longipalpis* foi demonstrada a formação de uma resposta inflamatória caracterizada por uma intensa eosinofilia (PARANHOS et al., 1993). Os eosinófilos também foram observados no processo inflamatório que se desenvolveu no local de imunização com a proteína recombinante de 15 kDa de *P. papatasi* e também na lesão de camundongos infectados com *L. braziliensis* e saliva de *L. longipalpis* (DONNELLY et al., 1998; VALENZUELA et al., 2001). Estas células podem participar na vasodilatação favorecendo a alimentação sangüínea do vetor e ao mesmo tempo criar um ambiente inóspito para os patógenos em potencial transmitidos pelo vetor (BELKAID et al., 2000).

Quando analisamos o envolvimento de quimiocinas que recrutam preferencialmente macrófagos, observamos a expressão diferenciada de CCL2/MCP-1 no tecido que recobre a parede interna do bolsão de ar de BALB/c. O SGH foi capaz de induzir a expressão de CCL2/MCP-1 em BALB/c enquanto apenas uma expressão menos intensa foi observada após duas e quatro horas em C57BL/6. Mesmo nestes pontos de

avaliação, a expressão desta quimiocina e receptor foi muito mais fraca em C57BL/6 quando comparado a BALB/c. Observamos também a expressão de CCL3/MIP-1 α apenas em BALB/c e nenhuma expressão significativa das outras quimiocinas avaliadas. O efeito quimiotático para macrófagos induzido pela saliva de flebotomíneos, mas sem a caracterização das quimiocinas envolvidas, já havia sido descrito anteriormente em modelos de migração celular *in vitro* com a saliva de *L. longipalpis* e de outras espécies de flebotomíneos como *P. duboscqi* e *P. papatasi* (ANJILI et al., 1995; ZER et al., 2001).

O recrutamento mais precoce de macrófagos induzido pelo SGH em BALB/c e não em C57BL/6 é particularmente interessante. Na fase inicial da infecção, a capacidade de macrófagos em responder a sinais de ativação do tipo Th1 contra patógenos intracelulares é importante na determinação da proliferação ou eliminação do parasita. O recrutamento de um número reduzido de macrófagos também foi associado com lesões menores em um modelo de camundongos imunodeficientes (BARRAL-NETTO et al., 1995). Diversos trabalhos têm demonstrado que a saliva do vetor também pode modular a resposta de macrófagos e monócitos para um fenótipo mais permissivo à sobrevivência da *Leishmania*. A saliva inibe a produção de óxido nítrico, H₂O₂, e a apresentação de antígeno por macrófagos (TITUS et al., 1990; THEODOS et al., 1993 HALL et al., 1995). A exacerbação da infecção também tem sido associada à inibição da produção de citocinas do tipo Th1 e com a exacerbação na produção de citocinas do tipo Th2 pela saliva de *P. papatasi* (MBOW et al., 1998). Trabalhos recentes sugerem que a saliva de *L. longipalpis* induz um infiltrado inflamatório intenso e difuso caracterizado por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos observados após 48 horas na derme da orelha de camundongos BALB/c expostos a picadas de flebotomíneos não-infectados (SILVA et al., 2005). Entretanto, um trabalho recente utilizando outro tipo de abordagem mostrou que a saliva de *L. longipalpis* também teria atividade anti-inflamatória em um modelo de peritonite imune induzida por ovalbumina (OVA). Neste modelo de inflamação, a administração da saliva de *L. longipalpis* por via endovenosa antes do desafio com OVA no peritônio de camundongos imunizados resultou em uma redução significativa na migração de neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (MONTEIRO et al., 2005).

Para confirmar o papel do CCL2/MCP-1 no recrutamento de macrófagos após estimulação com SGH em BALB/c, pré-tratamos um grupo de animais com anticorpo

monoclonal anti-MCP-1, o que resultou em redução significativa no recrutamento de macrófagos e inibição da expressão de CCL2/MCP-1. Este resultado foi reforçado com o uso de bindarit, um derivado indazólico sem efeitos imunossupressores sistêmicos e atividade no metabolismo do ácido araquidônico, que foi demonstrado ser capaz de inibir a síntese de CCL2/MCP-1 *in vitro* e *in vivo* (SIRONI et al., 1999; GUGLIELMOTTI et al., 2002; BHATIA et al., 2005). Os animais tratados com bindarit mostraram redução significativa no recrutamento de macrófagos e na expressão de CCL2/MCP-1 no tecido da parede interna do bolsão.

O CCL2/MCP-1 é um membro da família CC das quimiocinas, originalmente identificada como um fator potente na capacidade de atrair monócitos, células dendríticas e células NK (YOSHIMURA et al., 1989). Apenas o estímulo inicial induzido pelo CCL2/MCP-1 é capaz de induzir a migração e o direcionamento de leucócitos, sugerindo um efeito quimiotático potente mediado por esta quimiocina (KITO et al., 2002). Pode ser produzido por uma diversidade de tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos e células tumorais (WEBER et al., 1999). A produção de CCL2/MCP-1 está relacionada com a estimulação de algumas citocinas como TNF- α e IL-1 β . Em um trabalho recente foi demonstrado que o aumento no recrutamento de macrófagos encontrado na decídua de pacientes com pré-eclampsia, estava diretamente relacionado com a expressão de CCL2/MCP-1 exacerbado pela produção de TNF- α e IL-1 β (LOCKWOOD et al., 2006). Outra citocina, o TGF- β , também foi capaz de induzir a produção de CCL2/MCP-1 por células do túbulo proximal renal (QI et al., 2005). Evidências recentes sugerem que a produção de CCL2/MCP-1 é estimulada via TLR2 e TLR4 (MØLLER et al., 2003; YUMOTO et al., 2005; YANG et al., 2006). A importância na estimulação via TLR2 em desencadear o processo inflamatório mediado pelo CCL2/MCP-1, também foi demonstrada quando uma molécula de superfície do *T. cruzi* induziu a expressão desta quimiocina de forma dependente de TLR2 (COELHO et al., 2002).

O CCL2/MCP-1 também desempenha papel importante na indução da resposta adaptativa. É capaz de direcionar a diferenciação de linfócitos Th0 em Th2 *in vitro* por um mecanismo dependente de IL-4 (KARPUS et al., 1997). Sua expressão já foi associada à polarização para uma resposta Th2 mesmo na presença de IFN- γ (GU et al.,

2000). A produção de CCL2/MCP-1 por fibroblastos foi capaz de induzir a diferenciação de linfócitos produtores de IL-4 (DISTLER et al., 2006). Em camundongos deficientes para CCL2/MCP-1, o granuloma secundário induzido pelo antígeno SEA de *Schistosoma mansoni*, que é dependente de uma resposta Th2, foi reduzido significativamente (CHENSUE et al., 1996; LU et al., 1998). Por outro lado, a produção de CCL2/MCP-1 pode também estar relacionado ao desenvolvimento de uma resposta celular tipo Th1. Esta característica pode ser observada no modelo de encefalomielite autoimune, onde camundongos deficientes para CCL2/MCP-1 apresentaram um recrutamento reduzido de macrófagos para o sistema nervoso central e conseqüentemente uma resposta Th1 deficiente (HUANG et al., 2001). A tGPI-mucina, uma glicoproteína isolada da tripomastigota de *T. cruzi*, foi capaz de induzir resposta inflamatória em modelo de inflamação pleural. Esta resposta correspondeu a um aumento na produção de CCL2/MCP-1 dependente de IFN- γ e TLR2. Os autores sugerem que esta glicoproteína, majoritária na superfície do parasita, seria importante na interação parasita/hopedeiro resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e NO (COELHO et al., 2002). Em outro trabalho, o bloqueio de CCL2/MCP-1 não resultou em alteração na polarização para uma resposta Th1 em camundongos MRL/lpr, mas modificou diretamente a resposta Th1 regional nos glomérulos com deficiência na expressão de IL-12 e IFN- γ (SHIMIZU et al., 2005). É possível que o envolvimento desta quimiocina em respostas imunológicas com características opostas dependam de vários fatores como: o agente infeccioso, o tempo de avaliação e o modelo utilizado no estudo.

Como macrófagos e neutrófilos são as principais células presentes no tecido que recobre a parede interna do bolsão após estimulação com SGH (dados não mostrados), nós decidimos investigar se o SGH seria capaz de induzir a produção de CCL2/MCP-1 por macrófagos J774 *in vitro*. O SGH induziu a produção de CCL2/MCP-1 que foi neutralizada pelo soro anti-SGH, indicando que a atividade inflamatória do SGH pode ser neutralizada por anticorpos específicos. A inibição no recrutamento de macrófagos induzido pelo SGH por anticorpos específicos também foi observada quando o SGH foi pré-incubado com anticorpos anti-SGH ou em camundongos naturalmente expostos a picadas de *L. longipalpis* não infectados. A redução do recrutamento de macrófagos foi associada a uma inibição da expressão de CCL2/MCP-1 nos animais expostos que

também foi detectado *in vitro* em macrófagos J774. Estes resultados sugerem que provavelmente uma ou mais moléculas imunogênicas presentes na saliva de *L. longipalpis* seriam responsáveis por este efeito. Diversos trabalhos têm demonstrado a relação na produção de anticorpos anti-saliva em áreas endêmicas para leishmaniose, onde indivíduos são constantemente picados por flebotomíenos não infectados e desenvolvem resposta anti-saliva. Estudos em uma área endêmica de São Luis mostraram que crianças residentes nesta região desenvolveram resposta humoral anti-saliva que ocorreu simultaneamente ao surgimento da resposta celular anti-*Leishmania* (GOMES et al., 2002). Em outro trabalho, indivíduos de uma área endêmica na Turquia com lesão causada por *L. tropica* apresentavam níveis mais elevados de IgG anti-*P. sergenti* do que indivíduos saudáveis da mesma área. Por outro lado, os níveis de IgG anti-*P. papatasi* foram semelhantes para ambos os grupos. Neste trabalho, os autores sugerem que a produção de anticorpos anti-saliva poderia ser utilizada como monitoramento de exposição do hospedeiro como risco de transmissão em áreas endêmicas (ROHOUSOVÁ et al., 2005). Estes dados reforçam a hipótese de que a indução de resposta imune contra a saliva de *L. longipalpis* pode facilitar o desenvolvimento de uma resposta imune contra a *Leishmania*.

A produção de anticorpos anti-saliva também pode influenciar na alimentação do vetor. Este efeito foi demonstrado quando *P. argentipes* alimentados em hamsters previamente expostos a picadas deste mesmo vetor apresentaram ingestão de uma quantidade reduzida de sangue resultando em redução na taxa de alimentação e na ovoposição (GHOSH et al., 1998). Os anticorpos também podem neutralizar o efeito de determinado componente da saliva, como em camundongos sensibilizados a picadas de *Anopheles stephensi*, que desenvolveram anticorpos anti-apirase inibindo sua atividade catalítica (MATHEWS et al., 1996). A neutralização do efeito de determinados componentes da saliva pode ainda alterar o curso da infecção. A pré-incubação do SGH com o soro de animais sensibilizados neutralizou completamente a exacerbação da infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6 (BELKAID et al., 1998).

Após a caracterização da atividade inflamatória do SGH de *L. longipalpis*, iniciamos a investigação da(s) molécula(s) responsáveis por este efeito utilizando construções de plasmídeos de cDNA de componentes da saliva. A seleção dos cDNA

utilizados foi baseada em dados obtidos previamente em hamsters imunizados com construções de cDNA da saliva de *L. longipalpis* com relação à sua capacidade de induzir RHT e/ou anticorpos (dados não publicados). Na imunização com os cDNA selecionados observamos que a imunização com os cDNA isoladamente não resultou na neutralização do efeito do SGH no bolsão de ar. Por outro lado, a imunização com a combinação de todos os cDNA (“mix de cDNA”) ou mesmo separando os CDNA em grupos menores resultou no bloqueio do recrutamento induzido pelo SGH. Como cada uma destas construções de cDNA codifica a produção de uma determinada proteína da saliva, estes resultados sugerem que provavelmente mais de uma molécula da saliva seria responsável pelo efeito do SGH observado no modelo do bolsão de ar. A ação de múltiplos componentes da saliva exercendo o mesmo efeito seria possível, pois a saliva de diversos artrópodes hematófagos muitas vezes possui diversas moléculas com efeitos biológicos redundantes no hospedeiro (RIBEIRO et al., 2003).

Baseado na confirmação que o(s) componente(s) da saliva envolvido(s) neste efeito teria(m) composição protéica (pré-incubação com Proteinase K), utilizamos os próprios cDNA e proteínas recombinantes como estímulo. O recrutamento celular induzido pelos cDNA foi detectado inicialmente somente após 12h, onde foi possível observar que LJM19, que codifica a proteína de 11kDa, induziu recrutamento celular semelhante ao SGH com relação ao número total de células recrutadas e a composição do exudato. O LJL11, que codifica a proteína de 61kDa, também apresentou recrutamento celular com a presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, mas com cinética diferente, atingindo recrutamento semelhante ao SGH somente após 24 horas. A resposta inflamatória reduzida observada após 6 horas em todos os cDNA testados provavelmente ocorreu devido ao tempo mínimo necessário para o processamento destes plasmídeos e produção de resposta pelas células do hospedeiro (GURUNATHAN et al., 2000). Este efeito não foi observado quando as proteínas recombinantes foram inoculadas diretamente no bolsão de ar. Neste caso, observamos uma resposta rápida da proteína de 11kDa logo nas primeiras 6 horas induzindo resposta superior ao SGH que, após 12 horas, passou a ser semelhante ao recrutamento induzido pelo SGH. Este efeito inicial rápido da proteína recombinante de 11kDa pode ter ocorrido pela quantidade de proteína utilizada no experimento (100 ng). No entanto, as proteínas recombinantes de 43kDa,

44kDa e 45kDa apresentaram efeito similar ao SGH somente após 24 horas. Estas três proteínas pertencem à família de proteínas da saliva de *L. longipalpis* conhecidas como “yellow” (VALENZUELA et al., 2004). O soro de indivíduos de uma área endêmica e de camundongos expostos a picadas de *L. longipalpis* foram capazes de reconhecê-las, confirmando que estas proteínas são fortemente imunogênicas (GOMES et al., 2002; SILVA et al., 2005).

Estudos com a saliva de *P. papatasi* demonstraram que uma proteína de 15 kDa (PsSP115) isolada da saliva deste vetor foi capaz de induzir uma intensa resposta celular, produção de anticorpos e proteção contra a infecção em animais imunizados com esta molécula (VALENZUELA et al., 2001). Entretanto, a indução de uma resposta celular pode não indicar necessariamente uma resposta protetora. Em trabalho recente, ao testar diversas construções de cDNA da saliva de *Phlebotomus ariasi*, os autores observaram que apesar dos animais imunizados com os cDNA produzirem uma resposta celular de RHT apenas uma parte deles desenvolveu uma resposta Th1 caracterizada pela produção de IgG2a, enquanto os demais desenvolveram uma resposta Th2 com a produção de IgG1 (OLIVEIRA et al., 2005). Neste trabalho, nossos resultados sugerem que a proteína de 11kDa, codificada pelo LJM19, o que foi novamente observado pela proteína recombinante de 11kDa, desempenharia papel importante no recrutamento celular mais inicial induzido pelo SGH. Por outro lado, as proteínas de 43, 44, 45 e 61kDa parecem contribuir numa resposta inflamatória mais tardia. O esclarecimento da atividade inflamatória de cada uma destas proteínas recombinantes ainda requer a realização de novos experimentos, testando diferentes concentrações e avaliação da produção de quimiocinas.

Em seguida, avaliamos a capacidade do SGH de modificar a resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi*. O parasita foi capaz de induzir uma resposta inflamatória intensa composta por neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Trabalhos anteriores demonstraram que a *Leishmania* aciona o recrutamento de uma população mista de células inflamatórias, como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que podem variar entre espécies e cepas (MATTE et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2005b). Apesar da *Leishmania* ter como célula hospedeira preferencial o macrófago, ela também é capaz de infectar outros tipos celulares como fibroblastos, células dendríticas e neutrófilos (BOGDAN et

al., 2000; AGA et al., 2002; PRINA et al., 2004). Na leishmaniose, os neutrófilos desempenham papel importante no início da infecção por serem capazes de fagocitar e destruir promastigotas de *L. donovani in vitro*. São importantes no controle inicial do crescimento parasitário no baço, mas não no fígado de camundongos infectados com *L. infantum* (ROUSSEAU et al., 2001). Entretanto, podem ser infectados pela *Leishmania* que permanece viável no interior destas células (MÜLLER et al., 2001; LAUFS et al., 2002).

Quando a *L. chagasi* foi associada ao SGH ocorreu um aumento no recrutamento especialmente de neutrófilos e macrófagos induzido pelo parasita em camundongos BALB/c e C57BL/6 após doze horas. Os resultados sugerem que a resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi* também difere dependendo da linhagem de camundongo utilizada. Quanto à análise fenotípica do exudato induzido pela *L. chagasi* ao ser combinada com o SGH, novamente observamos a predominância de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em BALB/c e neutrófilos e macrófagos em C57BL/6. Embora a resposta inflamatória induzida pela *L. chagasi* e *L. chagasi* + SGH inicialmente tenha sido mais intensa em BALB/c, no ponto mais tardio avaliado (72h) o número de leucócitos recrutados por estes mesmos grupos em C57BL/6 foi superior ao induzido em BALB/c.

Ao avaliarmos as quimiocinas envolvidas no padrão de recrutamento encontrado com a *L. chagasi*, observamos que o SGH induziu um padrão de expressão de quimiocinas diferente em camundongos BALB/c e C57BL/6 quando o SGH era combinada com a *L. chagasi*. Esta diferença pode ser observada na expressão das quimiocinas recrutadoras de granulócitos. Observamos que em BALB/c, a expressão de CXCL1/KC foi mais precoce quando comparado ao C57BL/6. A indução da expressão de CXCL1/KC e outras quimiocinas que recrutam granulócitos logo no início da infecção pela *Leishmania* já foi descrito anteriormente, além da própria *Leishmania* que também libera um fator quimiotático para neutrófilos (VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Na infecção experimental com *L. major* ocorre uma produção rápida de MIP-2 e CXCL1/KC na pele de animais infectados (MULLER et al., 2001). Na infecção *in vitro* também foi observada uma rápida produção de CXCL1/KC por macrófagos murinos (RACOOSIN et al., 1997). A expressão de CCL11/eotaxina também foi diferente entre as duas linhagens quando o SGH foi combinado com a *Leishmania*. Enquanto esta quimiocina foi detectada

em todos os pontos avaliados em C57BL/6 foi detectada em BALB/c somente após 72 horas. Recentemente foi demonstrado que a expressão de CCL11/eotaxina também foi detectada com mais intensidade na lesão de animais infectados com uma cepa virulenta de *L. braziliensis* quando comparado a uma cepa menos virulenta (TEIXEIRA et al., 2005b). Detectamos diferenças também na expressão de quimiocinas recrutadoras de macrófagos, onde a expressão de CCL2/MCP-1 na co-inoculação com o SGH resultou no aumento da expressão desta quimiocina em BALB/c e C57BL/6 em quase todos os tempos avaliados, o que não foi observado quando a *Leishmania* foi inoculada isoladamente. A indução da expressão de CCL2/MCP-1 já foi descrita na infecção por outros patógenos como *Bartonella henselae* e *Rickettsia rickettsii* (CLIFTON et al., 2005; McCORD et al., 2005). A expressão desta quimiocina na infecção pela *Leishmania* já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro*, mas seu papel ainda permanece controverso (BADOLATO et al., 1996; CARRERA et al., 1996; RACOOSIN et al., 1997; COTTERELL et al., 1999). Camundongos deficientes para CCL2/MCP-1 apresentaram uma resposta Th2 diminuída tornando-se resistentes à infecção pela *L. major* (GU et al., 2000). Por outro lado, CCL2/MCP-1 induz atividade de macrófagos e liberação de enzimas lisossomais (ROLLINS et al., 1991). A expressão desta quimiocina agindo sinergicamente com IFN- γ , também estimula diretamente a destruição do parasita em macrófagos infectados com *L. major* (RITTER et al., 2000). Além disso, tem sido relatado que CCL2/MCP-1 pode estimular diretamente a eliminação do parasita via geração de NO por macrófagos murinos infectados com *L. donovani* (BHATTACHARYYA et al., 2002), ou via indução de intermediários reativos de oxigênio em monócitos murinos infectados com *L. major* (RITTER et al., 2000). O tratamento com CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1 α de camundongos infectados com *L. donovani* resultou na redução significativa da carga parasitária no baço e fígado (DEY et al., 2005).

O efeito do CCL2/MCP-1 na leishmaniose pode depender da cepa ou espécie de *Leishmania* utilizado. Estudos com macrófagos murinos mostraram que a indução de quimiocinas na infecção pela *Leishmania* foi dependente da cepa utilizada do parasita. A expressão de CCL2/MCP-1 foi predominantemente induzida por uma cepa pouco virulenta de *L. major*, enquanto uma cepa mais virulenta induziu uma expressão reduzida

desta quimiocina. Neste trabalho os autores sugerem que a virulência da *Leishmania* estaria fortemente relacionada à modulação da expressão de quimiocinas por macrófagos (RACOOSIN et al., 1997). Em outro trabalho, a utilização do modelo do bolsão de ar possibilitou a comparação da resposta inflamatória induzida pela *L. major* e *L. donovani*. Enquanto a *L. major* induziu uma resposta inflamatória inicial intensa com a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, apenas uma resposta inflamatória moderada foi observada após estimulação com *L. donovani* (MATTE et al., 2002). Recentemente, comparando a resposta inflamatória induzida por dois isolados diferentes de *L. braziliensis* foi observada a expressão aumentada de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CXCL1/KC, XCL1/linfotactina-1 e CCL11/eotaxina na lesão de camundongos infectados com a cepa H3227 que produzia lesões mais severas. Por outro lado, na lesão mais branda resultante da infecção pela cepa BA788 foi detectada a expressão apenas de CXCL10/IP-10 (TEIXEIRA et al., 2005b).

No modelo murino, parece haver uma forte associação de quimiocinas com o perfil de resistência e suscetibilidade à infecção. Na infecção por *L. major*, ocorre expressão significativamente diferente de várias quimiocinas em camundongos C57BL/6 e BALB/c (VESTER et al., 1999). Nesse estudo, linfonodos de camundongos resistentes infectados com *L. major* induziram a expressão de CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e XCL1/linfotactina quando comparados com camundongos suscetíveis, indicando que estas quimiocinas podem ter um papel importante no desenvolvimento da imunidade do hospedeiro contra *L. major*. CXCL10/IP-10 é um potente recrutador de células NK produtoras de IFN- γ contribuindo na resistência à infecção pela *L. major* (SCHARTON et al., 1993). A expressão de XCL1/linfotactina-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES foram associadas com uma resposta tipo Th1 (SCHRUM et al., 1996; DORNER et al., 2002). No homem, em indivíduos com LC ou LCD causadas por *L. mexicana*, as lesões de indivíduos com LC continham altos níveis de CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10; enquanto as lesões de indivíduos com LCD expressavam predominantemente CCL3/MIP-1 α (RITTER et al., 1996). Nesse estudo, os autores sugerem que, em LC, a produção de CCL2/MCP-1 seria responsável pelo recrutamento de macrófagos mais maduros e/ou ativados, que por sua vez matriariam os parasitas e

controlariam a doença. Por outro lado, em LCD, CCL3/MIP-1 α induziria a migração de células mais imaturas ou desativaria estas células, favorecendo a progressão da doença.

Os leucócitos desempenham tarefa importante tanto na patogênese como na defesa do hospedeiro, e o recrutamento de determinada população celular para o local da picada pode determinar o caminho que será seguido. Neste trabalho observamos que a saliva de *L. longipalpis*, no modelo do bolsão de ar, é capaz de induzir uma resposta inflamatória diferenciada dependendo da linhagem de camundongo utilizada, e também capaz de modular o perfil de recrutamento induzido pelo parasita. Também observamos que, a proteína da saliva de 11kDa teria, pelo menos em parte, papel importante em intermediar este efeito inicialmente enquanto as proteínas da família “yellow” e de 61kDa seriam responsáveis por um efeito mais tardio. Porém, novas avaliações precisam ser realizadas para melhor definir o envolvimento destes componentes da saliva na resposta inflamatória. A saliva do vetor também foi capaz de modular o recrutamento inicial de leucócitos induzido pela *L. chagasi* para o local da picada. Um estudo mais detalhado das populações de leucócitos que migram para o local como a produção de citocinas e caracterização do fenótipo celular pode esclarecer novos aspectos envolvidos na sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro ou no estabelecimento de um ambiente hostil para a permanência do parasita .

8 CONCLUSÕES

8.1. A saliva de *L. longipalpis* foi capaz de induzir uma resposta inflamatória no modelo do bolsão de ar, caracterizada pela presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos com cinética diferente em camundongos BALB/c e C57BL/6;

8.2. O recrutamento aumentado de macrófagos em camundongos BALB/c foi fortemente associado à expressão de CCL2/MCP-1 no modelo do bolsão de ar;

8.3. Observamos que a proteína recombinante de 11kDa da saliva de *L. longipalpis* parece ter uma atividade inflamatória mais inicial, enquanto as proteínas da família “yellow” e a proteína de 61kDa teriam um efeito mais tardio no modelo do bolsão de ar;

8.4. A saliva induziu um efeito aditivo no perfil de recrutamento celular induzido pela *L. chagasi* resultante da modulação na expressão de CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL11/eotaxina e CXCL1/KC em BALB/c e C57BL/6;

9 BIBLIOGRAFIA

ADLER, S.; THEODO, O. The mouthparts, alimentary tract and salivary apparatus of the female *Phlebotomus papatasi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 20: 109-42, 1926.

AGA, E.; KATSCHINSKI, D.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MÜLLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*." **J. Immunol.** 169: 898, 2002.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell. Sci.** 18: 2993-3002, 1999.

ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. β -chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 67: 4819-4826, 1999.

ANJILI, C.; MBATI, P.; MWANGI, R.; GITHURE, J.; OLOBO, J.; ROBERT, L.; KOECH, D. The chemotatic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica** 60: 10097-10100, 1995.

ATO, M.; STAGER, S.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to development of visceral leishmaniasis. **Nat. Immunol.** 3: 1185-1191, 2002.

BADARÓ, R.; JONES, T.; LOURENÇO, R.; CERF, B.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Am. J. of Trop. Med. and Hyg.** 35: 72-8, 1986.

BADOLATO, R.; SACKS, D. L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.** 82: 21-26, 1996.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Intern. Med.** 250: 91-104, 2001.

BARBOSA JR, A. A., ANDRADE, Z. A., REED, S. G. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. **Braz J Med Res.** 20:63-70. 1987

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E. D.; VALENZUELA J. G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J. M. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am J Trop Med Hyg.** 62: 740-5, 2000.

BARRAL-NETTO, M; SILVA, JS; BARRAL, A; REED, S (1995) Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. **Am. J. of Pathol.** 146: 635-42

BAZAN, J. F.; BACON, K. B.; HARDIMAN, G.; WANG, W.; SOO, K.; ROSSI, D.; GREAVES, D. R.; ZLOTNIK, A.; SCHALL, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature.** 385: 640-4, 1997.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J Exp Med.** 188: 1941-53, 1998.

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.; RIBEIRO, J. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proc Natl Acad Sci U S A,** 97: 6704-9, 2000.

BHATIA, M.; RAMNATH, R.; CHEVALI, L.; GUGLIELMOTTI, A. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 288: G1259, 2005.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J. Infect. Dis.** 185: 1704-1708, 2002.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.** 191: 2121-30, 2000.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MÜLLER, W.; KÜHN, R.; SACKS, D. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **Eur. J. Immunol.** 183: 515-526, 1996.

CARVALHO, E. M., TEIXEIRA, R. S., JOHNSON JR, W. D. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.** 33:498. 1981.

CARVALHO, E. M., BADARO, R., REED, S. G., JONES, T. C., JOHNSON JR, W. D. Absence of γ interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.** 76:2066, 1985.

CARVALHO, M.; BENJAMIM, C.; SANTOS, F.; FERREIRA, S.; CUNHA, F. Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis. **Eur. J. of Pharmacol.** 525: 161-169, 2005.

CHARLAB, R., VALENZUELA, J. G., ROWTON, E. D., AND RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 96: 15155-60, 1999.

CHENSUE, S.; WARMINGTON, K.; RUTH, J.; SANGHI, P.; LINCOLN, P.; KUNKEL, S. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression and IL-12 production. **J. Immunol.**, 157: 4602-4608, 1996.

CHILDS, G.E.; LGHTNER, L.K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M.G.; PRICE, E.E.; HENDRICKS, L.D.. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiops*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 78: 25-34, 1984.

CHRISTOPHERSON II, K.; HROMAS, R.. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells.**19: 388-396, 2001.

CLIFTON, D.; RYDKINA, E.; HUYCK, H.; PRYHUBER, G.; FREEMAN, R.; SILVERMAN, D.; SAHNI, S. Expression and secretion of chemotactic cytokines IL-8 and MCP-1 by human endothelial cells after *Rickettsia rickettsii* infection: regulation by nuclear transcription factor NF-kappaB. **Int J Med Microbiol.**, 295: 267-78, 2005.

COELHO, P.; KLEIN, A.; TALVANI, A.; COUTINHO, S.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; SILVA, J.; CANIZZARO, H.; GAZZINELLI, R.; TEIXEIRA, M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce *in vivo* leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-g-primed-macrophages. **J. of Leuk. Biol.**, 71: 837-844, 2002.

COSTA, D. J.; FAVALI, C.; CLARENCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEICAO, V.; MIRANDA, J. C.; TITUS, R. G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKY, C. I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, 72: 1298-305, 2004.

COSTA, J. (2005). Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **G. Méd. da Bahia**, 75: 3-17.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a cell-dependent manner. **Eur. J. Immunol.**, 29: 203-214, 1999.

DEY, R.; SARKAR, A.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA, M.; ROYCHOUDHURY, K.; BHATTACHARYYA, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. (2005). Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, 73: 8334-44, 2005.

DISTLER, J.; JUNGEL, A.; CARETTO, D.; SCHULZE-HORSEL, U.; KOWAL-BIELECKA, O.; GAY, R.; MICHEL, B.; MULLER-LADNER, U.; KALDEN, J.; GAY, S.; DISTLER, O. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. **Arthritis Rheum.**, 54: 214-25, 2006.

DONNELLY, K.; LIMA, H.; TITUS, R. G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **J. of Parasitol.**, 84, 97-103, 1998.

DORNER, B.; SCHEFFOLD, A.; ROLPH, M.; HUSER, M.; KAUFMANN, S.; RADBRUCH, A.; FLESCHE, I.; KROCZEK, R. MIP-1a, MIP-1b, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. **Proc. N. Acad. of Sci. USA** 99: 6181–6186, 2002.

EDWARDS, J.; SEDGWICK, A.; WILLOUGHBY, D. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system.. **J. Pathol.** 134: 147-56, 1981.

ENGWERDA, C. R., MURPHY, M. L., COTTERELL, S. E., SMELT, S. C., KAYE, P. M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur J Immunol.** 28:669-80. 1998.

EVANS, T.; TEIXEIRA, M.; MCAULIFFE, I.; VASCONCELOS, A.; SOUSA, A.; LIMA, J.; PEARSON, R. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. of Infect. Dis.** 166, 1124-32, 1992.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **J. Clin. Invest.** 101: 890-8, 1998.

FORGET, G.; MATTE, C.; SIMINOVITCH, K.; RIVEST, S.; POULIOT, P.; OLIVIER, M. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. **Eur. J. Immunol.** 35, 1906-17, 2005.

- GHOSH, K. N.; MUKHOPADHYAY, J. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Int. J. Parasitol.** 28: 275-81, 1998.
- GILROY, D., TOMLINSON, A., AND WILLOUGHBY, D. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. **Inflamm. Res.** 47: 79-85, 1998.
- GOMES, R. B.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; COSTA, J.; MIRANDA, J. C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J Infect Dis.** 186: 1530-4, 2002.
- GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R.; TAM, C.; LODA, M.; ROLLINS, B. J. (2000) Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1." **Nature** 404: 407-11, 2000.
- GUGLIELMOTTI, A.; D'ONOFRIO, E.; COLETTA, I.; AQUILINI, L.; MILANESE, C.; PINZA, M. Amelioration of rat adjuvant arthritis by therapeutic treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 and TNF-alpha production. **Inflamm. Res.** 51: 252-8, 2002.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.; SEDER, R. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. **Annu. Rev. Immunol.** 18, 927-974, 2000.
- HALL, L.; TITUS, R. G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **The J. of Immun.** 155, 3501-3506, 1995.
- HEDRICK, J. A.; SAYLOR, V.; FIGUEROA, D.; MIZOUE, L.; XU, Y.; MENON, S.; ABRAMS, J.; HANDEL, T.; ZLOTNIK, A. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. **J. Immunol.** 158: 1533-1540, 1997.
- HEINZEL, FP; SADICK, MD; HOLADAY, BJ; COFFMAN, RL; LOCKSLEY, RM. Reciprocal expression of interferon-g or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cell subsets **J. Exp. Med.** 169: 59-72, 1989.
- HUANG, D.; WANG, J.; KIVISAKK, P.; ROLLINS, B. J.; RANSOHOFF, R.. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J.Exp.Med.** 193: 713-725, 2001.
- JANEWAY, C.; MEDZHITOV, R. (2002). Innate Immune Recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 20: 197-216, 2002.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science** 290: 1351-4, 2000.

KARPUS, W., LUKACS, N., KENNEDY, K., SMITH, W., HURST, S., AND BARRETT, T. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production.. **J. of Immunol.** 158: 4129-4136, 1997.

KATZ, O.; WAITUMBI, J. N.; ZER, R.; WARBURG, A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. **Am J Trop Med Hyg.** 62: 145-50, 2000.

KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, M.; QIFENG, X.; SAITO, A. Expression of cytokines and chemokines inducible in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformas*: effects of interleukin-12. **Infect. Immun.** 65: 1307-1312, 1997.

KAYE, P. M.; CURRY, A.; BLACKWELL, J. Differential production of Th1- and Th2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** 146: 2763-2770, 1991.

KENAKIN, T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. **Trends Pharmacol. Sci.** 24: 346-54, 2003.

KENNEDY, J.; KELNER, G. S.; KLEYENSTEUBER, S.; SCHALL, T. J.; WEISS, M. C.; YSSEL, H.; SCHNEIDER, P. V.; COCKS, B. G.; BACON, K. B.; ZLOTNIK, A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. **J. Immunol.** 155: 203-209, 1995.

KITO, K.; NISHIDA, K. Nonrequirement of continuous stimulation with MCP-1 for cell migration and determination of directional migration by initial stimulation with chemokine. **Experim. Cell Res.** 281: 157-166, 2002.

LAINSON, R., RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82: 421-424, 1987.

LANZARO, G. C.; LOPES, A. H.; RIBEIRO, J. M.; SHOEMAKER, C. B.; WARBURG, A.; SOARES, M.; TITUS, R. G. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Insect Mol Biol.** 8:267-75, 1999.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.** 25: 2220-2227, 1995.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol.** 11: 210-214, 2003.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J. C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.** 70: 826-835, 2002.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R.. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.** 266:11234-6, 1991.

LEWIS, D. Functional morphology of the mouthparts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Trans. R. Entomol. Soc.** 126: 497-532, 1975.

LIMA, H.; TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, 64: 5442-5445, 1996.

LOCKWOOD, C.; MATTA, P.; KRIKUN, G.; KOOPMAN, L.; MASCH, R.; TOTI, P.; ARCURI, F.; HUANG, S.; FUNAI, E.; SCHATZ, F. Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in First Trimester Human Decidual Cells: Implications for Preeclampsia. **Am. J. Pathol.** 168: 445-52, 2006.

LU, B., RUTLEDGE, B., GU, L., FIORILLO, J., LUKACS, N., KUNKEL, S., NORTH, R., GERARD, C., AND ROLLINS, B. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. **J. Exp. Med.** 187: 601-608, 1998.

MACKAY, C. Chemokines: what chemokine is that?" **Curr.Biol.** 7: R384-6, 1997.

MANHHEIMER, S. B., HARIPRASHAD, J., STOECKLE, M. Y., AND MURRAY, H. W. Induction of macrophage antiprotozoal activity by monocyte chemotactic and activating factor. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 14: 59-61, 1996.

MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. **Immunol. Today.** 20: 254-7, 1999.

MATHEWS, G.; SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. Inhibition of mosquito salivary gland apyrase activity by antibodies produced in mice immunized by bites of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Am.J. Trop. Med. Hyg.** 55: 417-423, 1996.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **The J. of Infect. Dis.** 185: 673-81, 2002.

MATSUKURA, Y.; TAKAGI, T.; OKAMOTO, R.; KOSHINO, T. Upregulation of CD44 in the inflamed mouse air pouch injected with synthetic lipid A. **J. Rheumatol.** 25: 539-45, 1998.

MBOW, L.; BLEYENBERG, J.; HALL, L.; TITUS, R. G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **The J. of Immunol.** 161: 5571-5577, 1998.

McCORD, A.; BURGESS, A.; WHALEY, M.; ANDERSON, B. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells promotes monocyte/macrophage chemoattractant protein 1 gene expression and protein production and triggers monocyte migration. **Infect. Immun.** 73: 5735-42, 2005.

MELBY, P. C., CHANDRASEKAR, B., ZHAO, W., COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol.** 166:1912-20. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de Vigilância em Saúde (MS/SVS). <disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao_doencas/situacao.htm#tegumentar>. Acesso em nov, 2004.

MIRKOVICH, A.M.; GALELLI, A.; ALLISON, A.C.; MODABBER, F.Z. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. **Clin. Exp. Immunol.** 64: 1-7, 1986.

MØLLER, A.-S. W.; ØVSTEBØ, R.; WESTVIK, Å.-B.; JOØL, G. B.; HAUG, K.-B. F.; KIERULF, P. Effects of bacterial cell wall components (PAMPs) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) and the chemokine receptor CCR2 by purified human blood monocytes." **J. of Endot. Res.** 9: 349-360, 2003.

MONTEIRO, M.; NOGUEIRA, L.; SOUZA, A.; RIBEIRO, J.; SILVA, J.; CUNHA, F. Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. **Eur. J.Immunol.** 35: 2424-2433, 2005.

MORRIS, R.; SHOEMAKER, C.; DAVID, J.; LANZARO, G.; TITUS, R.. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L.major* infection. **The J. of Immunol.** 167: 5226-5230, 2001.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.** 25: 75-84, 2004.

- MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.** 190: 73-76, 2001.
- MURRAY, H.W., MASUR, H., KEITHL, Y. J. S. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. **J Immunol.**129:344-50. 1982.
- MURRAY, H. W., SQUIRES, K. E., MIRALLES, C. D., STOECKLE, M. Y., GRANGER, A. M., GRANELLI-PIPERNO, A., BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J Immunol.** 148:1858-63. 1992.
- MURRAY, H. W. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 175:1477-9. 1997.
- MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokines receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Am. Soc. Hematol.**95: 3032-3043, 2000.
- NEUMANN, B.; EMMANUILIDIS, K.; STADLER, M.; HOLZMANN, B. Distinct functions of interferon- γ for chemokine expression in models of acute lung inflammation. **Immunol.** 95: 512-521, 1998.
- OLIVEIRA, C., TEIXEIRA, M., TEIXEIRA, C., DE JESUS, J., ROSATO, A., SILVA, J., BRODSKYN, C., BARRAL-NETTO, M., AND BARRAL, A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Micro. and Infect.** 6: 977-984, 2004.
- OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; SEITZ, A.; PHAM, V.; GUIGAL, P.; FISCHER, L.; WARD, J.; VALENZUELA, J. From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. **Vaccine, in press**, 2005.
- PARANHOS, M.; DOS SANTOS, W.; SHERLOCK, I.; OLIVEIRA, G.; DE CARVALHO, L. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 88:249-251, 1993.
- PEARSON, R.; COX, G.; EVANS, T.; SMITH, D.; WEIDEL, D.; CASTRACANE, J. Wasting and macrophage production of tumour necrosis factor /cachectin and interleukin 1 in experimental visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 43: 640, 1990.

- PEARSON, R. D. Leishmania species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis." **In Principles and Practice of Infections Diseases (Mandell, G.L. et al., eds.),** 2832-2845, 2000.
- PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, C. J. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **J. Cell Science.** 117: 315-325, 2004.
- QI, W.; CHEN, X.; POLHILL, T.; SUMUAL, S.; TWIGG, S.; GILBERT, R.; POLLOCK, C. Transforming growth factor- β 1 induces interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein-1 through a connective tissue growth factor independent pathway. **Am. J. Physiol. Renal Physiol., in press,**2005.
- RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. (1997). *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol.** 85: 283-295, 1997.
- RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; KAMHAWI, S.; JOSHI, M.B.; REYNOSO, D.; LAWYER, P.G.; DWYER, D.M. ; SACKS, D.L.; VALENZUELA, J.G. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Insect Molec. Biol.** 14: 703-712, 2005.
- RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists?" **Infect. Agents Dis.,** 4: 143-152, 1995.
- RIBEIRO, J.; FRANCISCHETTI, I. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu. Rev. Entomol.** 48: 73-88, 2003.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev Entomol.** 32: 463-78, 1987.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COURTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** 172: 4454-4462, 2004.
- RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. **Eur. J. Immunol.** 30: 3111-3120, 2000.
- RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R.. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**173: 699-709, 1996.

RODRIGUEZ-SOSA, M.; ROSAS, L. E.; TERRAZAS, L. I.; LU, B.; GERARD, C.; SATOSKAR, A. R. CC chemokine receptor 1 enhances susceptibility to *Leishmania major* during early phase of infection. **Immunol. Cell. Biol.** 81: 114-120, 2003.

ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P.; LIPOLDOVÁ, M.. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. **Paras. Immunol.** 27: 469-473, 2005.

ROLLINS, B.; WALZ, A.; BAGGIOLINI, M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. **Blood** 78: 1112-6, 1991.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood** 90: 909-928, 1997.

ROSAS, L. E.; BARBI, J.; LU, B.; FUJIWARA, Y.; GERARD, C.; SANDERS, V. M.; SATOSKAR, A. R. CXCR3^{-/-} mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.** 35: 515-523, 2005.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 18: 217-242, 2000.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; ANJUÈRE, F.; FERRUA, B.; FRAGAKI, K.; FICHOUX, Y. L.; KUBAR, J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **Eur. Cytokine Netw.** 12: 340-347, 2001.

RULL, M., CLAYBURNE, G., SIECK, M., AND SCHUMACHER, H. Intra-articular corticosteroid preparations: different characteristics and their effect during inflammation induced by monosodium urate crystals in the rat subcutaneous air pouch.. **Rheumatol.** 42: 1093-1100, 2003.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **J. Exp. Med.** 187: 875-903, 1998.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **J. of Experim. Medic.** 173: 49-54, 1991.

SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; FERRAZ, F. O.; SOUZA, D. G.; DE FREITAS, L. A. R.; AFONSO, L. C. C., TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, 72: 4918-4923, 2004.

SATO, N.; AHUJA, S. K.; QUINONES, M.; KOSTECKI, V.; REDDICK, R. L.; MELBY, P. C.; KUZIEL, W. A.; AHUJA, S. S. CC chemokine receptor (CCR)2 is

required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cell: absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J. Exp. Med.** 192: 205-218, 2000.

SATO, N.; KUZIEL, W. A.; MELBY, P. C.; REDDICK, R. L.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; MAEDA, N.; AHUJA, S. K.; AHUJA, S. S. Defects in the generation of IFN- γ are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1- α -, or CCR2-deficient mice. **J. Immunol.** 163: 5519-5525, 1999.

SAUNDERS, J.; TARBY, C. M. Opportunities for novel therapeutic agents acting at chemokine receptors. **Drug. Discov. Today.** 4: 80-92, 1999.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.** 178: 567-577, 1993.

SCHRUM, S.; PROBST, P.; FLEISCHER, B.; ZIPFEL, P. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1a, MIP-1b, and RANTES is associated with a type 1 immune response. **The J. of Immunol.** 157: 3598-3604, 1996.

SEDGWICK, A.; SIN, Y.; EDWARDS, J.; WILLOUGHBY, D. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. **J. Pathol.** 198: 483-95, 1983.

SELYE, H. Induction of topical resistance to acute tissue injury; an experimental study with the granuloma pouch technique. **Surg.Clin. North Am.** 97: 1417-46, 1953.

SHIMIZU, S.; NAKASHIMA, H.; KARUBE, K.; OHSHIMA, K.; EGASHIRA, K. Monocyte chemoattractant protein-1 activates a regional Th1 immunoresponse in nephritis of MRL/lpr mice. **Clin. Exp. Rheumatol.** 23: 239-42, 2005.

SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in Balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am.J. Trop. Med. Hyg.** 72: 94, 2005.

SIRONI, M.; GUGLIELMOTTI, A.; POLENTARUTTI, N.; FIORETTI, F.; MILANESE, C.; ROMANO, M.; VIGINI, C.; COLETTA, I.; SOZZANI, S.; BERNASCONI, S.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the production of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Eur. Cytokine Netw.** 10: 437-42, 1999.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sci.** 67: 477-502, 2000.

- SQUIRES, K.; SCHREIBER, R.; MCEL RATH, M.; RUBIN, B.; ANDERSON, S.; MURRAY, H. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-g in host defense and tissue granuloma response. **J. Immunol.** 143: 4244-4249, 1989.
- STARK, K. R.; JAMES, A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*." **J. Biol. Chem.**, 273: 20802-9, 1998.
- STERN, J. J., OCA, M. J., RUBIN, B. Y., ANDERSON, S. L., MURRAY, H. W. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol.** 140:3971-7. 1988.
- TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C. Influência da saliva de flebotomíenos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gazeta Médica da Bahia**, 75: 18-23, 2005a.
- TEIXEIRA, M.J.; FERNANDES, J.; TEIXEIRA, C.; ANDRADE, B.; POMPEU, M.; SILVA, J.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* Isolates Induce Different Paces of Chemokine Expression Patterns. **Infect. and Immun.** 73: 1191-1195, 2005b
- TESSIER, P.; NACCACHE, P.; DIENER, K.; GLADUE, R.; NEOTE, K.; CLARK-LEWIS, I.; McCOLL, S. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens II critical role for chemokines ICAM-1 and TNF alpha. **The J. of Immunol.** 161: 1204-1211, 1998.
- THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M.; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect. Immun.** 59: 1592-8, 1991.
- THEODOS, C.; TITUS, R. G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. **Paras. Immunol.**, 15: 481-487, 1983.
- THIAKAKI, M.; ROHOUSOVA, I.; VOLFOVA, V.; VOLF, P.; CHANG, K.; SOTERIADOU, K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Mic. and Infect.** 7: 760-766, 2005.
- TITUS, R.; RIBEIRO, J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science.** 239: 1306-8, 1988.
- TITUS, R.; RIBEIRO, J. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. **Parasitol. Today.** 6: 157-160, 1990.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cell. **Immunol Today.** 14:335-8. Review. 1993

- TUMANG, M. C., KEOGH, C., MOLDAWER, L. L., HELFGOTT, D. C., TEITELBAUM, R., HARIPRASHAD, J., MURRAY, H. W. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol.** 153:768-75. 1994.
- VALENZUELA, J.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.; RIBEIRO, J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **The J. of Experim. Med.**, 194: 331-342, 2001.
- VALENZUELA, J.; GARFIELD, M.; ROWTON, E.; PHAM, V. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. **The J. of Experim. Biol.** 207: 3717-3729, 2004.
- VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.**70: 4177-4184, 2002.
- VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages." **The J. of Immunol.** 173, 6521-6525, 2004.
- VESTER, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 67: 3155-3159, 1999.
- VOLF, P.; ROHOUSOVA, I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitol.** 122: 37-41, 2001.
- WEBER, K.; NELSON, P.; GRONE, H.; WEBER, C. Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 19: 2085-93, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). <disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishdis1.html>>. Acesso em nov, 2004.
- YANG, C.; HUNG, C.; WU, M.; TIAN, Y.; CHANG, C.; PAN, M.; VANDEWALLE, A. (2006). Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.**, *in press*, 2006.
- YOSHIMURA, T.; YUHKI, N.; MOORE, S.; APPELLA, E.; LERMAN, M.; LEONARD, E. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): Full-length cDNA

cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. **FEBS Lett.** 244: 487-493, 1989.

YUMOTO, H.; CHOU, H.; TAKAHASHI, Y.; DAVEY, M.; GIBSON, F. R.; GENCO, C. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. **Infect. Immun.**, 73: 8050-9, 2005.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **Intern. J. for Parasitol.** 31: 810-814, 2001.

10 ANEXOS

10.1. ANEXO 1

CLARISSA R. TEIXEIRA; MARIA JÂNIA TEIXEIRA; REGIS B. B. GOMES; CLAIRE S. SANTOS; BRUNO B. ANDRADE; IMBROINISE RAFFAELE-NETTO; JOÃO S. SILVA; ANGELO GUGLIELMOTTI; JOSÉ C. MIRANDA; ALDINA BARRAL, CLÁUDIA BRODSKYN; MANOEL BARRAL-NETTO. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment1. **The Journal of Immunology** 175: 8346-8353, 2005.

Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment¹

Clarissa R. Teixeira,*[†] Maria Jânia Teixeira,*[†] Regis B. B. Gomes,*[†] Claire S. Santos,*
Bruno B. Andrade,*[†] Imbroinise Raffaele-Netto,* João S. Silva,[§] Angelo Guglielmotti,[‡]
José C. Miranda,* Aldina Barral,*[¶] Cláudia Brodskyn,*[¶] and Manoel Barral-Netto^{2,*†¶}

Saliva of bloodfeeding arthropods has been incriminated in facilitating the establishment of parasite in their host. We report on the leukocyte chemoattractive effect of salivary gland homogenate (SGH) from *Lutzomyia longipalpis* on saliva-induced inflammation in an air pouch model. SGH (0.5 pair/animal) was inoculated in the air pouch formed in the back of BALB/c or C57BL/6 mice. *L. longipalpis* SGH induced a significant influx of macrophages in BALB/c but not in C57BL/6 mice. SGH-induced cell recruitment reached a peak at 12 h after inoculation and was higher than that induced by the LPS control. This differential cell recruitment in BALB/c mice was directly correlated to an increase in CCL2/MCP-1 expression in the air pouch lining tissue. In fact, treatment with bindarit, an inhibitor of CCL2/MCP-1 synthesis, and also with a specific anti-MCP-1 mAb resulted in drastic reduction of macrophage recruitment and inhibition of CCL2/MCP-1 expression in the lining tissue. CCL2/MCP-1 production was also seen in vitro when J774 murine macrophages were exposed to *L. longipalpis* SGH. The SGH effect was abrogated by preincubation with serum containing anti-SGH IgG Abs as well as in mice previously sensitized with *L. longipalpis* bites. Interestingly, the combination of SGH with *Leishmania chagasi* induced an increased recruitment of neutrophils and macrophages when compared with *L. chagasi* alone. Taken together these results suggest that SGH not only induces the recruitment of a greater number of macrophages by enhancing CCL2/MCP-1 production but also synergizes with *L. chagasi* to recruit more inflammatory cells to the site of inoculation. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 8346–8353.

During bloodfeeding, insect saliva is injected into the host's skin. This saliva contains a great variety of hemostatic, inflammatory, and immunomodulatory molecules. Understanding mammalian response to insect saliva is of utmost importance in several ways. Besides being related to allergy (1, 2), insect saliva is known to facilitate parasite survival (3–5). In mice, saliva from *Lutzomyia longipalpis* or *Phlebotomus papatasi* leads to larger *Leishmania major*-associated lesions than those resulting from the parasite alone (6).

The mammalian hosts do mount an anti-insect saliva response. The phlebotomine saliva enhancing effect on leishmaniasis can be abrogated by preexposure to immune sera (4, 5). Immune response against sand fly saliva is also observed in children from areas endemic for visceral leishmaniasis. Seroconversion against *L. longi-*

palpis saliva occurred at the same time as the host developed an anti-*Leishmania* cell-mediated immune response (7, 8).

Cell recruitment is a vital event in inflammation. Cell number and composition in the initial stages after stimuli greatly influences future responses and the development of acquired immune responses. Initial cell recruitment is also important in leishmaniasis (9, 10). Saliva from *Phlebotomus duboscaqi* attracts vertebrate monocytes in vitro (11) and saliva from *P. papatasi* not only attracts macrophages but also enhances infection by *Leishmania donovani* in these cells, resulting in increased parasite load (12).

Synthesis of inflammatory mediators is a fundamental mechanism for leukocyte recruitment to an injured tissue. We thus investigated the chemotactic effect and mediators of salivary gland homogenate (SGH)³ from *L. longipalpis* in vivo using the air pouch model because little is known about the influence of insect saliva on chemokine expression. We observed that *L. longipalpis* saliva is able to recruit a higher number of macrophages in the air pouch of BALB/c mice that correlates with the increase in CCL2/MCP-1 and CCR2 expression. Moreover, by using bindarit, a molecule that has been shown to inhibit CCL2/MCP-1 production both in vitro and in vivo (13–15) and MCP-1 neutralizing Abs, we observed a reinforced role of CCL2/MCP-1 in orchestrating the recruitment of macrophages to the BALB/c air pouch.

Materials and Methods

Mice

Inbred BALB/c and C57BL/6 mice of both sexes, 8–12 wk of age were obtained from the animal facility of Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ, Bahia, Brazil). The experimental procedures were approved and conducted according to the Animal

*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ), and [†]Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil; [‡]Department of Pharmacology, Angelini Farmaceutici, Santa Palomba-Pomezia, Rome, Italy; [§]Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; and [¶]Instituto do Milênio-CPqGM, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Received for publication March 22, 2005. Accepted for publication October 10, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by National Institutes of Health Grant AI30639 and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C.R.T. and M.J.T. are recipients of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and R.B.B.G. is the recipient of CNPq scholarship awards. C.S.S., B.B.A., and I.R.-N. are scientific initiation fellows and J.S.S., A.B., C.B., and M.B.-N. are senior investigators of CNPq.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Manoel Barral-Netto, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, 40296-710, Bahia, Brazil. E-mail address: mbarral@cpqgm.fiocruz.br

³ Abbreviation used in this paper: SGH, salivary gland homogenate.

Care and Utilization Committee of the CPqGM-FIOCRUZ (Process no. 070).

Parasites

Leishmania chagasi (MHOM/BR00/MER/STRAIN2) promastigotes were cultured in Schneider's medium supplemented with 20% inactive FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin.

Air pouch and leukocyte migration

Air pouches were prepared by injecting 3 ml of air into the dorsal surface of BALB/c and C57BL/6 mice under light anesthesia. One hundred microliters of SGH (0.5 pair/animal) or SGH preincubated with anti-SGH serum (0.5 pair/animal plus 50 μ l of serum preincubated for 1 h at 37°C) in endotoxin-free saline were injected into the air pouches immediately following an air injection, as previously described (16). Control mice were injected with 100 μ l of endotoxin-free saline (negative control) or LPS (20 μ g/ml; positive control). After 2, 4, 6, 12, and 24 h intrapouch inoculation, three to five animals per experimental group were lethally anesthetized, and the pouch washed with a total of 5 ml of endotoxin-free saline to collect leukocytes of the exudates. Lavage fluids were centrifuged at 100 \times g for 10 min at 4°C, and pellets were resuspended in saline, stained in Turk's solution, and counted in a Neubauer hemocytometer. Differential cell counts were done microscopically on cytospin preparations stained with H&E.

Sand flies and preparation of salivary glands

L. longipalpis sand flies, 5- to 7-day-old females of the Cavunge strain, were reared at Laboratório de Imunoparasitologia (CPqGM) using a mixture of rabbit feces and rabbit ration as larval food. Sand fly colonies were maintained at 26°C. Adult male sand flies were offered a sucrose solution, and females were fed on lightly anesthetized hamsters (*Mesocricetus auratus*). Salivary glands were obtained from 5- to 7-day-old laboratory-bred *L. longipalpis* females. Salivary glands were dissected, placed in endotoxin-free PBS on ice, and stored at -70°C. Immediately before use, glands were sonicated and microfuged at 10,000 \times g for 2 min, and the supernatant was used for the studies.

Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers specific for mouse chemokines and chemokine receptors were used to amplify cDNA by PCR. β -actin primers were used as a control to evaluate the expression of a housekeeping gene. The primers for chemokines, chemokine receptors, and β -actin were prepared at Invitrogen Life Technologies based on sequences published elsewhere (17, 18).

RNA isolation and cDNA preparation by reverse transcription

Total RNA was extracted from the air pouch lining tissue using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Briefly, after cell lysis, RNA was precipitated with isopropanol, washed with 70% ethanol, and solubilized in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA concentration and purity was determined by measuring at A_{260} and A_{280} , and samples were immediately stored at -70°C. cDNA synthesis was performed on ~1-2 μ g of RNA in a total volume of 20 μ l containing 2.5 μ M oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers, 1 mM dNTP (Invitrogen Life Technologies), 1 \times first-strand buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), 20 U of RNase inhibitor, and 50 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). The reaction mixture was incubated at 42°C for 50 min and stopped at 95°C for 5 min.

Chemokine and chemokine receptors mRNA detection

Expression of mRNA was analyzed by RT-PCR for the following: CCL2/MCP-1 (JE, murine homologue), CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCR2, and β -actin. A 5- μ l aliquot of the cDNA obtained was amplified in a 25- μ l reaction containing 1 \times PCR buffer (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM each dNTP, 200 nmol each primer, and 1 U of TaqDNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research). Reaction conditions were 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 54-55°C, and 2 min at 72°C, with a final extension step of 7 min at 72°C. For each set of primers, a negative sample (water) was run in parallel. PCR products were visualized by UV light after electrophoresis through a 6% acrylamide gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide. The sizes of the RT-PCR products were confirmed by comparison with a 100-bp ladder run in parallel on the same gel. The band intensity of the amplified products was analyzed using Eagle-Sight v.3.2 software (Stratagene). The results are expressed as a ratio of expression of chemokine or chemokine receptor to β -actin expression.

J774 macrophage cell culture and stimulation

The mouse macrophage cell line J774E was maintained at 37°C in 5% CO₂ in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (HyClone Laboratories), 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin/ml (Invitrogen Life Technologies).

Cells (4×10^5 per ml) were plated in 24-well culture plates (Costar) containing 13-mm diameter glass coverslips (Novocastra Laboratories) in duplicates. After 24 h, macrophages were treated or not with LPS (50 μ g/ml) or SGH (0.5 pair/well) or SGH preincubated for 1 h at 37°C with specific anti-SGH serum. Eight hours after stimulation, coverslips were removed and fixed with methanol for 5 min.

Immunohistochemical reactions

Methanol-fixed J774 cells on 13-mm diameter glass coverslips (Novocastra Laboratories) were processed for immunohistochemical assessment of chemokines. Coverslips were incubated with 10% nonfat milk for 20 min at room temperature to block nonspecific binding and to help prevent excessive drying out of the section. Primary Abs (50 μ l, 1/100) of CCL2/MCP-1,

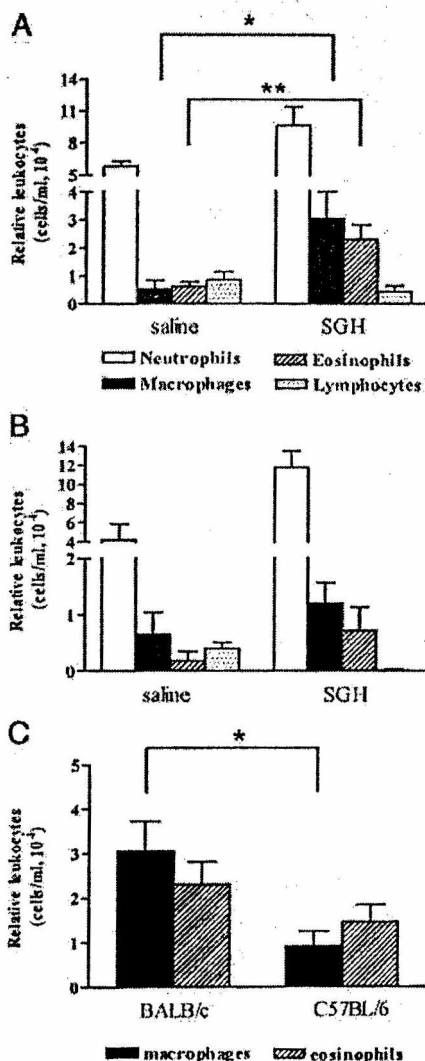


FIGURE 1. Leukocyte infiltration into BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice air pouch tissue. Pouches were stimulated with 0.1 ml of endotoxin-free saline, or *L. longipalpis* saliva (with SGH at 0.5 pair/animal). Twelve hours after stimulation, pouches were washed and differential cell counts performed in Turk's solution. Values represent mean \pm SEM of four mice per group. C, Representation of difference between macrophage and eosinophil recruitment in BALB/c and C57BL/6 mice. Significant difference from value for macrophage (*, $p = 0.0390$) and eosinophils (**, $p = 0.0210$) between saline and SGH-treated groups.

CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, or CCR2 (Santa Cruz Biotechnology), diluted in PBS containing 0.01% of saponin, were added and incubated overnight at 4°C. Coverslips were washed three times with PBS containing 1% Triton X-100 (Amresco), 5 min each wash, and then secondary Ab (50 μ l, 1/300 dilution of anti-rabbit or anti-goat biotin conjugate; Vector Laboratories) was added and incubated for 45 min in a moist chamber at room temperature. Coverslips were then washed three times with PBS containing 1% of Triton X-100 as previously described. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with 3% H₂O₂ for 20 min at room temperature, and then 50 μ l of streptavidin-peroxidase (Vectastain ABC kit, mouse IgG; Vector Laboratories) was added for 30 min at room temperature. Chromogen reaction was developed with 3-3'-diaminobenzidine (DAB kit; Vector Laboratories) solution and counterstained with Mayer's hematoxylin. J774 cells stimulated with LPS were used as positive controls. Monoclonal Abs were substituted for nonimmune rabbit Igs or irrelevant mouse Abs as negative controls.

Treatments

Bindarit or 2-methyl-2-([1-phenylmethyl]-1H-indazol-3-yl)methoxy)propanoic acid (Angelini Farmaceutici) was administered at the dose of 200 mg/kg i.p. 1 h before and 7 h after air pouch induction and SGH stimulation (0.5 pair/animal). The dose of bindarit was chosen based on earlier reports showing that the molecule is a preferential inhibitor of CCL2/MCP-1 synthesis (13-15). For anti-MCP-1 mAb treatment, animals received an i.p.

injection of purified neutralizing anti-MCP-1 mAb (R&D Systems) in a final volume of 200 μ l (100 μ g) 1 h before air pouch induction and SGH stimulation (0.5 pair/animal).

Sand fly anti-saliva serum

Hamsters (*M. auratus*) were exposed to bites from 5- to 7-day-old female *L. longipalpis* (Cavunge strain). Three animals were lightly anesthetized and exposed three times to ~50 bites every 15 days. Fifteen days after the last exposure, animals were sacrificed and serum was collected and tested for IgG anti-saliva detection by ELISA, as previously described (19).

Sensitization of mice

Groups of mice ($n = 10$) were sensitized five times by natural exposure to 15 uninfected *L. longipalpis* females in the left ear at 10-day intervals. A week after the last exposure, sera were collected to evaluate the presence of IgG anti-SGH. Mice considered positive (cutoff = 0.045) were used to induce air pouch stimulated with SGH as earlier described.

Statistical analysis

Data were reported as the mean \pm SEM and were analyzed statistically by means of ANOVA or the Student *t* test with the level of significance at $p < 0.05$.

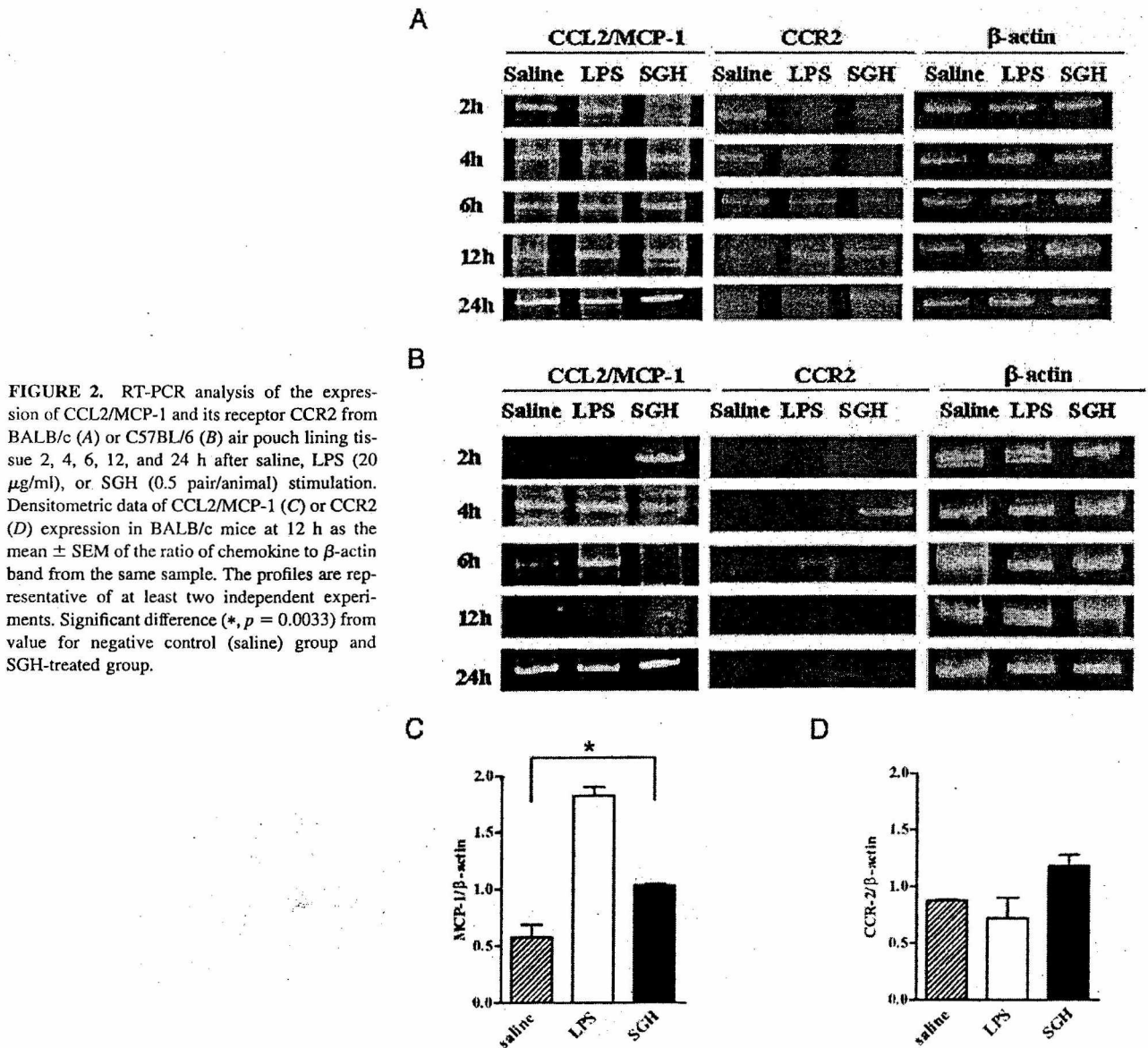


FIGURE 2. RT-PCR analysis of the expression of CCL2/MCP-1 and its receptor CCR2 from BALB/c (A) or C57BL/6 (B) air pouch lining tissue 2, 4, 6, 12, and 24 h after saline, LPS (20 μ g/ml), or SGH (0.5 pair/animal) stimulation. Densitometric data of CCL2/MCP-1 (C) or CCR2 (D) expression in BALB/c mice at 12 h as the mean \pm SEM of the ratio of chemokine to β -actin band from the same sample. The profiles are representative of at least two independent experiments. Significant difference (*, $p = 0.0033$) from value for negative control (saline) group and SGH-treated group.

Results

Effect of SGH on leukocyte recruitment in vivo

To investigate the inflammatory effect of *L. longipalpis* saliva we used the air pouch model previously described as an in vivo recruitment model that allows exudate analysis (20, 21). Air pouches were raised on BALB/c and C57BL/6 mice injected with SGH (0.5 pair/ml), LPS (20 μ g/ml), or saline, and after 12 h the exudate was collected. Although few cells were found in the pouch exudate when endotoxin-free saline was injected, SGH from both *L. longipalpis* and LPS (data not shown) were potent recruiters for neutrophils and lymphocytes in either BALB/c or C57BL/6 mice (Fig. 1, A and B). However, only SGH induced an increase in macrophage and eosinophil recruitment in BALB/c mice, whereas this effect was not observed in C57BL/6 mice. This result was reinforced when the difference between macrophage and eosinophil recruitment in BALB/c and C57BL/6 mice was compared (Fig. 1C), showing that the increase was only observed in BALB/c mice after 12 h. In addition, our results describe an important inflammatory event driving macrophage chemotaxis mediated by SGH.

Expression of CCL2/MCP-1 in the air pouch lining tissue

After detecting the increase in macrophage recruitment due to SGH stimulation we decided to investigate the participation of the macrophage recruiting chemokines CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, and CCL2/MCP-1. Injection of SGH in the air pouch induced nonsignificant expression of CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , and CCL5/RANTES (data not shown). Of note after SGH stimulation, there was an expression of CCL2/MCP-1 at 4, 6, 12, and 24 h in the lining tissue of BALB/c, but only expression at 2 and 4 h in C57BL/6 mice (Fig. 2, A and B). The receptor for CCL2/MCP-1, CCR2, was also detected at 12 h in BALB/c and at 4 h in C57BL/6 mice. Densitometric analysis at 12 h in BALB/c mice revealed a significant increase in expression of CCL2/MCP-1 in SGH-treated mice when compared with saline control, but not as high as LPS (Fig. 2C), whereas the increase in CCR2 expression in SGH-treated mice was similar to the increase in saline controls (Fig. 2D). It is noteworthy that densitometric analysis of SGH induced CCL2/MCP-1 expression at 2 and 4 h in C57BL/6 mice (maximum expression) compared with 12 h in BALB/c mice (data not shown) showed a higher expression of CCL2/MCP-1 on BALB/c mice than in C57BL/6 mice induced by SGH. A basal CCL2/MCP-1 production in the lining tissue from the nonstimulated mice may be due to resident tissue cells acting as an early source of mediators while infiltrating cells could be the source of chemokines at a higher intensity after SGH injection (22). The higher expression of CCL2/MCP-1 only in BALB/c mice suggests the involvement of this CC chemokine in this phenomenon and may be responsible for the increased macrophage recruitment.

Production of CCL2/MCP-1 in vitro

Because we demonstrated an increased expression of CCL2/MCP-1 mRNA in the lining tissue of BALB/c, we decided to investigate whether SGH was able to induce CCL2/MCP-1 production in vitro. J774, a BALB/c macrophage cell line, was cultured in the presence of SGH. After 6 h, immunohistochemical reactions for detection of CCL2/MCP-1 were performed. SGH induced an increased production of CCL2/MCP-1 that was not seen in the untreated control (Fig. 3, A and B) and was comparable to LPS-induced CCL2/MCP-1 production (data not shown). To confirm that this effect was SGH specific, we preincubated SGH with anti-SGH serum. In this case, CCL2/MCP-1 production was completely inhibited, suggesting that the stimulatory effect induced by SGH was neutralized and again confirming the ability of SGH to induce CCL2/MCP-1 production (Fig. 3C).

Inhibition of CCL2/MCP-1

To investigate whether the increase of macrophage recruitment as a result of SGH stimulation was due to an increase of CCL2/MCP-1 expression, a group of BALB/c mice was previously treated with bindarit, an inhibitor of CCL2/MCP-1 synthesis, and also with anti-MCP-1 neutralizing mAb. Treatment with bindarit or anti-MCP-1 mAb treatment resulted in significant reduction of macrophage recruitment (Fig. 4, A and B). Bindarit resulted in total inhibition of CCL2/MCP-1 expression. Interestingly, anti-MCP-1 mAb treatment also led to a decrease in CCL2/MCP-1 expression evidenced by RT-PCR (Fig. 4A). Chemokine mRNA expression seems to be dependent on previous chemokine production and can function as a regulatory mechanism, i.e., lower concentration of protein can lead to a decrease in the message of the molecules (23, 24). Together, these results reinforce that CCL2/MCP-1 is the CC chemokine most likely responsible for the increased macrophage recruitment induced by SGH.

Inhibition of macrophage recruitment with anti-SGH serum

Because SGH effect on J774 cells was abrogated after preincubation with anti-SGH in vitro, we decided to investigate whether SGH effect could be inhibited in vivo as well. When SGH was preincubated with specific antiserum there was a reduction in macrophage recruitment. However, neutrophil, eosinophil, and lymphocyte migration remained similar to the LPS-positive control (Fig. 5). Preincubation of SGH with specific antiserum lead to a 68% abrogation of the macrophage recruitment when compared with the effect of SGH alone. Although 3.1×10^4 macrophages were recruited by SGH, only 1.0×10^4 macrophages were observed under stimulus with SGH preincubated with anti-SGH serum. No such abrogation was observed with neutrophils, eosinophils, or lymphocytes (9.68×10^4 vs 12.6×10^4 with SGH and

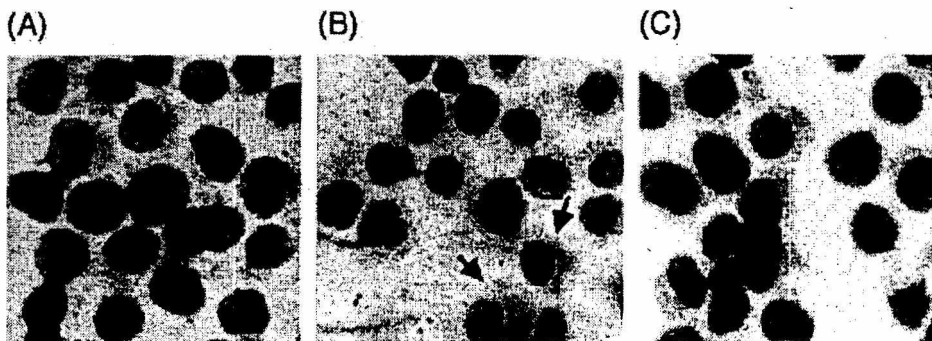


FIGURE 3. CCL2/MCP-1 production in vitro after stimulation with SGH. J774 cells were plated in 24-well culture plates containing glass coverslips. After 24 h, macrophages were untreated (A) or treated with SGH (0.5 pair/well) (B) or with SGH preincubated with anti-*L. longipalpis* SGH serum (C). Eight hours after stimulation coverslips were removed and immunohistochemical reaction was performed for MCP-1 detection (arrows).

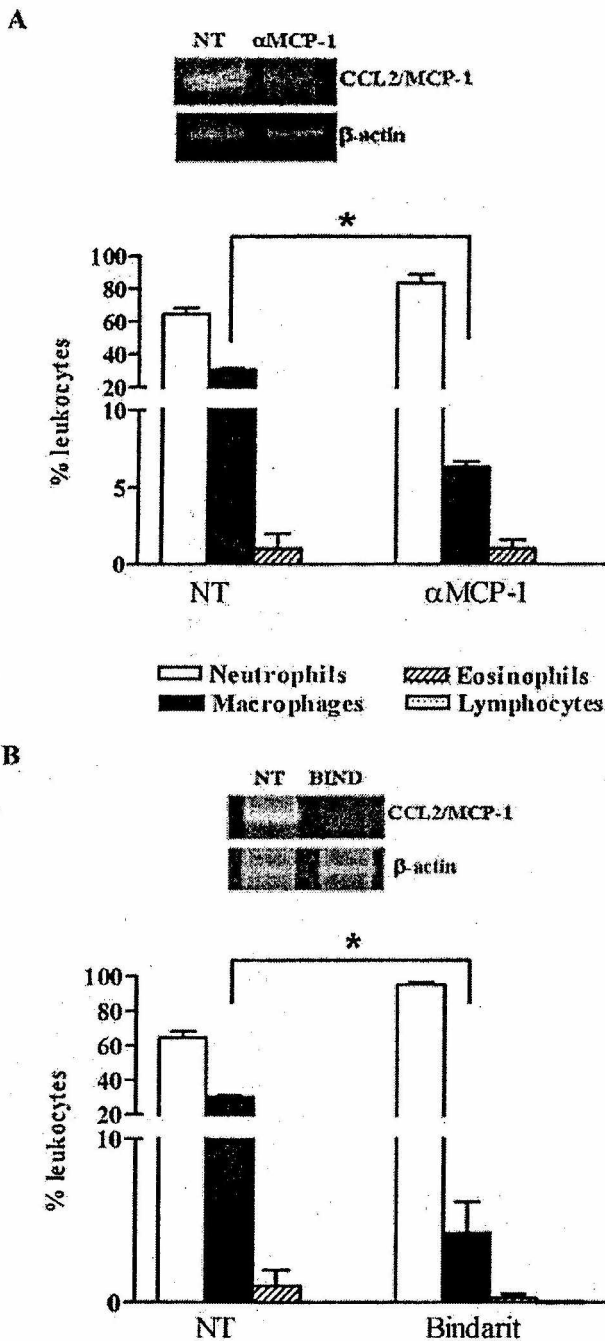


FIGURE 4. Inhibition of CCL-2/MCP-1. **A**, Leukocyte infiltration into BALB/c air pouches treated with anti-MCP-1 mAb i.p. treatment (100 μ g) 1 h before SGH stimulation and RT-PCR analysis of CCL2/MCP-1 from nontreated (NT) anti-MCP-1 mAb treated (α MCP-1) BALB/c air pouch lining tissue 12 h after SGH (0.5 pair/animal) stimulation. **B**, Leukocyte infiltration into BALB/c mice air pouches treated with bindarit (200 mg/kg i.p.) 1 h before and 7 h after SGH stimulation and RT-PCR analysis of CCL2/MCP-1 from nontreated (NT) and bindarit-treated (BIND) BALB/c air pouch lining tissue 12 h after SGH (0.5 pair/animal) stimulation. Values represent mean \pm SEM of four mice per group. Significant difference (*, $p = 0.0259$) from value for macrophage recruitment in control and treated groups.

SGH plus anti-SGH serum, respectively for neutrophils). Preincubation of LPS with anti-SGH serum did not result in LPS-induced inflammatory response inhibition confirming the antiserum specificity. This result suggests the presence of macrophage chemotac-

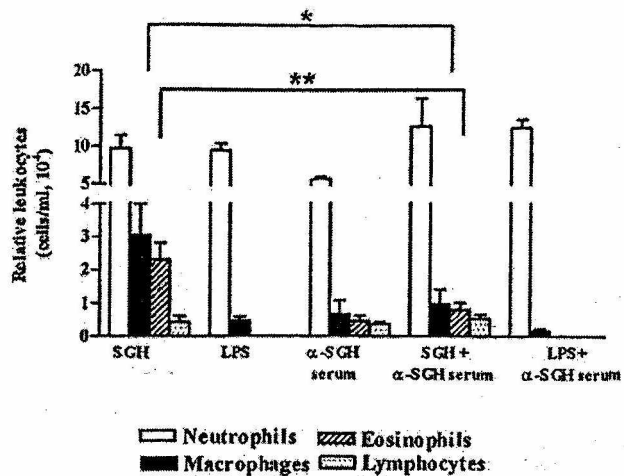


FIGURE 5. Specific inhibition of macrophage recruitment after SGH stimulation. Air pouches in BALB/c mice were stimulated with LPS (20 μ g/ml), SGH (0.5 pair/animal), anti-SGH serum (α -SGH), LPS, or SGH preincubated for 1 h with anti-*L. longipalpis* SGH serum. Significant difference from value for macrophages (*, $p = 0.0364$) and eosinophils (**, $p = 0.0286$) between SGH and SGH + anti-SGH groups.

tic components in SGH that can be neutralized by Abs present in the specific antiserum.

Inhibition of SGH macrophage recruitment by naturally induced anti-SGH Abs

Accumulating evidence points to the importance of Abs anti-saliva in protection of immunized mice (4, 5). To further understand the effect of anti-SGH serum, we decided to test whether SGH chemotactic effect could also be inhibited by Abs produced in BALB/c mice preexposed to bites from uninfected *L. longipalpis*. The chemoattractive effect induced by SGH was severely reduced in pre-exposed animals: macrophage recruitment was dramatically decreased (78.2% inhibition), whereas neutrophil had a smaller reduction (41.5% inhibition) (Fig. 6A). In addition, expression of CCL2/MCP-1 in the air pouch lining tissue of exposed mice was completely abrogated 12 h after SGH stimulation (Fig. 6B). This result reinforces the importance of Abs anti-saliva in SGH-mediated macrophage recruitment.

Effect of *L. chagasi* and SGH on leukocyte recruitment in vivo

After demonstrating the inflammatory effect of SGH we investigated whether it was able to modify the inflammatory response induced by *L. chagasi*, the parasite transmitted by *L. longipalpis* sand flies. Exudate cells were collected 12 h later and showed that both SGH and *L. chagasi* induced recruitment of neutrophils and macrophages in BALB/c mice (Fig. 7). However, *L. chagasi* was able to induce the recruitment of a greater number of cells to the pouch space when compared with SGH alone. The combination of *L. chagasi* with SGH resulted in an exacerbated inflammatory response indicating that SGH also has an effect on the parasite recruitment profile, which is an additive effect on *L. chagasi*-induced leukocyte recruitment.

Discussion

The data presented in this study indicate that SGH from *L. longipalpis* induces an increased macrophage recruitment into the murine air pouch. Several studies have described the use of the mouse air pouch model as a very consistent and straightforward model to investigate inflammatory response, creating the environment for

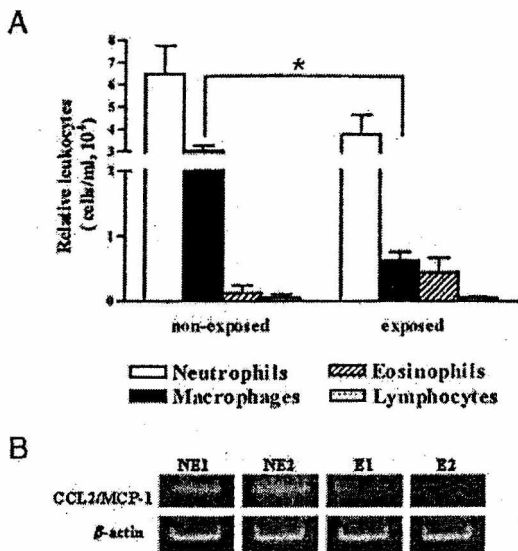


FIGURE 6. Inhibition of SGH effect in vivo in BALB/c mice ($n = 6$) sensitized with bites from *L. longipalpis*. **A**, BALB/c mice were exposed five times to *L. longipalpis* bites (10-day intervals) or nonexposed. Ten days after the last exposure, air pouches were induced and stimulated with SGH. Significant difference ($*$, $p = 0.0366$) from macrophage recruitment value is represented for nonexposed and exposed group. **B**, RT-PCR analysis of CCL2/MCP-1 from nonexposed (NE) and exposed (E) BALB/c air pouch lining tissue 12 h after SGH (0.5 pair/animal) stimulation. The results are representative of three experiments.

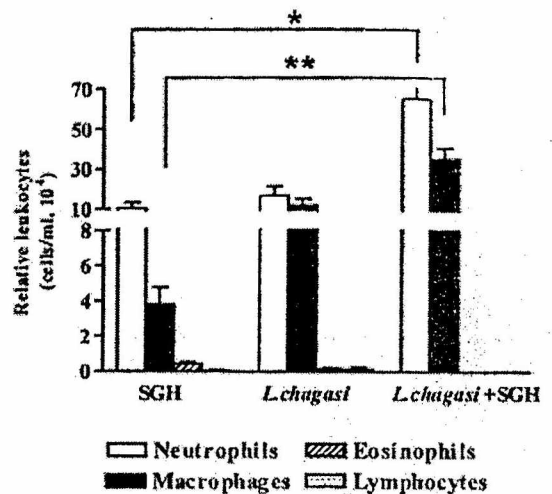


FIGURE 7. Effect of *Leishmania* on leukocyte infiltration into BALB/c mice air pouches. Pouches were stimulated with 0.1 ml of *L. longipalpis* saliva (SGH; 0.5 pair/animal), 10^7 stationary phase *L. chagasi* or *L. chagasi* + SGH for 12 h. After stimulation pouches were washed and differential cell counts performed in Turk's solution. Values represent mean \pm SEM of four mice per group. Significant difference from neutrophil ($*$, $p = 0.0043$) and macrophage ($**$, $p = 0.0039$) recruitment value for SGH, *L. chagasi*, and *L. chagasi* + SGH stimulated groups is represented.

collection and phenotypic analysis of cells migrating into the pouch space (20, 21, 25). Interestingly, SGH was able to induce neutrophil, eosinophil, and macrophage recruitment after 12 h in BALB/c but not in C57BL/6 mice. Neutrophil recruitment was similar to other stimuli (LPS, for example), whereas eosinophils were increased as compared with the increase in control mice. Eosinophils have been strongly related to mosquito bites and allergies. Actually, eosinophilia was detected on dogs intradermally inoculated with saliva from *L. longipalpis* (26), in the inflammatory process at the site of immunization of mice with recombinant 15-kDa protein from *P. papatasi*, and also in cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania braziliensis* and *L. longipalpis* saliva (27, 28). Eosinophils may participate in vasodilation favoring sand fly feeding but may alternatively be important players in creating an inhospitable environment for potential invaders transmitted with saliva (29).

Recent observations suggest that *L. longipalpis* saliva induced an intense and diffuse inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, eosinophils, and macrophages observed up to 48 h in the ear dermis of BALB/c mice exposed to bites from uninfected sand flies (30). Of further interest was the increased macrophage recruitment induced by SGH in BALB/c but not in C57BL/6 mice. These two mouse strains differ in their susceptibility for *Leishmania*, as BALB/c mice are highly susceptible and C57BL/6 mice are partially resistant to several *Leishmania* species (31, 32). The fact that these animals, which differ in their response to *Leishmania*, also differ in their inflammatory response to sand fly saliva is noteworthy. Several studies have clearly demonstrated that salivary gland lysate inhibits NO (33), H_2O_2 production (34), and Ag presentation (35) by macrophages. The exacerbation of disease has been also associated with inhibition of the production of Th1 cytokines and with enhancement of IL-4 Th2 cytokine by saliva from *P. papatasi* (36). The capacity of macrophages to respond to Th1 activation signals against intracellular pathogens during the non-

immune early phases of infection is crucial for determining whether the invading organisms proliferate or are eliminated. A lack of macrophage recruitment has also been related to failure of lesion enlargement in an immunodeficient murine model (37).

This increased macrophage recruitment was linked to CCL2/MCP-1 and its receptor CCR2 expression in the air pouch lining tissue but not other macrophage recruiting CC chemokines (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , or CCL5/RANTES). SGH was able to induce a strong CCL2/MCP-1 and CCR2 expression in BALB/c mice, whereas only a weak expression was observed 2 and 4 h in C57BL/6 mice. Even in these time points, the expression of this chemokine and its receptors was much weaker in C57BL/6 when compared with BALB/c mice (data not shown). Moreover, neutralization with anti-MCP-1 mAb resulted in a significant reduction of macrophages recruited and inhibition of CCL2/MCP-1 expression. This result was reinforced by using bindarit, an original indazole derivative devoid of systemic immunosuppressive effects and of activity on arachidonic acid metabolism, which has been shown the ability to inhibit CCL2/MCP-1 synthesis both in vitro and in vivo (13–15). Bindarit-treated mice showed a significant reduction of macrophage recruitment and also inhibition of CCL2/MCP-1 expression in the lining tissue. Together, these results indicate that CCL2/MCP-1 is the CC chemokine involved in macrophage recruitment after SGH stimulation.

Because macrophages and neutrophils were the main cell populations present in the lining tissue after SGH stimulation (data not shown), we decided to investigate whether SGH was also capable of inducing CCL2/MCP-1 by J774 macrophages in vitro. SGH induced CCL2/MCP-1 production that was abrogated by specific anti-SGH serum, indicating that SGH inflammatory effect could be inhibited by specific Abs. Interestingly, saliva effect on macrophage recruitment was also specifically inhibited without affecting polymorphonuclear cell recruitment in vivo when it was preincubated with specific anti-SGH Abs or in BALB/c mice naturally exposed to uninfected *L. longipalpis* bites. This result is particularly interesting because it mimetizes the real situation in an endemic area where individuals are constantly exposed to bites from

uninfected sand flies and they develop anti-saliva immune response. In fact, in children from an endemic area the development of an anti-saliva humoral response occurred at the same time as the appearance of anti-*Leishmania* cell-mediated immunity (8). Interestingly, the decrease in macrophage recruitment was associated with a strong inhibition of CCL2/MCP-1 expression in the exposed animals, which was also detected *in vitro* in J774 cells. These results suggest that probably one or more immunogenic molecules present in *L. longipalpis* saliva are responsible for this effect. The importance of anti-sand fly saliva Abs has also been emphasized. *Phlebotomus argentipes* allowed to feed on hamsters previously exposed to sand fly bites, which is associated with a small amount of blood ingestion, decreased the feeding rate on animals and lowered the numbers of eggs laid, suggesting that anti-sand fly saliva Abs bind and neutralize the sand fly products (38).

We next evaluated the role of SGH in modifying the inflammatory response induced by *L. chagasi*. The parasite was able to induce a strong inflammatory response composed by neutrophils, macrophages, and eosinophils. When *L. chagasi* was associated with SGH, there was an increase in leukocyte recruitment especially on neutrophil and macrophage recruitment, indicating an additive effect of SGH. Previous work has demonstrated that *Leishmania* triggers recruitment of a mixed population of inflammatory cells, such as macrophages, eosinophils, and neutrophils, which can vary between species and strains (20, 39). The ability of SGH to modulate *L. chagasi* inflammatory response by increasing leukocyte recruitment is interesting because a potent macrophage recruitment may be related to higher susceptibility to *Leishmania* and linked to recently recruited macrophages being "safe havens" for this parasite (40).

Taken together, the results obtained in this study suggesting that SGH from *L. longipalpis* can act on inflammatory mediators leading to an increase in macrophage recruitment probably due to expression of CCL2/MCP-1 are particularly interesting. The ability of SGH to modulate initial recruitment of macrophages to the bite site might facilitate the entry of *Leishmania* into their host cells and their establishment in the hostile environment of the vertebrate skin. CCL2/MCP-1 has been associated with Th2 polarization (41) but also with *L. major* killing by human monocytes (42). Overall, understanding the role of vector saliva components is important as these molecules could be future targets for pharmacologic or vaccine interventions (43).

Acknowledgments

We thank Edvaldo Passos for technical assistance with the insect colony and Dr. Allen Cheever (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for helpful suggestions. We thank Dr. G. Biondi from Angelini Farmaceutici (Santa Palomba-Pomezia, Rome, Italy) for providing bindarit for CCL2/MCP-1 inhibition experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Reunala, T., H. Brummer-Korvenkontio, and T. Palouso. 1994. Are we really allergic to mosquito bites? *Ann. Med.* 26: 301-306.
- Shan, E., Y. Taniguchi, M. Shimizu, K. Ando, Y. Chinzai, C. Suto, T. Ohtaki, and N. Ohtaki. 1995. Immunoglobulins specific to mosquito salivary gland proteins in the sera of persons with common or hypersensitivity reactions to mosquito bites. *J. Dermatol.* 22: 411-418.
- Samuelson, J., E. Lerner, R. Tsch, and R. Titus. 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173: 49-54.
- Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.* 188: 1941-1953.
- Kamhawi, S., B. Yasmine, G. Modi, E. Rowton, and D. L. Sacks. 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354.
- Titus, R., and J. Ribeiro. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308.
- Barral, A., E. Honda, A. Caldas, J. Costa, V. Vinhas, E. Rowton, J. Valenzuela, R. Charlab, M. Barral-Netto, and J. Ribeiro. 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 740-745.
- Gomes, R., C. Brodskyn, C. de Oliveira, J. Costa, J. Miranda, A. Caldas, J. Valenzuela, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2002. Seroprevalence against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J. Infect. Dis.* 186: 1530-1534.
- Kaye, P. M. 1987. Acquisition of cell-mediated immunity to *Leishmania*. I. Primary T-cell activation detected by IL-2 receptor expression. *Immunology* 61: 345-349.
- Kaye, P., N. Patel, and J. Blackwell. 1988. Acquisition of cell-mediated immunity to *Leishmania*. II. *LSH* gene regulation of accessory cell function. *Immunology* 65: 17-22.
- Anjili, C., P. Mbat, R. Mwangi, J. Githure, J. Olobo, L. Robert, and D. Koech. 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Phlebotomidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop.* 60: 97-100.
- Zer, R., I. Yaroslavski, L. Rosen, and A. Warburg. 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* 31: 810-814.
- Sironi, M., A. Guglielmotti, N. Polentarutti, F. Fioretti, C. Milanese, M. Romano, C. Vignini, I. Coletta, S. Sozzani, S. Bernasconi, et al. 1999. A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the production of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Eur. Cytokine Network* 10: 437-442.
- Guglielmotti, A., E. D'Onofrio, I. Coletta, L. Aquilini, C. Milanese, and M. Pinza. 2002. Amelioration of rat adjuvant arthritis by therapeutic treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 and TNF- α production. *Inflamm. Res.* 51: 252-258.
- Bhatia, M., R. D. Ramnath, L. Chevali, and A. Guglielmotti. 2005. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. *Am. J. Physiol.* 288: G1259-G1265.
- Muller, K., B. Hansen, H. Laufs, N. Jahnke, W. Solbach, and T. T. Laskay. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 190: 73-76.
- Kawakami, K., M. Tohyama, X. Qifeng, and A. Saito. 1997. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. *Infect. Immun.* 65: 1307-1312.
- Neumann, B., K. Emmanuilidis, M. Stadler, and B. Holzmann. 1998. Distinct functions of interferon- γ for chemokine expression in models of acute lung inflammation. *Immunology* 95: 512-521.
- Ghatak, S., S. Roy, and D. K. Ghosh. 1982. Isolation and partial characterization of antigen from *Leishmania donovani* promastigotes and its possible use in serodiagnosis. *Indian J. Med. Res.* 76: 164-173.
- Matte, C., and M. Olivier. 2002. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J. Infect. Dis.* 185: 673-681.
- Forget, G., C. Matte, K. Siminovich, S. Rivest, P. Pouliot, and M. Olivier. 2005. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur. J. Immunol.* 35: 1906-1917.
- García-Ramallo, E., T. Marques, N. Prats, J. Belceta, S. L. Kunkel, and N. Godessart. 2002. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J. Immunol.* 169: 6467-6473.
- Davenport, R. D., M. Burdick, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1994. Monocyte chemoattractant protein production in red cell incompatibility. *Transfusion* 34: 16-19.
- John, A., J. Galea, S. Francis, C. Holt, and A. Finn. 1998. Interleukin-8 mRNA expression in circulating leucocytes during cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 13: 409-417.
- Tessier, P., P. Naccache, K. Diener, R. Gladue, K. Neote, I. Clark-Lewis, and S. McColl. 1998. Induction of acute inflammation *in vivo* by staphylococcal superantigens II critical role for chemokines ICAM-1 and TNF- α . *J. Immunol.* 161: 1204-1211.
- Paranhos, M., W. Dos Santos, I. Sherlock, G. Oliveira, and L. De Carvalho. 1993. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88: 249-251.
- Donnelly, K., H. Lima, and R. G. Titus. 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J. Parasitol.* 84: 97-103.
- Valenzuela, J., Y. Belkaid, M. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E. Rowton, D. Sacks, and J. Ribeiro. 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.* 194: 331-342.
- Belkaid, Y., J. Valenzuela, S. Kamhawi, E. Rowton, D. Sacks, and J. Ribeiro. 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6704-6709.
- Silva, F., R. Gomes, D. Prates, J. Miranda, B. Andrade, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in Balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72: 94-98.

31. Skov, C. B., and D. W. Twohy. 1974. Cellular immunity to *Leishmania donovani*. I. The effect of T cell depletion on resistance to *L. donovani* in mice. *J. Immunol.* 113: 2004–2011.
32. Childs, G. E., L. K. Lightner, L. McKinney, M. G. Groves, E. E. Price, and L. D. Hendricks. 1984. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78: 25–34.
33. Hall, L., and R. G. Titus. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 155: 3501–3506.
34. Titus, R., and J. Ribeiro. 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. *Parasitol. Today* 6: 157–160.
35. Theodos, C. M., and R. G. Titus. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite Immunol.* 15: 481–487.
36. Mbow, L., J. Bleyenbergh, L. Hall, and R. Titus. 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 161: 5571–5577.
37. Barral-Netto, M., J. da Silva, A. Barral, and S. Reed. 1995. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Pathol.* 146: 635–642.
38. Ghosh, K., and J. Mukhopadhyay. 1998. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int. J. Parasitol.* 28: 275–281.
39. Teixeira, M., J. Fernandes, C. Teixeira, B. Andrade, M. Pompeu, J. da Silva, C. Brodskyn, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect. Immun.* 73: 1191–1195.
40. Mirkovich, A., A. Galelli, A. Allison, and F. Modabber. 1986. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 64: 1–7.
41. Gu, L., S. Tseng, R. Horner, C. Tam, M. Loda, and B. Rollins. 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404: 407–411.
42. Ritter, U., and H. Moll. 2000. Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. *Eur. J. Immunol.* 30: 3111–3120.
43. Brodskyn, C., C. de Oliveira, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2003. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert. Rev. Vaccines* 2: 705–717.

10.2. ANEXO II

CLARISSA R. TEIXEIRA; REGIS B. B. GOMES; MANOEL BARRAL-NETTO;
ALDINA BARRAL; CLÁUDIA BRODSKYN. Influência da saliva dos flebotômíneos
na leishmaniose experimental e humana. **Gazeta Médica da Bahia**. 75: 18-23, 2005.

Influência da Saliva de Flebotômíneos na Leishmaniose Experimental e Humana

Role of Sand Fly Saliva in Experimental and Human Leishmaniasis

Clarissa Teixeira^{1,2}, Regis Gomes^{1,2}, Manoel Barral-Netto^{1,2,3}, Aldina Barral^{1,2,3}, Cláudia Brodskyn^{1,2,3}
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ¹; Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA²; Instituto de
 Investigação em Imunologia; Salvador, BA, Brasil

A leishmaniose é transmitida pela picada do vetor flebotomíneo infectado. A saliva deste flebótomo possui um repertório de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro. Os eventos iniciais entre a leishmania e o sistema imune do hospedeiro estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da infecção ou à proteção contra o parasita. Os componentes da saliva influenciam diretamente essas interações. Estes componentes têm sido bastante explorados e vários trabalhos na literatura têm estudado estes aspectos. Nesta revisão, discutimos as contribuições da literatura, que procuram esclarecer a influência da saliva na resposta imune inicial anti-leishmania do hospedeiro e no estabelecimento da infecção, trazendo novas perspectivas para o tratamento, controle e profilaxia da doença.

Palavras-chave: Vetor, saliva, *Leishmania*, infecção.

Leishmaniasis are transmitted to their vertebrate host by infected phlebotomine sand fly. The saliva from these insects contains a repertoire of pharmacologically active molecules that are able to interfere with the host's haemostatic, inflammatory and immune responses. The initial events between Leishmania and the host's immune response are directly related to disease progression or protection against the parasite, and saliva contributes directly to these interactions. Recent work in the literature has described these aspects, and these interactions have been extensively investigated. In this literature review, we have identified reports that explain the role of saliva in the initial immune response against Leishmania in the host and against infection, bringing new perspectives for treatment, prophylaxis and disease control.

Key words: Vector, saliva, *Leishmania*, infection.

As leishmanioses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* constituem um problema sério de saúde pública em várias regiões do mundo. Os flebotômíneos, vetores das leishmanioses, ingerem os parasitas quando picam o hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas, que vivem de forma intracelular no hospedeiro vertebrado, transformam-

se em promastigotas no intestino do vetor, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas por volta de uma semana. A infecção por leishmania ocorre quando a fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo, necessário para maturação dos ovos, inocula o parasita no hospedeiro vertebrado⁽¹⁵⁾. Durante esse processo, o conteúdo da glândula salivar é depositado no local da picada, promovendo o bloqueio de mecanismos hemostáticos do hospedeiro que beneficiam o vetor na obtenção do alimento. Recentemente, a importância dos componentes da glândula salivar dos flebotômíneos em estabelecer uma infecção eficiente por leishmania, tem se tornado mais clara, trazendo novas perspectivas para o controle da doença.

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dra. Cláudia Brodskyn, R. Waldemar Falcão, 121, 40296-710 Salvador, BA, Brasil, Tel.: 55 71 3356 4320; FAX: 55 71 3356 4320, ramal: 261.

E-mail: brodskyn@cpqgm.fiocruz.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:18-23.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

Caracterização dos Componentes Salivares de Flebotomos

A obtenção de sangue como alimento para o vetor flebotomíneo tem como maior desafio enfrentar as dificuldades impostas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. A hemostasia, processo utilizado pelo hospedeiro para evitar a perda de sangue, é controlada por componentes anti-coagulantes, anti-agregação plaquetária e vasodilatadores da saliva^(13, 14, 18). Algumas dessas moléculas já foram caracterizadas, como a hialuronidase, que auxilia na difusão de outros componentes; a apirase, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaciclina, que bloqueiam a agregação plaquetária e promovem a dilatação sangüínea. Dentre as substâncias vasodilatadoras, o maxadilan, presente apenas na saliva de *L. longipalpis*, foi caracterizado como um potente vasodilatador⁽¹⁰⁾. Estas moléculas, com funções redundantes e sinérgicas, têm como objetivo principal a formação do “lago sangüíneo” para obtenção de alimento por parte dos flebotomos⁽¹³⁾.

Devido à importância da saliva no repasto sangüíneo dos flebotomíneos, na imunidade do hospedeiro e transmissão do patógeno, a caracterização dos componentes salivares responsáveis por essas atividades é necessária para compreender os mecanismos de ação bem como desenvolver novas estratégias para bloquear a transmissão do patógeno. A purificação dos componentes salivares tem sido um desafio devido à pequena quantidade de proteínas da glândula salivar. Muitas proteínas salivares com atividades anti-hemostáticas, inflamatórias e imunomodulatórias foram isoladas seguindo abordagens bioquímicas e da biologia molecular.

Novas abordagens experimentais encontram-se em desenvolvimento, na tentativa de se caracterizar moléculas presentes nas glândulas salivares dos vetores. As abordagens experimentais têm mudado do estudo de uma única molécula presente na glândula salivar para o estudo do complexo total de genes e proteínas secretadas pelos artrópodes, usando uma abordagem de “alta performance” (high-throughput). A idéia é combinar um protocolo de seqüência massiva de bibliotecas de cDNA da glândula salivar, uma

abordagem proteômica para isolar um grande grupo de proteínas salivares e ensaios de alta performance funcionais e biológicos para analisar e testar as atividades biológicas destas novas moléculas^(20,22). Estudos de alta performance genômicos e proteômicos têm resultado na descoberta de genes e proteínas que não foram anteriormente descritas em artrópodes. Essas novas abordagens permitem não somente a caracterização de fatores salivares envolvidos em homeostase e inflamação, mas também a identificação de novas proteínas salivares, cujas funções biológicas ainda não são conhecidas.

Outra alternativa para a genômica funcional é o uso da vacinação de DNA. A obtenção de plasmídeos contendo um promotor e cDNAs selecionados que podem ser injetados no animal para a indução de uma resposta imune seria mais eficiente do que produzir grandes quantidades de uma proteína recombinante para injetar em animais para produção de anticorpos⁽²¹⁾.

O Papel da Saliva em Modelos Experimentais

As proteínas salivares do vetor têm capacidade de modificar a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro. Como consequência, o parasita que é inoculado na derme durante a alimentação é favorecido pela presença da saliva, já que a mesma é capaz de exacerbar a infecção por leishmania em modelos murinos experimentais. A co-inoculação do sonificado de glândula salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* com *Leishmania major* na pata e, mais recentemente, na derme da orelha de camundongos, resultou em uma exacerbação dramática da lesão^(3,19). A *Leishmania braziliensis*, que normalmente não leva à infecção mesmo em camundongos suscetíveis como BALB/c, quando co-inoculado com SGS de *Lu. longipalpis* resultou em lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos^(6,11,16).

Os componentes presentes na saliva dos flebotomíneos também apresentam atividade imunogênica, induzindo à produção de anticorpos contra diferentes proteínas. O exato papel desses

anticorpos na exacerbação ou proteção à infecção por leishmania ainda não está totalmente esclarecido. Estudos têm sugerido um possível mecanismo de bloqueio na transmissão da leishmania. Animais expostos a picadas de flebótomos ou inoculados com o SGS desenvolvem elevados níveis de anticorpos IgG anti-saliva^(3,7,9,21,23). Recentemente, nosso grupo mostrou que camundongos BALB/c expostos a repetidas picadas de *Lu. Longipalpis*, transmissor da *L. chagasi*, produz anticorpos anti-saliva, além de um intenso infiltrado inflamatório⁽¹⁷⁾. Neste estudo, observou-se um predomínio de IgG, particularmente IgG1, mas não de IgG2a e IgG2b anti-saliva (Figura 1). A IgG total presente nesses animais reagiu predominantemente com três bandas protéicas presentes no SGS de *L. longipalpis* (16, 44 e 45 kDa). A inoculação de soro proveniente desses animais picados por *L. longipalpis* e previamente incubado com SGS do mesmo vetor, provocou uma resposta inflamatória inicial com a presença quase que exclusiva de neutrófilos, sugerindo a participação de imunocomplexos em gerar uma resposta inflamatória (Figura 1). A pré-exposição a picadas de *P. papatasi* ou inoculação do SGS em camundongos foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major*^(3,9,21). Ghosh & Mukhopadhyay (1998)⁽⁷⁾ atribuem aos anticorpos anti-saliva a dificuldade do *P. argentipes* em realizar um eficiente repasto sanguíneo em hamsters imunizados com picadas deste mesmo vetor. A percentagem de engorgitamento sanguíneo diminui e a mortalidade dos flebótomos aumenta à medida que os níveis de anticorpos anti-saliva aumentam nesses animais.

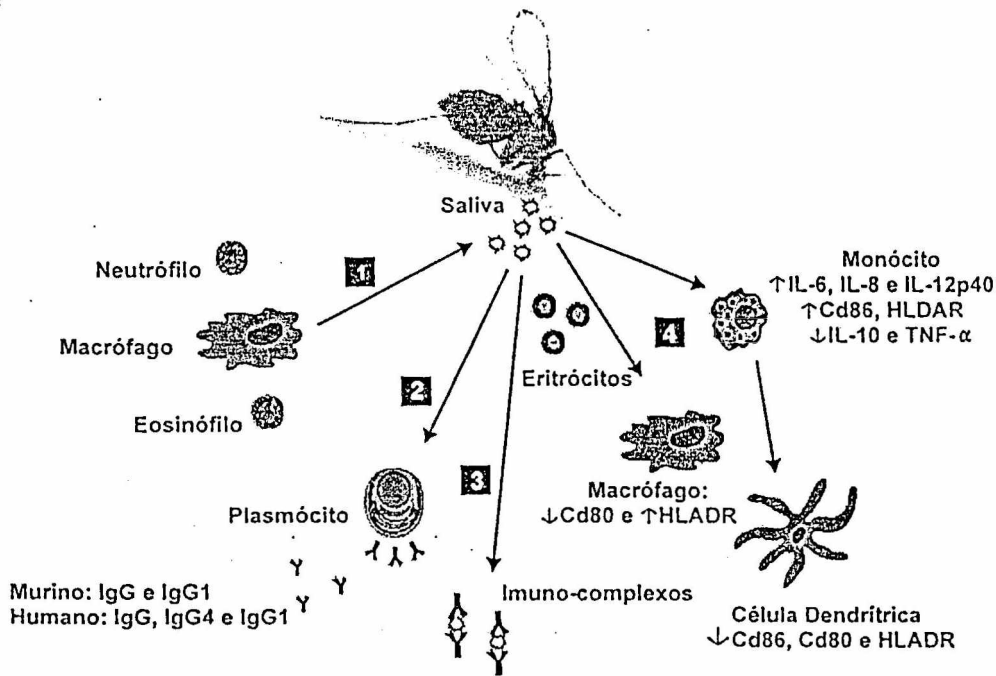
Exposições repetidas à saliva do flebótomo também levam ao desenvolvimento de imunidade celular no hospedeiro contra os produtos salivares, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tardia (RHT) com a presença de células inflamatórias recrutadas para o local da picada. Este recrutamento é um fator importante no estabelecimento da infecção por leishmania, já que este evento facilitaria a penetração e crescimento do parasita no interior destas células. O desenvolvimento de RHT facilitaria também a alimentação do flebótomo. Observou-se que fêmeas

alimentam-se mais rapidamente em hospedeiros que desenvolvem reação de hipersensibilidade tardia; o que pode refletir uma adaptação do vetor à resposta imune do hospedeiro^(4,9).

A saliva também está envolvida no processo inflamatório inicial no hospedeiro. Utilizando o modelo do bolsão de ar inflamatório, temos observado que a saliva de *L. longipalpis* induz a um maior recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e, principalmente, macrófagos, quando comparados à salina ou LPS (dados não publicados). O aumento significativo no recrutamento de macrófagos na presença da saliva está relacionado à presença de CCL2/MCP-1, quimiocina recrutadora de macrófagos. Entretanto, este efeito é bloqueado pela pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH em animais previamente expostos a picadas de *L. longipalpis*. Utilizando este mesmo modelo, observamos um aumento no número de células recrutadas na presença de *L. chagasi*, ou *L. chagasi* mais saliva (dados não publicados). Estes resultados indicam que a saliva contribuiria para uma intensa reação inflamatória no local da picada, atraindo um maior número de possíveis células hospedeiras para a entrada do parasita. Esta atividade pró-inflamatória da saliva também já havia sido observada na saliva de *P. duboscqi* e *P. papatasi*^(1,25). O recrutamento de macrófagos resulta em benefício ao hospedeiro ou à leishmania que dependerá da predominância de macrófagos ativados ou moléculas que causem desativação.

Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento de uma RHT é a proteção contra a leishmania em animais que desenvolvem preferencialmente essa reação. Assim, a RHT tornaria o local um ambiente inóspito para o estabelecimento da infecção pela leishmania, ou modificaria o microambiente, contribuindo para o desenvolvimento dos eventos iniciais que iriam influenciar a resposta imune do hospedeiro contra a leishmania. Usando uma abordagem de alta performance, Valenzuela et al. (2001)⁽²¹⁾ isolaram um grande número de proteínas salivares e genes do vetor *Phlebotomus papatasi* e encontraram uma proteína de 15 KDa, denominada PsSP115, capaz de bloquear a transmissão da *L.*

Figura 1. Efeitos da saliva de *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado. (1) Infiltrado inflamatório, (2) resposta imune humoral, (3) formação de imuno-complexos e (4) regulação da expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas nas células apresentadoras de antígenos.



major. Assim, animais imunizados com a proteína ou o plasmídeo contendo a seqüência SP15, tornaram-se resistentes a um desafio posterior constituído de parasita mais saliva. Os animais imunizados apresentaram uma intensa resposta celular RHT e alta produção de anticorpos. Os autores verificaram ainda que camundongos, mesmo deficientes de células B, quando imunizados com o plasmídeo, mostraram proteção contra um desafio posterior, sugerindo que a resposta imune celular, caracterizada por RHT, recruta células inflamatórias para o sítio da infecção, como, por exemplo, macrófagos ativados, produzindo NO, radicais livres de oxigênio e IL-12, criando um ambiente inóspito para a leishmania.

A caracterização de um grande número de proteínas salivares e seus respectivos cDNAs permitem-nos testar grande quantidade de candidatos em um sistema determinado. Outra vantagem refere-se à utilização da vacinação de DNA para a busca de candidatos à

vacina, através da produção de proteínas nativas no animal injetado versus o uso de proteínas recombinantes. A quantidade de DNA requerida para vacinação é muito menor do que aquela capaz de induzir a uma resposta imune quando da utilização de proteínas recombinantes. Assim, esse tipo de abordagem está acelerando o estudo de proteínas salivares dos vetores transmissores de patógenos. Genes funcionais, previamente não relatados na saliva dos artrópodes, estão agora sendo descritos. Esse tipo de modelo experimental deve contribuir no desenvolvimento de vacinas para doenças transmitidas por vetores.

Dados preliminares do nosso laboratório mostraram que, construções de cDNAs provenientes da glândula salivar de *L. longipalpis*, foram capazes de induzir a uma resposta imune celular e/ou humoral contra antígenos da glândula de *Lu. longipalpis* em hamsters e BALB/c. Além disso, algumas construções de cDNA

foram capazes de proteger animais desafiados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Essas construções de cDNA, que resultaram em proteção, também foram capazes de induzir à reação de RTH nos animais imunizados (dados não publicados).

O Papel dos Componentes Salivares no Homem

Estudos em nosso laboratório sugerem que, em áreas endêmicas para leishmaniose, a exposição a picadas de flebótomos não infectados pode influenciar na epidemiologia da doença. Indivíduos provenientes de áreas não endêmicas correriam um maior risco de desenvolver formas mais graves de leishmaniose, uma vez que seriam imunologicamente "naives", não somente à leishmania, mas também à saliva do flebótomo. Recentemente, Barral et al. (2000)⁽²⁾ e Gomes et al. (2002)⁽⁸⁾, desenvolvendo estudos em uma área endêmica para leishmaniose visceral (LV), demonstraram a presença de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* em soros de crianças que residem no mesmo local (Figura 1). Uma forte correlação foi encontrada entre altos níveis de anticorpos IgG anti-saliva e uma resposta de hipersensibilidade tardia (RHT) anti-leishmania⁽²⁾, sugerindo que anticorpos anti-saliva de flebótomos no homem podem servir como marcadores importantes na exposição a vetores das leishmanioses nessas áreas. Estas informações podem ser utilizadas de diversas formas, uma delas seria na identificação da distribuição espacial dos flebótomos em uma determinada área, auxiliando no direcionamento do controle do vetor e da doença. Outra forma seria como marcador de proteção. Indivíduos residentes em uma área para LV que são RTH positivos para antígenos de leishmania e, portanto, estariam protegidos contra a infecção, desenvolvem uma resposta de anticorpos IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*. Por outro lado, indivíduos da mesma área que possuem somente resposta sorológica positiva para antígenos de leishmania, RHT anti-leishmania negativo (não protegidos), apresentam baixos níveis de anticorpos anti-saliva. No soro das crianças que convertem o RHT para leishmania, foram detectadas,

principalmente, as subclasses IgG1 e IgE⁽⁸⁾. A IgG1 tem sido relacionada a uma resposta Th1 no homem, enquanto que o aumento de IgE sugere o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade imediata, já que é considerada como marcador de resposta do tipo Th2. Esse tipo de resposta mista (Th1/Th2) tem sido relatado em indivíduos expostos a picadas de outros vetores. A reação se inicia com RHT, seguida de uma reação de hipersensibilidade imediata, sendo finalizada com dessensibilização⁽¹²⁾. Os antígenos salivares reconhecidos pelos anticorpos anti-saliva presentes nos soros dos indivíduos da área endêmica estão dispostos respectivamente em um grupo de proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 45, 44, 43, 35, 27 e 16 kDa⁽⁸⁾.

A saliva também exerce um efeito direto sobre células apresentadoras de antígenos. O SGS de *Lu. longipalpis* foi capaz de inibir a produção de IL-10 e TNF- α e elevar a produção de IL-6, IL-8 e IL-12p40 por monócitos e células dendríticas humanas estimuladas com LPS (Figura 1). A expressão de moléculas co-estimulatórias, importantes na ativação e manutenção da resposta de linfócitos T, também foi alterada em monócitos (elevação de CD86 e HLA-DR) e macrófagos (redução de CD80 e elevação de HLA-DR). A redução na expressão dessas moléculas foi observada na diferenciação de células dendríticas e na maturação induzida por CD40L. A pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH bloqueou os efeitos da saliva anteriormente descritos, evidenciando a importância dos anticorpos na neutralização dos possíveis efeitos deletérios da saliva ao sistema imune do hospedeiro⁽⁵⁾.

Em conclusão, o estudo da saliva em modelos experimentais ou *in vitro* tem trazido novos esclarecimentos com relação ao estabelecimento da infecção. Estes novos aspectos também abrem novas perspectivas quanto a possíveis novos candidatos para a construção de uma vacina eficaz. A utilização de vacinas de DNA poderá ser uma excelente alternativa na indução de uma resposta imune eficaz contra produtos da saliva destes vetores, bloqueando conseqüentemente a transmissão da leishmania veiculadas por estes insetos.

Referências Bibliográficas

1. Anjili C, Mbatia P, Mwangi R, Githure J, Olobo J, Robert L, Koech D. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60: 10097-10100, 1995.
2. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton E, Valenzuela J, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro J. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745, 2000.
3. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks D. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine* 16: 1941-1953, 1998.
4. Belkaid Y, Valenzuela J, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 97: 6704-6709, 2000.
5. Costa D, Favali C, Clarêncio J, Afonso L, Conceição V, Miranda J, Titus R, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72: 1298-1305, 2004.
6. Donnelly K, Lima H, Titus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *Journal of Parasitology* 84: 97-103, 1998.
7. Ghosh K, Mukhopadhyay J. The effect of anti-sand fly antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 28: 275-281, 1998.
8. Gomes R, Brodskyn C, Oliveira C, Costa J, Miranda J, Caldas A, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1530-1532, 2002.
9. Kamhawi S, Yasmine B, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354, 2000.
10. Lerner E, Ribeiro J, Nelson R, Lerner M. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234-11236, 1991.
11. Lima H, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64: 5442-5445, 1996.
12. Mellanby K. Natural history of vertebrate host response to insect bites. *Nature* 158: 554-555, 1946.
13. Ribeiro J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143-152, 1995.
14. Ribeiro J. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Annu Rev Entomol* 32: 463-478, 1987.
15. Sacks D, Perkins P. Identification of an infective stage of leishmania promastigotes. *Science*: 1417-1419, 1984.
16. Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173: 49-54, 1991.
17. Silva F, Gomes R, Prates D, Miranda J, Andrade B, Barral-Netto M, Barral A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72: 94-98, 2005.
18. Stark K, James A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 273: 20802-20809, 1998.
19. Titus R, Ribeiro J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. *Science* 239: 1306-1308, 1988.
20. Valenzuela J. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1199-1209, 2002.
21. Valenzuela J, Belkaid Y, Garfield M, Mendez S, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342, 2001.
22. Valenzuela J, Garfield M, Rowton E, Pham V. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3717-3729, 2004.
23. Volf P, Rohousova I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37-41, 2001.
24. Vries J, Carballido J, Sornasse T, Yssel H. Antagonizing the differentiation and functions of human T helper type 2 cells. *Curr Opin Immunol* 7: 771-778, 1995.
25. Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 31: 810-814, 2001.

10.3 ANEXO 3

BRUNO B. ANDRADE; CLARISSA R. TEIXEIRA; ALDINA BARRAL; MANOEL BARRAL-NETTO. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 77: 665, 2005



Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood

BRUNO B. ANDRADE^{1,2}, CLARISSA R. TEIXEIRA^{1,2}, ALDINA BARRAL^{1,2,3}
* and MANOEL BARRAL-NETTO^{1,2,3}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA)

Rua Waldemar Falcão, 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil

²Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia/UFBA

Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 40110-100 Salvador, BA, Brasil

³Instituto de Investigação em Imunologia (iii) – Instituto do Milênio

Manuscript received on June 20, 2005; accepted for publication on June 23, 2005;
contributed by ALDINA BARRAL AND MANOEL BARRAL-NETTO**

ABSTRACT

The saliva from blood-feeding arthropod vectors is enriched with molecules that display diverse functions that mediate a successful blood meal. They function not only as weapons against host's haemostatic, inflammatory and immune responses but also as important tools to pathogen establishment. Parasites, virus and bacteria taking advantage of vectors' armament have adapted to facilitate their entry in the host. Today, many salivary molecules have been identified and characterized as new targets to the development of future vaccines. Here we focus on current information on vector's saliva and the molecules responsible to modify host's hemostasis and immune response, also regarding their role in disease transmission.

Key words: saliva, bites, hemostasis, host, vector, infection.

INTRODUCTION

Blood-feeding arthropods can require vertebrate host blood for nutrition, egg development, and survival. The medical and public health importance of these ectoparasites is evident because of the alarming emergence of new vector-borne infectious agents and the resurgence of previously known ones. The morbidity and mortality of infectious diseases transmitted by blood-feeding arthropods were more expressive than all other causes in the last centuries (Gubler 1998).

Haematophagous vectors of disease are not regarded simply as tools for the delivery of their pathogens. Advances in biomedical research focused on the role of blood-feeding arthropods saliva in the transmission of some infectious diseases have shown the presence of a co-evolutionary relationship between these vectors and the pathogen they transmit. Rather, vector's saliva seems to be a potent pharmacologically active fluid that directly affects the haemostatic, inflammatory and immune responses of vertebrate host (Ribeiro 1995a).

Before blood meal, haematophagous arthropods must locate blood by introducing their mouthparts into the vertebrate host skin tearing tissues and lacerating capillaries, which creates hem-

*Member, Academia Brasileira de Ciências

Correspondence to: Manoel Barral-Netto, MD

E-mail: mbarral@cpqgm.fiocruz.br

orrhagic pools upon which it feeds. Such insects as triatomine bugs feed directly from inside venules and arterioles, after been guided by an initial hemorrhagic pool (Lavoipierre 1965, Ribeiro 1987b). During this process insect's saliva is injected into the host's skin at the site of the bite. This saliva contains a great variety of haemostatic, inflammatory and immunomodulatory molecules such as proteins, prostaglandins, nucleotides, and nucleosides that locally modify the physiology of the host, making an adequate microenvironment for parasitism. Pathogens transmitted by these vectors interact with both saliva components and host mediators taking advantage of the altered host physiology to become established (Belkaid et al. 2000, Jones et al. 1992, Titus and Ribeiro 1988).

Understanding mammalian response to insect's saliva is of utmost importance in several ways. Besides being related to allergy (Reunala et al. 1994, Shan et al. 1995) insect's saliva is known to facilitate parasite survival (Belkaid et al. 1998, Kamhawi 2000, Samuelson et al. 1991). Arthropod saliva is also related with specific antibody production by humans and other vertebrates against its components (Brummer-Korvenkontio et al. 1994, Feingold and Benjamini 1961, Wikel 1996). Conversely, host immunity to vector saliva may decrease infectivity of the transmitted pathogens (Belkaid et al. 1998, Bell et al. 1979). These responses can be used as epidemiological markers of vectors exposure (Baral et al. 2000, Schwartz et al. 1990, 1991) and also support the possibility to prevent and treat allergic responses and to develop anti-arthropod vaccines.

Accordingly, the purpose of this review is to expose the salivary molecules that have been identified and characterized in various blood-feeding arthropods and its activities related to host's defense, including hemostasis and immune response. Indeed, we also focus on the role of saliva in parasite transmission and recent data suggesting that salivary peptides are an alternative target for the control of pathogen transmission through the development of effective vaccines.

ARTHROPOD SALIVA AND HOST HEMOSTASIS: THE BLOOD QUEST

Attempting to probe and feed, blood-sucking arthropods must circumvent the host haemostatic system. Host hemostasis is highly sophisticated and efficient process that includes several redundant pathways geared towards overcoming blood loss; among which are blood-coagulation cascade, vasoconstriction, and platelet aggregation (Ribeiro 1987b, 1995a). These components act together leading to the arrest of blood flow at the site of vessel lesion. To overcome these obstacles, blood-feeding arthropods have evolved within its salivary secretions an array of potent pharmacological components, such as anticoagulants, anti-platelet and vasodilators (Champagne 1994, Ribeiro 1995a, Stark and James 1996b). As a rule, blood-suckers' saliva contains at least one anticlotting, one antiplatelet, and one vasodilatory substance (Ribeiro and Franciscetti 2003). In many cases, more than one molecule exists in each category and in some, a molecule alone is responsible for more than one anti-haemostatic effect. For example, compounds such as adenosine and nitric oxide that are once antiplatelet and vasodilatory are found in saliva. Salivary molecules responsible for these effects on host hemostasis have been characterized and some proteins were isolated, indicating the possibility to neutralize these mechanisms.

PLATELET AGGREGATION

The first host's mechanism to avoid blood loss during tissue injury seems to be platelet aggregation. Platelets can be activated by diverse stimulus including collagen exposure, thrombin interaction, thromboxane A₂ and ADP. After activated, platelets aggregate, promote clotting, and release vasoconstrictor mediators to form the platelet plug. Blood feeders can inhibit this aggregation through different ways. Anophelin, a peptide from *Anopheles albimanus* saliva (Fig. 1f) that behaves as an alpha-thrombin inhibitor, also contributes for the anti-clotting phenomena observed in experimental es-

says (Valenzuela et al. 1999). The salivary gland homogenate of the tick *Rhodnius prolixus* (Fig. 1d) presents a 19kDa protein named *Rhodnius prolixus* aggregation inhibitor 1 (RPAI-1) that inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to ADP (Francischetti et al. 2000), the same effect observed by a molecule with similar sequence and structure (pallidipin) isolated from saliva of *Triatoma pallidipennis* (Fig. 1d) (Noeske-Jungblut et al. 1994). The deerfly *Chrysops* spp. saliva (Fig. 1a, b and d) can prevent platelet aggregation induced by ADP, thrombin and collagen, and also inhibits fibrinogen, binding to the glycoprotein IIb/IIIa receptor on platelets (Grevelink et al. 1993). ADP has a key function in hemostasis through induction of platelet aggregation and derives from activated platelets and injured cells (Vargaftig et al. 1981). Thus, it is not surprisingly that the most common molecule involved in inhibition of platelet aggregation encountered on the majority of blood feeding arthropods seems to be the salivary apyrase enzyme, that hydrolyses ATP and ADP to AMP and orthophosphate, preventing the effect of ADP on hemostasis. However, at least two different families of this enzyme exist and both known families require Ca^{2+} and/or Mg^{2+} for their action. *Aedes aegypti* (Champagne et al. 1995b), *Anopheles* (Arca et al. 1999) and *Culex* mosquitoes (Fig. 1e) (Nascimento et al. 2000) present in their saliva apyrases from the same family of 5'-nucleotidases. A novel apyrase enzyme sequence was found recently in the salivary glands of the haematophagous bed bug *Cimex lectularius* (Valenzuela et al. 1998) and homologous sequences were found in the sand flies *Lutzomia longipalpis* (Charlab et al. 1999) and *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela et al. 2001), indicating that this family of enzymes is widespread among arthropod species (Fig. 1e). This novel apyrase functions exclusively with Ca^{2+} . It is important to show that, in the sand flies salivary components analyzed, a salivary 5'- nucleotidase was also found in *L. longipalpis* but not in *P. papatasi* (Fig. 1e) (Charlab et al. 1999). Finally, the salivary

apyrase from *Triatoma infestans* (Fig. 1e) also belongs to the 5'-nucleotidase family (Faudry et al. 2004) and are peculiarly dependent of Mn^{2+} and Co^{2+} (Ribeiro et al. 1998).

Platelet function can also be antagonized by substances that increase platelet cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Previous work had demonstrated that prostaglandin E_2 (PGE_2) and prostacyclin obtained from tick's saliva can increase platelet cyclic nucleotides (Higgs et al. 1976). Nitric Oxide (NO) released within saliva of the bugs *Rhodnius prolixus* and *Cimex lectularius* (Fig. 1g) activates the cytosolic guanylate cyclase enzyme, causing an anti-clotting effect (Ribeiro et al. 1993, Vogt 1974).

BLOOD-COAGULATION CASCADE

The blood-coagulation cascade is launched by various mechanisms set by injury to blood vessels. It ends in the production of active thrombin, which cleaves fibrinogen to fibrin, the clot protein. The fibrin polymerizes and forms the blood clot, providing rigidity to the platelet plug. Salivary anticoagulants from blood-feeding arthropods seems to target specific proteases or complexes of the blood-coagulation cascade, blocking or delaying the clot formation process until the blood feeder finishes the meal (Ribeiro 1987b). Different insects have evolved diverse molecules responsible for these actions, which effectiveness also varies by species. Many of these salivary molecules are in different stages of molecular characterization. Most salivary anticoagulants target components in the final common pathway of the coagulation cascade, including factors V, Xa and II (thrombin). For example, anophelin is a unique peptide isolated from the saliva of *Anopheles albimanus* (Fig. 2f) that functions as a specific and tight-binding thrombin inhibitor (Noeske-Jungblut et al. 1995, Valenzuela et al. 1999). Another mosquito, *Aedes aegypti*, (Fig. 2d) present within its saliva a 48kDa peptide factor Xa inhibitor that was purified, cloned, expressed and shown to be a member of the serpin

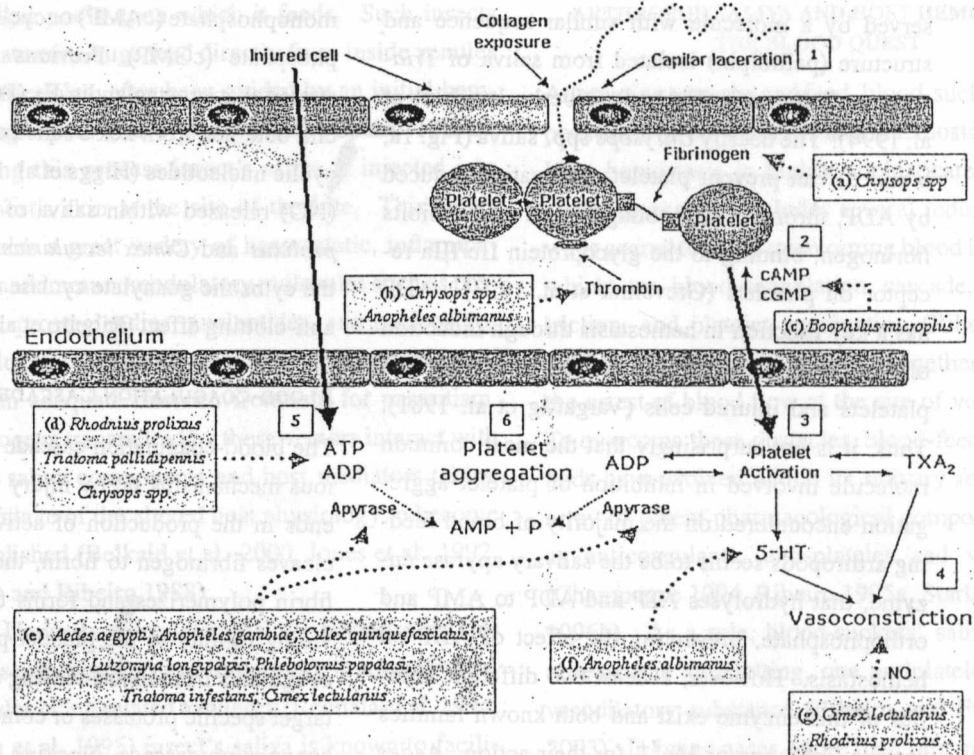


Fig. 1 – Vector's saliva acting on platelet activation and aggregation: (1) Blood feeding vectors induce vessel laceration and tissue injury resulting in collagen exposure when probing for a blood meal. (2) Thus, platelets aggregate, promoting clotting, and release of vasoconstrictor mediators promoting hemostasis. Blood feeders can inhibit platelet aggregation by preventing fibrinogen, thrombin (*Anopheles albimanus* and *Chrysops spp.*) or cAMP/cGMP stimulation (*Boophilus microplus*). (3) Platelet activation and degranulation also occur after thromboxane A₂ that results in vasoconstrictor response and (4) the NO present within bug's saliva can prevent haemostatic effect (*Cimex lectularius* and *Rhodnius prolixus*). (5) They can also bind to ADP (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis* and *Chrysops spp.*) or (6) Prevent the action of ADP through salivary apyrase to prevent platelet aggregation (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*, *Triatoma infestans* and *Cimex lectularius*).

family of serine protease inhibitors (Stark and James 1998). Salivary gland extract of *Culicoides variipennis* (the primary North America vector of bluetongue viruses) (Fig. 2d) contains a factor Xa inhibitor similarly to all the subfamily of culicine mosquitoes (Perez de Leon et al. 1997). It has been proposed that despite variation in the degree of inhibition, all anophelines have thrombin directed anticoagulants and culicine mosquitoes have factor Xa directed anticoagulants. Differences in the site of action of the anticoagulants must likely reflect the

long period of independent adaptation of the two subfamilies to the challenges presented by vertebrate hemostasis (Stark and James 1996a).

A potent and specific low molecular mass (3,530 Da) anticoagulant peptide purified from salivary gland of *Glossina morsitans morsitans* (Fig. 2f) is a thrombin inhibitor (Cappello et al. 1996, 1998). This peptide is a stoichiometric inhibitor of thrombin and also a potent inhibitor of thrombin-induced platelet aggregation.

Subtractive cloning combined with biochem-

ical approaches was used to discover activities in the salivary glands of the haematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Charlab et al. 1999). Sequences of nine full-length complementary DNA (cDNA) clones were obtained and five were possibly associated with blood meal acquisition, each having cDNA similarity to: (a) the bed bug *Cimex lectularius* apyrase, (b) a 5'-nucleotidase/phosphodiesterase, (c) a hyaluronidase, (d) a protein containing a carbohydrate-recognition domain (CRD), and (e) a unique RGD-containing peptide. This work was the first to identify a hyaluronidase activity in a haematophagous insect salivary gland. The CRD-protein and the RGD containing peptide seem to be involved in anticlotting activities.

Triatomine bugs also evolved potent anticoagulants, as factors V and VIII inhibitors from *Triatoma infestans* (Fig. 2c and e) (Pereira et al. 1996) and triabin, a salivary 142-residue protein of *Triatoma pallidipennis* (Fig. 2f) that selectively interacts with thrombin, exclusively via its fibrinogen recognition exosite (Fuentes-Prior et al. 1997). Prolixin S (nitrophorin 2), from salivary gland extracts of *Rhodnius prolixus* (Fig. 2c) inhibits coagulation factor VIII-mediator activation of factor X and accounts for all the anti-clotting activity observed in its saliva (Ribeiro et al. 1995). Saliva of the hard tick and Lyme disease vector, *Ixodes scapularis* (Fig. 2d), was genetically sequenced in a cDNA library. In this process, a clone with sequence homology to tissue factor pathway inhibitor was identified and this cDNA codes for a mature protein, herein called ixolaris, with 140 amino acids. Observations of ixolaris function evidenced the blockage of factor Xa generation by endothelial cells expressing tissue factor. This work also demonstrated that ixolaris uses factor X and Factor VIIa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/Tissue factor complex (Fig. 2a) (Francischetti et al. 2002).

VASOCONSTRICTION

Arachdonic acid is released by activated platelets when blood vessels are lacerated by arthropods'

mouthparts and is converted by other platelet enzymes into thromboxane A₂, a powerful platelet-aggregating, platelet-dagranulating, and vasoconstricting substance (Ribeiro 1987b). Activated platelets also release serotonin, which together with thromboxane A₂ is responsible for the early vasoconstrictor response in local inflammation caused by tissue injury (Weigelt et al. 1979). Saliva from blood feeder insects presents vasodilatory substances or molecules that antagonize vasoconstrictors produced on the site of tissue injury caused by inoculation of mouthparts during probing. These molecules act directly or indirectly on smooth-muscle cells activating intracellular enzymatic pathways that lead to cAMP or cGMP formation. Sialokinin, a tachykinin decapeptide from *Aedes aegypti*, is a vasodilator through activating nitric oxide production by endothelial cells via cGMP induction (Champagne and Ribeiro 1994).

Maxadilan, a 6.5 kDa peptide encoded by a gene cloned from *Lutzomyia longipalpis* salivary glands, is the most potent salivary vasodilator known until now and also has immunomodulatory properties (Lerner et al. 1991, Lerner and Shoemaker 1992). The vasodilatory effect of maxadilan is endothelium independent and correlates with an increase of cAMP in smooth muscle cells (Grevelink et al. 1995), acting as a specific agonist of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptor on vascular and neural tissues and also on macrophage surface (Moro and Lerner 1997, Moro et al. 1996). The presence of adenosine and its precursor 5'-AMP has been demonstrated in salivary glands of *Phlebotomus papatasi* (Ribeiro et al. 1999) and *Phlebotomus argentipes* (Ribeiro and Modi 2001), with vasodilatory, antiplatelet-aggregation and immunomodulatory properties (Collis 1989, Dionisotti et al. 1992, Lewis et al. 1994). Note that *Phlebotomus* insects do not have maxadilan and *Lutzomyia* do not have adenosine in their saliva. These differences in pharmacological strategies among sand flies from the same family, but from genera that diverged not early

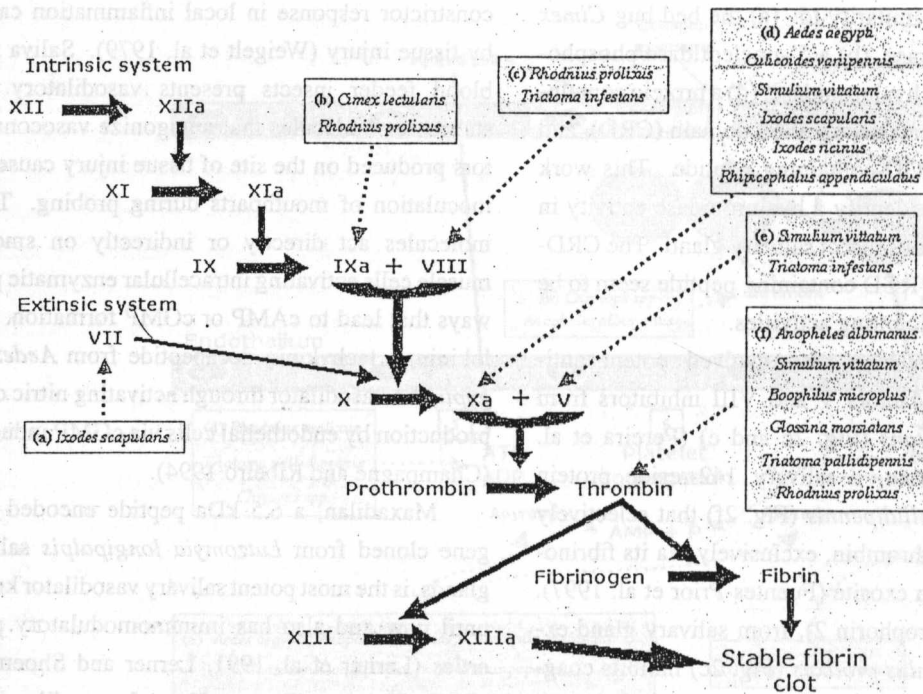


Fig. 2 – Blood-coagulation cascade (intrinsic and extrinsic system) activated in response to tissue injury is also blocked by salivary molecules. The blood-coagulation cascade is activated after blood vessels injury resulting in the production of active thrombin, which cleaves fibrinogen to fibrin that polymerizes forming a stable clot blocking blood loss. Salivary anticoagulants from blood feeding arthropods inhibit specific targets of the coagulation cascade. They target components such as factor IXa (*Cimex lectularius* and *Rhodnius prolixus*); VIII (*Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*); Xa (*Aedes aegypti*, *Culicoides variipennis*, *Simulium vittatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus appendiculatus*); V (*Simulium vittatum* and *Triatoma infestans*), VII (*Ixodes scapularis*) and thrombin (*Anopheles albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsiatans*, *Triatoma pallidipennis* and *Rhodnius prolixus*) resulting in inhibition or delayed blood-thrombin (*Anopheles albimanus*, *Simulium vittatum*, *Boophilus microplus*, *Glossina morsiatans*, *Triatoma pallidipennis* and *Rhodnius prolixus*) and coagulation response.

than the last separation of the continental plates, stresses the diversity of compounds found in the salivary glands of blood-feeder arthropods (Ribeiro et al. 1999). Finally, the black fly *Simulium vittatum* salivary gland has a 15 kDa vasodilator that acts on ATP-dependent K-channels and has no structural similarity to other known proteins (Cupp et al. 1994, 1998).

Another example of salivary vasodilator is prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F₂ (PGF₂) demonstrated from salivary gland homogenate of different tick species (Dickinson et al.

1976, Ribeiro et al. 1985). PGE₂ and prostacyclin dilate host's blood vessels, thus antagonizing the vasoconstrictor component of hemostasis thromboxane A₂. The triatomine bug *Rhodnius prolixus* releases NO within its saliva, as does the cimicid bug *Cimex lectularius* (Ribeiro et al. 1993, Vogt 1974). To carry this volatile substance to the host tissue, these bugs developed a different heme protein (nitrophorins) that reversibly binds and stabilizes NO making viable to release this gas in the host skin. *Rhodnius* nitrophorin is a member of the lipocalin family (Champagne et al. 1995a) and

Cimex nitrophorin is a member of the inositol phosphatase family (Valenzuela et al. 1995). Because *Cimex lectularius* and *Rhodnius prolixus* belong to different hemipteran families (Cimucidae and Reduviidae, respectively) and evolved independently to blood-feeding, *Cimex lectularius* and *Rhodnius prolixus* nitrophorins may represent a case of convergent evolution (Valenzuela et al. 1995). In the case of *Rhodnius prolixus*, four NO-carrying proteins were isolated and named N1-N4 nitrophorins (Champagne et al. 1995a). Interestingly, the main nitrophorin from this triatomine has a very high affinity to histamine, a common autacoid found by blood-feeding insects on the skin of allergic hosts. Histamine binds to nitrophorin and further displaces NO at the site of injury. Thus, this nitrophorin also works as an anti-histaminic substance (Ribeiro 1995a).

Anopheline mosquitoes do not produce vasodilatory substances, but rather secrete a peroxidase enzyme that has significant NADPH oxidase activity. The NADPH oxidation produces H_2O_2 , which is used by the enzyme to destroy serotonin and catecholamines, thus inactivating host's physiologic vasoconstrictor substances that may interfere with insect feeding (Ribeiro 1995a, Ribeiro and Valenzuela 1999).

Indeed, haematophagy evolved independently in several orders of insects and ticks. For this reason, a variety of salivary anti-haemostatic compounds are found in these diverse groups of arthropods. The combined effects of apyrases, prostaglandins, antithrombotics, anti-clotting and many classes of vasodilators effectively counteract host hemostasis and increase the chance of blood-suckers survivor.

SALIVA AND HOST IMMUNE SYSTEM: BREAKING DOWN THE ENEMY

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF BLOOD-FEEDER ARTHROPODS SALIVA COMPONENTS

After repeated exposure to salivary antigens, host immune system may elaborate cellular (delayed-

type hypersensitivity, DTH) and/or humoral reactions that will alter the local site of probing that may result on rejection of the ectoparasite (Wikel 1982). This host's resistance is related to a Th1 immune response, with significant production of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2 and IL-12. To face this problem, blood-feeding arthropods have evolved salivary immunomodulatory factors which prevent host from becoming sensitized to the vasomodulatory substances of saliva that facilitate blood meal (Gillespie et al. 2000) or even retard deleterious host responses. Such factors induce a Th2 deviation of host's immune response, which favors insect survivor. Many types of immunomodulatory molecules have been isolated from different blood-feeding arthropod species. Most of these mediators act directly or indirectly on immune effectors cells, like macrophages, T cells, B cells, Natural Killer (NK) cells and granulocytes.

Certain activities observed are common to all vectors, for example the inflammation inhibitors (anti-complement properties), the cytokines/chemokines modulators and anti-coagulants (Sandemam 1996, Wikel 1996). For both rapidly feeding insects and slowly feeding ticks, the reduction of host immunity to their salivary components enhances the likelihood that a host will be a suitable source of future blood meals (Schoeler and Wikel 2001). Hard ticks remain attached to the host for days and this long interaction generates a vigorous host's response to tick bite and its salivary components, resulting in rejection of these parasites (Ribeiro 1995a). Rapidly feeding insects, such as sand flies, also induce an intense DTH response at the site of the bite. Interestingly, the larger blood flow encountered at the DTH site favors the sand flies to probe and feed faster (Belkaid et al. 2000). Arthropod modulation of host immunity could provide the appropriate environment for pathogen transmission and establishment, which could be combined with, or followed by, immune evasion mediated by the infectious agent (Ribeiro 1987c). Increasing body of evidence is supporting this view.

INNATE IMMUNE RESPONSE

Innate immune system consists of all the immune defenses that lack immunologic memory. Innate responses frequently involve complement, acute-phase proteins besides granulocytes, mast cells, dendritic cells, macrophages, and NK cells. Complement components, prostaglandins, leukotrienes and other inflammatory inductors all contribute to the recruitment of inflammatory cells to the site of ectoparasite exposure. Thus, these cells and inflammatory mediators represent the first line of immune defense against blood-feeding arthropods likely affecting its feeding process.

The early events of complement activation are based on an enzymatic amplifying cascade comparable to that seen in blood clotting. The complement fragments C3a, C4a and C5a activate mast cells, which release histamine, cytokines and other pro-inflammatory substances (Delves and Roitt 2000). C5a also acts as a powerful neutrophil chemoattractant. The complement components C5b, C6, C7, C8, and C9 form the membrane-attack complex (Delves and Roitt 2000), which perforates cell membranes and may lead to the death of the lining cells of insect's mouthparts. The alternative pathway of complement seems to be involved in expression of blood-feeding arthropod resistance (Wikel 1979). Thus, the anaphylatoxins C3a and C5a cause further release of vasoactive mediators, which increase vascular permeability and potentiate the accumulation of antibodies and immune cells at the site of the bite. Despite these obstacles, blood-suckers are capable of having a successful blood meal likely through host immunomodulation by salivary components. Saliva of the tick *Ixodes dammini* (Fig. 3a) antagonizes anaphylatoxin and bradykinin likely by the presence of a carboxypeptidase (Ribeiro and Spielman 1986) and can also inhibit C3a release and C3b deposition (Ribeiro 1987a). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* is capable of inhibiting both the classical and alternative Complement pathways (Fig. 3a), whereas that of *Lutzomyia migonei* acted

only on the former (Cavalcante et al. 2003). The triatomine bugs *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus* (Fig. 3a) were also able to inhibit the classical pathway whereas the mosquito *Aedes aegypti* and flea *Ctenocephalides felis* were not (Cavalcante et al. 2003).

The molecules collectively referred to as acute-phase proteins enhance host resistance to infection and promote the repair of damaged tissue (Delves and Roitt 2000). Plasma levels of these proteins change rapidly in response to infection, inflammation and tissue injury. In addition to some complement components, the acute-phase proteins include C- and S- reactive proteins, serum amyloid A protein, proteinase inhibitors and anticoagulant peptides. These substances or their function may be altered by arthropod salivary components for the success of blood meal (Cappello et al. 1996, Horn et al. 2000, Noeske-Jungblut et al. 1995, Paesen et al. 1999).

Host's mast cells, loaded with histamine and serotonin have high-affinity receptors to IgE. These cells are activated and degranulate in the presence of divalent ectoparasite antigens cross linked with two IgE, releasing their vasoactive amines that leads to local edema and erythema. After activation, mast cells produce and release several arachidonic acid metabolites and a diversity of cytokines, including IL-4 and tumor necrosis factor (TNF)- α , which stimulate the immune response to progress toward a Th2 or antibody mediated response. Mast cells are also responsible for the production of nerve-growing molecules, such as bradykinin, serotonin and histamine (Boyce 2004). Some blood-suckers salivary components can interfere in these processes. For example, extracts of *Aedes aegypti*'s salivary glands (Fig. 3c) inhibit the release of TNF- α from rat mast cells, but do not inhibit antigen-induced histamine secretion (Bissonnette et al. 1993). Salivary adenosine deaminase activity has been demonstrated in two culicine mosquitoes (Ribeiro et al. 2001) *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 3c) (Char-

lab et al. 2000), but not in the anopheline *Anopheles gambiae* (Ribeiro et al. 2001). The adenosine deaminase activity in *Aedes aegypti* may help blood feeding by removing adenosine, a molecule associated with both pain perception inhibition and induction of mast cell degranulation in vertebrates, and by producing inosine, a molecule that potently inhibits the production of inflammatory cytokines (Ribeiro et al. 2001). Bradykinin and histamine are important mediators of itch (Alexander 1986) and pain (Clark 1979) which could stimulate host grooming and removal of the blood feeding arthropod. It is perhaps not surprising that the some insects' salivary glands, like *Ixodes scapularis* (Ribeiro and Mather 1998) and *Rhodnius prolixus* (Ribeiro and Walker 1994) contain kininases that inhibit bradykinin. Indeed, hard ticks also produce histamine-binding proteins that minimize local inflammation host's response (Chinery and Ayitey-Smith 1977, Paesen et al. 1999). Finally, data suggest that saliva of *Triatoma infestans* can inhibit sodium channels activity in nerves by an unspecified molecule, with potential antinociceptive effects (Dan et al. 1999).

Arthropods' saliva can induce immune suppression of innate immune cells. *Ixodes dammini* (Fig. 3b) salivary gland homogenate inhibits rat neutrophils function (Ribeiro et al. 1990). Salivary gland extracts (SGE) from *Dermacentor reticulatus* (Fig. 3f) adult ticks induce a decrease in human natural killer (NK) activity acting on the first step of NK cell activity, namely effector/target cell conjugate formation (Kubeş et al. 2002). NK cell cytotoxicity as well as NO production by macrophages are inhibited by *Ixodes ricinus* SGE (Kopecky and Kuthejlova 1998) and by *Phlebotomus papatasi* (Fig. 3f) saliva (Ribeiro et al. 1999, Waitumbi and Warburg 1998). The saliva of this phlebotomine also contains a potent inhibitor of protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A of murine macrophages, suggesting that the *Phlebotomus papatasi* salivary phosphatase inhibitor may interfere with the ability of activated macrophages to transmit signals to the nucleus, thereby preventing up regulation of the

induced nitric oxide synthase gene inhibiting the production of NO (Katz et al. 2000, Waitumbi and Warburg 1998). Adenosine and its precursor 5'-AMP, also isolated from *Phlebotomus papatasi* (Fig. 3d) salivary glands (Katz et al. 2000, Ribeiro et al. 1999) have been reported to enhance IL-6, IL-10, IL-4 and PGE₂ production, and together with inosine (product of adenosine deaminase) were shown to decrease the production of IL-12, IFN- γ , TNF- α and NO (Hasko et al. 2000, Hasko et al. 1998, Hasko et al. 1996, Le Moine et al. 1996, Link et al. 2000). In the presence of salivary glands extracts of *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 3d), macrophages were unable to present antigen, were refractory to activation by IFN- γ and were unable to produce H₂O₂ or NO (Hall and Titus 1995, Theodos and Titus 1993, Titus and Ribeiro 1990). This inhibition seems to be selective, as it did not alter the ability of IFN- γ to up regulate MHC class II expression on their surfaces. On human monocytes, salivary gland homogenate (SGH) of *Lu. longipalpis* induces an increase in IL-6, IL-8, and IL-12p40 production, but a decrease in tumor necrosis factor and IL-10 production. SGH also affects the expression of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) on the surface of human monocytes and macrophages (Fig. 3d). A reduction in CD80, CD86, HLA-DR and CD1a molecules during Dendritic cell (DC) differentiation from human monocytes and maturation induced by CD40L after SGH stimulation is also observed (Fig. 3e) (Costa et al. 2004). DCs play a major role in host immune responses through processing and presenting arthropod salivary antigens to T-lymphocytes in draining lymph nodes. *Rhipicephalus sanguineus* (Fig. 3e) tick saliva inhibits the differentiation of DC and decreases the population of differentiated immature DC. Furthermore, maturation of DC stimulated by lipopolysaccharide (LPS) in the presence of saliva resulted in a lower expression of costimulatory (CD40, CD80 and CD86) molecules and also reduced production of interleukin-12 (Cavassani et al. 2005). Rather, DC cultured with tick saliva revealed them to be poor

stimulators of cytokine production by antigen-specific T cells.

Further studies showed that maxadilan, through activation of PACAP type 1 receptor, inhibited the expression of TNF- α by macrophages and increased levels of the cytokines IL-6 and IL-10 as well as prostaglandin E₂ (Bozza et al. 1998, Lanzaro et al. 1999, Soares et al. 1998). Maxadilan, as well as whole salivary gland lysate suppressed type 1 responses and enhanced type 2 responses by human PBMC and purified monocyte cultures *in vitro* (Rogers and Titus 2003). Maxadilan decreased IFN- γ , IL-12 and TNF- α production, while increasing IL-6 secretion by human PBMC few hours after stimulation with *Leishmania major* or LPS. Indeed, it was suggested that this *Lutzomyia longipalpis* vasodilator could interfere on the IFN- γ release through the suppression of IL-12 production by T-lymphocytes (Fig. 3g), possibly as a result of changes induced in macrophages and NK cells. Interestingly, it has been found that the primary amino acid sequence of maxadilan peptide is polymorphic (Lanzaro et al. 1999) and sibling species within the *Lutzomyia longipalpis* complex present significant differences in their amounts of maxadilan mRNA (Yin et al. 2000). Despite these differences, the vasodilatory activity appears not to be altered (Lanzaro et al. 1999). The maxadilan primary sequence polymorphism may represent an evolutionary vantage to the sand fly, preventing the host from becoming sensitized to this important peptide and, consequently, the loss of blood meal. It has also been proposed that differences in salivary components of different geographical populations of sand flies may be responsible for the differences observed in clinical manifestation of visceral leishmaniasis in America (Warburg et al. 1994). So, different strategies of host immunomodulatory appear to have evolved for Old-World and New-World sand flies.

The observations above show us that blood-feeding arthropods evolved strategic mechanisms to evade or suppress the innate immune response and that saliva of ectoparasites may have a key role in

this process.

ACQUIRED IMMUNE RESPONSE

Immunoglobulin and T cell mediated immune responses are induced during the first exposure to ectoparasites feeding. The ability of an animal to respond to a given molecule depends upon the genetically defined capacity to process and present them to immunocompetent T lymphocytes in context of major histocompatibility complex (MHC) antigens. Variations are expected in the abilities of randomly bred animals to develop and express resistance to arthropod feeding or any infectious agent. Blood-feeding arthropod salivary immunogens are largely processed for presentation to immunocompetent lymphocytes by Langerhans cells, which are located in a suprabasal position within the epidermis (Schoeler and Wikel 2001). Also, these antigen presenting cells (APC) can transport immunogens to the draining lymph node, promoting antibody and cell mediated responses, which eventually clear blood-sucker salivary antigens from the skin. Together with Langerhans cells and dendritic cells, macrophages and NK cells seems to link the two instances of immune responses, innate (unspecific) and acquired (highly specific). An influx of host lymphocytes and macrophages (generating the DTH response), basophils, and eosinophils is observed at the site of the bite and circulating and homocytotropic antibodies (primary IgM and IgE, switching at late-phase to IgG isotype) are produced (Belkaid et al. 2000, Ferreira et al. 2003, Schoeler and Wikel 2001). Indeed, memory B and T lymphocytes are generated as a result of this initial exposure to blood-feeder salivary immunogens. Haematofagous arthropod feeding upon a resistant host induces a very different pattern of responsiveness. The presence of reactive antibodies and effector T lymphocytes assures a rapid response to infestation. If memory B and T lymphocytes need to be stimulated, the response will become maximal within a few days of re-infestation and can impair the ability of the arthropod to obtain a blood meal. For

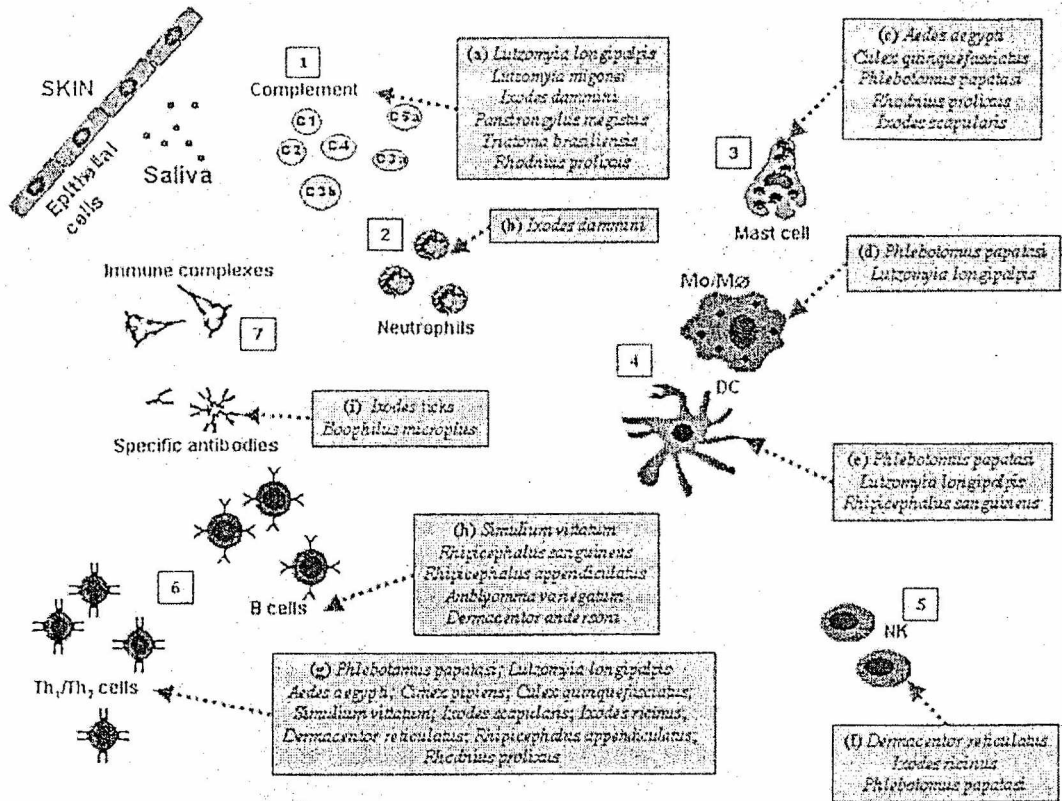


Fig. 3 – Host immune response is modified by arthropod’s saliva. Salivary molecules can act on different effector cells and mediators of the immune system: (1) The complement system: inhibition of complement release of vasoactive mediators and cell activation in both classical and alternative pathways (*Lutzomyia longipalpis*, *Ixodes dammini*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus*); (2) Neutrophils: inhibition of neutrophil function (*Ixodes dammini*); (3) Mast cells: reduction of mast cell degranulation and release of inflammatory mediators (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Phlebotomus papatasi*, *Rhodnius prolixus* and *Ixodes scapularis*); (4) Antigen Presenting Cells: macrophages: inhibition of macrophage activation (*Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*) and dendritic cells: reduction of dendritic cell differentiation, maturation and cytokine production (*Phlebotomus papatasi*, *Lutzomyia longipalpis* and *Rhipicephalus sanguineus*); (5) NK cells: reduction of NK cell cytotoxicity (*Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* and *Phlebotomus papatasi*); (6) Lymphocytes: B cells: inhibition of cell proliferation and modulation of immunoglobulin production (*Simulium vittatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Dermacentor andersoni*) and T cells: modulation of cytokine production, reduced proliferative response and impaired leukocyte traffic (*Phlebotomus papatasi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti*, *Cimex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Simulium vittatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhodnius prolixus*) and (7) Antibodies and Immune Complexes: modification of immunoglobulin responses profile (*Boophilus microplus* and *Ixodes ticks*).

a hard tick, the development of a DTH response by an unnatural host pre-exposed to its salivary components in the site of the bite may lead to the rejection of the insect (Ribeiro 1995b), while other insects, like sand flies, take advantage to this process, feeding twice as fast at the site of inflammation, that presents a larger blood flow than normal skin (Belkaid et al. 2000). In the case of ticks, the rejection is rarely seen in natural association and it seems that bugs co-evolved with the host to overcome the immune response (Ribeiro 1995b).

Thus, blood-feeding ectoparasites developed strategies to suppress host acquired immune responses. Ability to alter host defenses might be a factor in determining the range of hosts a particular species can parasite. In this way, a thorough understanding of the molecules involved in induction of host immunosuppression can be extremely important in the identification of vaccine immunogens.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE AND CYTOKINE NETWORK

Cytokines act as cellular messengers, forming an integrated network that is highly involved in regulation of innate immunity and orchestrating, together with lymphocytes, all the components of acquired immune responses. In this section we explore these aspects of host's immunoregulation by most important blood-feeding arthropod species that have been studied.

Ticks are significant vectors of infectious diseases to both humans and animals. Ticks feeding on the host seem to have a systemic immunosuppressive effect on the host's immune system, including lymphocytes. Lymphocytes from tick-infested experimental animals had greatly reduced responses to mitogens *in vitro* (Wikel 1982, Wikel et al. 1978, Wikel and Osburn 1982). This effect has subsequently been demonstrated *in vitro* using the saliva or salivary gland extracts of several different species of hard ticks (Ferreira and Silva 1998, Fuchsberger et al. 1995, Ramachandra and Wikel 1992, 1995, Ribeiro et al. 1985, Urioste et al. 1994). Tick sali-

vary PGE₂ was primarily thought to be responsible for this lymphocytic suppressive effect (Inokuma et al. 1994, Ramachandra and Wikel 1992, Ribeiro et al. 1985). The down-regulation of T- or B-lymphocytes and macrophages by PGE₂ was previously demonstrated on *in vitro* studies (Bahl et al. 1991, Phipps et al. 1991, Spatafora et al. 1991) and it is very likely the prostaglandins would have some effects on the immune system of the host. *Ixodes scapularis* saliva (Fig. 2g) can inhibit IL-2 through a soluble IL-2 binding proteic factor presented in its saliva. (Gillespie et al. 2001). IL-2 activates T cells and IL-2 receptors have been described on many cell types including B cells, macrophages and NK cells (Siegel et al. 1987, Smith 1992, Theze et al. 1996) highlighting the importance of this simple cellular inhibitory mechanism. Saliva of another tick, *Ixodes ricinus* (Fig. 3g), is able to reduce the concanavalin A (Con A)- or PHA-induced lymphoproliferation (Schorderet and Brossard 1993, Urioste et al. 1994). This reduction in responsiveness occurred in parallel with a decrease in the IL-2 secretion by the splenocytes exposed to the saliva. Another study showed a reduction of splenic cell proliferative response to B-cell mitogens in BALB/c mice given four sequential infestation with *Ixodes ricinus* (Fig. 3h), but the response to Con A or PHA were slightly enhanced (Dusbabek et al. 1995). Few differences were detected in regard to the Con A- or LPS-stimulated *in vitro* responses of splenocytes from C3H/HeJ mice that were tick-naive or had been infested one to four times with *Ixodes scapularis* (Schoeler et al. 2000). However, antigen-specific proliferative responses to soluble, salivary gland proteins of *Ixodes scapularis* (Fig. 3g) did develop in the mouse lymphocytes during the course of the infestations (Schoeler et al. 1999). Concurrent with the development of these responses there was a decrease in expression of the Th1 cytokines, IL-2 and IFN- γ , and an up-regulation of the Th2 cytokines, IL-4 and IL-10 in susceptible animals (Schoeler et al. 1999, Zeidner et al. 1997). These effects were not seen in resistant BALB/c mice, sug-

gesting a basis of genetic predisposition in C3H/HeJ mice strain to *Ixodes scapularis* infestation.

Mice stimulated with saliva from *Rhipicephalus sanguineus* (Fig. 3g) induced transforming growth factor (TGF)- β production while IL-12 was reduced. Susceptible mice exposed to tick infestation modulated the immune response drastically reducing proliferation of lymph node cells after Con A stimulation and a production of Th2 cytokine represented by IL-4, IL-10 and TGF- β (Ferreira and Silva 1999). A similar response was observed in dogs (susceptible host) infested with this tick, they had a reduced proliferative reaction and a significant immediate but no DTH response to a cutaneous test induced by tick extract, whereas guinea pigs (resistant host) developed a strong DTH reaction (Ferreira et al. 2003).

Extracts prepared from the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks (Fig. 3g) reduced the expression of IFN- α , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-7 and IL-8 by LPS-stimulated human peripheral blood leukocytes (Fuchsberger et al. 1995). Thus, the saliva of these ticks may stimulate the deviation of host's immune system to a Th2 pattern, favoring the blood-sucker's survival. Work with saliva from *Dermacentor andersoni* (Fig. 3g) (Bergman et al. 1995, 1998) has shown that a protein of approximately 36 kDa is responsible for suppression of T cell proliferation by an unknown mechanism (Bergman et al. 1995). Tick salivary components can also alter the leukocyte traffic and the interactions between activated endothelial cells and adhesion molecules on the leukocyte surface. Splenic lymphocytes of mice infested with *Dermacentor andersoni* (Fig. 3g), as well as normal lymphocytes exposed to its saliva, had reduced expression of some of these adhesion molecules: leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and very late activation-4 (VLA-4) integrins (Macaluso and Wikel 2001). Therefore, *Dermacentor andersoni* salivary compounds can facilitate blood meal through retarding cellular migration and modifying the population of host's immune cells at the site of

tick attachment, also altering the activation pattern of these cells, creating an adequate microenvironment for parasitism.

Rhodnius prolixus is an important vector of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Spontaneous and mitogen-induced mouse lymphocyte proliferation were suppressed by *Rhodnius prolixus* (Fig. 3g) blood feeding (Kalvachova et al. 1999).

Besides tick bugs, black flies are capable of modulating their hosts' immune defense. Mice inoculated with a salivary gland extract (SGE) of the black fly *Simulium vittatum* (Fig. 3g and h) have reduced expression of major histocompatibility complex (MHC) class-II antigens on their splenocytes and even showed an *in vitro* (but not *in vivo*) inhibition of B- and T-lymphocyte mitogenesis (Cross et al. 1993a). It is possible that such changes interfere subtly with antigen-presentation as mice repeatedly exposed to *Simulium vittatum* SGE exhibited differential responses to ovalbumin (OVA) immunizations compared to control animals. Splenocytes from SGE-treated mice produced lower levels of IL-5 and IL-10 but not of IFN- γ , IL-2 and IL-4, upon OVA challenge than cells from mice treated with saline (Cross et al. 1994b).

Sand flies are the most extensively studied blood feeding insects in regard to modulation of host immune defenses (Charlab et al. 1999, Gillespie et al. 2000, Wikel 1999a). The adenosine deaminase contained in salivary extracts from *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 3g) can suppress T cell apoptosis besides inhibition of IL-12, IFN- γ , TNF- α and NO production (Charlab et al. 2000). The most important immunomodulatory substance isolated was the peptide maxadilan. Besides its effects on blood vessel smooth muscles and macrophages, maxadilan can also interfere in T-lymphocytes physiology, leading to an inhibition of the DTH reactions in mouse foot-pads (Qureshi et al. 1996). An effect on T-lymphocyte proliferation was determined by adding maxadilan to mouse splenocytes stimulated with Con A or anti-T-lymphocyte receptor

(Qureshi et al. 1996). The observed modulation of macrophage and T-lymphocyte functions could have arisen to prevent development of immune responses to the salivary gland proteins in the host, which are introduced into the site of the bite and are essential for successful blood feeding. Despite the absence of maxadilan peptide within *Phlebotomus papatasi* salivary glands (Fig. 3g), the saliva of this phlebotomine can also interfere on T-lymphocyte function through the inhibition of Th1 protective cytokines (IFN- γ and IL-12) production while enhancing the exacerbative cytokine IL-4 (Belkaid et al. 1998, Mbow et al. 1998).

Aedes aegypti SGE (Fig. 3g) added to cultures of Con A- or OVA-stimulated naive murine splenocytes caused significant suppression of IL-2 and IFN- γ production, but not of IL-4 and IL-5. No such effect was observed in activated splenocytes derived from ovalbumin-primed mice (Cross et al. 1994a). *Aedes aegypti* and *Cimex pipiens* saliva, as well as sialokinin I purified from *Aedes aegypti* salivary glands (Fig. 3g), are able to down regulate IFN- γ release and up-regulate IL-4 and IL-10 production up to 7 days after feeding (Zeidner et al. 1999). Recent data suggest that *Aedes aegypti* saliva can modify antigen-stimulated responses of transgenic OVA-TCR DO11 mouse splenocytes *in vitro* in a dose-dependent manner. An inhibition greater than 50% of T-cell proliferation was noted and the production of Th1 cytokines IL-2 and IFN- γ , and pro-inflammatory cytokines GM-CSF and TNF- α , and the Th2 cytokine IL-5, IL-4 and IL-10 were markedly reduced with a low-dose salivary stimulation (Wasserman et al. 2004). A protein of approximated 387kDa present in *A. aegypti* SGE reduced T-cell viability, whereas in dendritic cell it did not affect cell numbers but reduced its IL-12 production. Such profound effects observed with *Aedes aegypti* SGE are not observed with SGE from *Culex quinquefasciatus* (Wanassen et al. 2004), pointing out the different immunomodulatory activities used by these two culicine mosquitoes to take a successfully blood meal.

B CELLS AND ANTIBODY PRODUCTION

Ixodid ticks remain attached to their hosts and acquire a blood meal over a period ranging from days to weeks (Ribeiro 1989). The extended period of exposure to tick saliva provides ample opportunity for the host to develop acquired immune responses to those molecules, including antibody neutralization of immunogenic molecules. In fact, both natural and experimental hosts can develop immunologically-based resistance to tick feeding (Brossard and Wikel 1997, Wikel 1982, 1996). Acquired resistance to tick infestation is expressed as reduced engorgement, decreased numbers and viability of ova, impaired moulting, and death of feeding ticks (Wikel 1996, 1999b). To circumvent this life menace, ticks evolved different mechanisms for host antibody response suppression. Infestation of guinea pigs with adult *D. andersoni* reduced the IgM-attributable plaque-forming cell responses of the hosts after immunization with sheep erythrocytes (Wikel 1985), what suggests that tick feeding can suppress the host ability to generate primary antibody response to a thymic dependent antigen. Likewise, *Rhi. sanguineus* infestation of dogs reduced immunization-induced antibody responses even seven weeks after initial immunization (Inokuma et al. 1997). Ixodid ticks (Fig. 3i) also produce an unique family of proteins that bind vertebrate immunoglobulin (Wang and Nuttall 1995a, b), immunoglobulin-G binding proteins (IGBPs), discovered when it was realized that ticks excrete host immunoglobulins in their saliva during feeding (Wang and Nuttall 1994). Studies on the African tick (Wang and Nuttall 1994) *Rhipicephalus appendiculatus*, revealed that these immunoglobulins are transported from the tick body cavity to the salivary glands, whence they are excreted in the tick's saliva back into the host, retaining their antibody-binding activity. This led to the discovery of a family of IGBPs produced in the haemolymph and salivary glands of several ixodid tick species, either including *Ixodes hexagonus* and *Amblyomma va-*

riegatum (Wang and Nuttall 1995b). Together these data indicated that IGBPs act as a self-defense system against ingested immunoglobulins.

Boophilus microplus ticks saliva can modulate the isotype of host antibody responses. High tick infestation decreases serum levels of IgG1 and IgG2 antibodies in susceptible (Holstein) breeds, but not in resistant (Nelore) ones. Conversely, levels of IgE antibodies increase after infestations in susceptible breeds, but are not related to protective anti-tick host response (Kashino et al. 2005).

Finally, the diversity of components mediating vertebrate inflammatory and haemostatic responses has been countered in evolution by an equally diverse array of antagonists in the saliva of blood-sucking arthropods.

PATHOGEN DELIVERY: INTRUDERS TAKING A FREE RIDE

The modifications on vertebrate host physiology caused by salivary active pharmacological molecules favors the delivery of microscopic parasites that colonize the digestive tract of the blood-feeding arthropod. This would apply to pathogens that are delivered via the mouthparts, either by salivation or regurgitation, and might also hold for those transmitted via rectum (e.g. *Trypanosoma cruzi*), since they may also invade the host through the bite wound (Titus and Ribeiro 1990). Indeed, the world's most important infectious diseases, ranging from malaria, filariasis, trypanosomiasis, leishmaniasis and Lyme diseases are transmitted by blood-sucking arthropods such as mosquitoes, tsetse flies, sand flies and ticks.

Titus and Ribeiro (Titus and Ribeiro 1988) first demonstrated that saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhanced *Leishmania major* infection when the parasite was co-inoculated with sand fly salivary gland lysate. In addition to enhancing lesion size, sand fly salivary gland lysate also markedly enhanced the parasite burden within the lesions. Similar findings were reported with other *Leishmania* species (Lima and Titus 1996, Samuelson et al.

1991, Theodos et al. 1991, Warburg et al. 1994). Maxadilan alone also exacerbated lesion size and parasite burden within the lesions to the same degree as sand fly salivary gland (Morris et al. 2001). Thus, maxadilan appear to be the principal peptide in the sand fly saliva that enhances infection with *Leishmania major*. PGE₂, IL-4 and IL-6 also favor *Leishmania* establishment since the host immunoregulation can decrease the number of parasites been killed by activated immune cells. In leishmaniasis, resistance and protection are associated with the expression of IFN- γ and IL-12 driving a CD4+ Th1 response, while susceptibility is linked to production of IL-4 and the development of a CD4+ Th2 response (Alexander et al. 1999, McSorley et al. 1996). *Lutzomyia longipalpis* saliva seems to drive, by an unknown mechanism, the host immune response to a Th2 type, less effective in terms of parasite clearance. Macrophages with sub-optimal activation serve as reservoirs for *Leishmania* (Alexander et al. 1999, Solbach and Laskay 2000, Zer et al. 2001), where it can replicate without host control.

Saliva from *P. duboscqi* attracts vertebrate monocytes *in vitro* (Anjili et al. 1995) and saliva from *P. papatasi* not only attracts macrophages but also enhances infection by *L. donovani* in these cells, resulting in increased parasite loads (Zer et al. 2001). Interestingly, *Lu. longipalpis* saliva also induces CCL2/MCP-1 expression and macrophage recruitment to the inoculation site in the air pouch model of inflammation, possibly favoring *Leishmania* infection if these cells are not adequately activated (Teixeira CR, unpublished data). Despite the absence of maxadilan in its saliva, salivary gland lysates of *Phlebotomus papatasi* can also enhance infection with *Leishmania*, through induction of IL-4 production (Mbow et al. 1998). IL-4 exacerbates infection with *Leishmania* and can reduce parasite destruction by macrophages, reducing NO release (Mbow et al. 1998). The presence of adenosine in the salivary glands of *Phlebotomus papatasi* could also play a part in suppressing the immune

responses and thus promoting the establishment of *Leishmania* parasites by enhancing production of IL-10 and, together with inosine, decreasing production of IL-12, IFN- γ , TNF- α and NO (Hasko et al. 1996, 1998, Romano et al. 1983).

Mosquitoes are associated with the transmission of malaria and many species of virus. Relationship between mosquitoes' saliva and the pathogens they transmit is largely neglected. These parasites colonize salivary glands and are naturally transmitted when a vector salivates during feeding a vertebrate host. For example, the Cache-Valley virus, an arthropod-borne bunyavirus, recently emerged as a significant veterinary pathogen causing infertility and congenital malformations in North America ruminants (Chung et al. 1990, Edwards et al. 2003, Edwards et al. 1989). Enhancement of infection by this virus on mice after feeding by *Aedes triseriatus*, *Aedes aegypti* or *Culex pipiens*, was observed but not elucidated (Edwards et al. 1998). Co-inoculation of sindbis virus with *Aedes aegypti* salivary gland extract resulted on a reduced IFN- β expression, when compared to injection of virus alone (Schneider et al. 2004). *Aedes aegypti* can also transmit dengue virus, a flavivirus that causes dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. Dendritic cells seem to be permissive for dengue virus and function as primary targets of initial infection (Ader et al. 2004). *Aedes aegypti* saliva inhibited infection by dengue virus in DC, and pre-sensitization of DCs with saliva prior to infection enhanced inhibition. In addition, the proportion of dead cells was also reduced in virus-infected DC cultures exposed to mosquito saliva, and an enhanced production of IL-12p70 and TNF- α was detected in these cultures (Ader et al. 2004). These data suggest a paradoxical protective role for *Aedes aegypti* saliva that limits viral uptake by DCs. However, more elucidative studies are needed for an overall understanding of the natural pathogenesis of dengue virus infection. Besides virus, *Aedes* saliva is also important in parasite transmission. Chickens subcutaneously infected with *Plasmodium gal-*

linaceum sporozoites in the presence of *Aedes fluviatilis* SGH showed a higher level of parasitaemia when compared to those that received only sporozoites (Rocha et al. 2004). However, parasitaemia levels were lower among chickens immunized with SGH.

The influence of tick salivary components on parasite transmission has been studied intensively worldwide and shows us interesting data. In addition to Lyme disease, ticks are vectors of other pathogens that are responsible for rickettsial diseases (Burgdorfer 1977), babesiosis (Piesman et al. 1986, Spielman et al. 1985), emerging infections such as ehrlichiosis (Magnarelli et al. 1995, Telford et al. 1996), and may also transmit tick-borne encephalitis viruses (Telford et al. 1997), all of which may be influenced by tick salivary immunomodulatory factors. The etiological agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, develops first in the midgut of the tick. It then migrates to the salivary glands when the tick is taking a blood meal and is injected with saliva into the vertebrate host (Ribeiro et al. 1987). A limited number of studies involving feeding *Ixodes scapularis* nymphs on mice have also been published, all utilizing *ex vivo* restimulation of splenocytes. Single (Zeidner et al. 1997) or repeated infestations with pathogen-free *Ixodes scapularis* nymphs resulted in suppression of the Th1 cytokines IL-2 and IFN- γ and enhancement of the Th2 cytokines IL-4 and IL-10, (Schoeler et al. 1999). Zeidner et al. also took the additional approach of studying the effects of uninfected nymphs compared to nymphs infected with *B. burgdorferi*, thus allowing an assessment of the relative contribution of the vector and the pathogen to host immunomodulation. Using infected nymphs, they found that Th2 polarization occurred in C3H/HeJ mice but not in BALB/c mice after a single infestation, as assessed using splenocytes, and they suggested that this might have ramifications for spirochete transmission *in vivo*. Indeed, differences in susceptibility of hosts to tick feeding, and likewise pathogen transmission, may lie in relatively subtle

differences in cytokine expression following exposure to tick salivary secretions and associated pathogens. The tick *Dermacentor reticularis* (Fig. 3f) can increase arboviruses transmission by affecting host NK cells functions and manipulating host cytokine network (Hajnicka et al. 2005), besides promoting virus growth (Hajnicka et al. 1998). It has been reported that tick saliva also enhances the transmission of Thogoto virus from infected to uninfected *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* ticks (Davies et al. 1990). The salivary effect observed was also seen even when the host did not exhibit detectable viraemia, and the virus was applied three days after saliva (Jones et al. 1987, 1990). Moreover, *Rhipicephalus appendiculatus* salivary gland extracts enhanced the uptake of *Theileria parva* sporozoites into lymphocytes, macrophages and afferent lymph veiled cells (Shaw et al. 1993).

IMMUNE RESPONSE TO BLOOD-FEEDING SALIVARY GLAND ANTIGENS: THE COUNTER ATTACK

All the effects of blood feeding arthropod saliva on host physiology observed here are originated from a unique molecule or a group of them. These molecules are also immunogenic and elicit host specific immune response. Thus, pre-exposure to insect saliva may render human and other vertebrate hosts resistant to a new blood meal or may even contribute to create an inhospitable environment for the establishment of the parasites transmitted by these insects. The observations regarding repeated exposure to pathogen-free ectoparasites and the subsequent development of resistance to vector-borne infections are intriguing. This knowledge can contribute to the development of a control strategy targeting the factors in blood-feeder saliva that are essential for the host immunosuppression and the transmission of infectious agents.

Rabbits expressing acquired resistance to infestation with *D. andersoni* are less susceptible to infection with tick-transmitted *Franciella tularensis*

than tick susceptible controls. Subsequent studies supported evidence that pre-exposure to tick's bites may induce host resistance. Guinea pigs that are resistant and form a DTH response in the area of saliva from *Rhipicephalus sanguineus* inoculation are more resistant to future tick infestations while dogs and mice that develop an immediate response with a disturbed pattern of cellular migration are susceptible to infestations (Ferreira et al. 2003). Mice infested four times with pathogen-free *Ixodes scapularis* developed acquired resistance to *Borrelia burgdorferi* infection in subsequent challenge with infected ticks (Wikel et al. 1997). A similar study with guinea pigs exposed previously to uninfected *Ixodes scapularis* showed that repeated challenges lead to a development of host tick immunity and protection against *Borrelia burgdorferi* (Nazario et al. 1998). The host's specific antibody production against ticks was also used as epidemiological marker of previous vector exposure, such as to *Ixodes scapularis* (Schwartz et al. 1990, 1991).

More recently, the protective host response was reported in sand flies (Belkaid et al. 1998). The exacerbative effect of saliva on infection, seen when mice were co-inoculated with *L. major* and salivary glands sonicate (SGS) of *P. papatasi*, was completely abrogated in mice pre-exposed to the salivary sonicate (Belkaid et al. 1998). This protection was reproduced following transmission of *L. major* by the bite of infective *P. papatasi* sand flies. Compared with naïve mice, mice pre-exposed to the bites of uninfected flies showed reduction in lesion pathology, in parasite load, and also in their ability to transmit *Leishmania* back to uninfected flies (Kamhawi et al. 2000). The protection conferred by pre-exposure of mice to saliva was associated with a strong DTH response at the site of the bite (Kamhawi et al. 2000). We have demonstrated that *Lu. longipalpis* saliva induces an intense and diffuse inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, eosinophils, and macrophages in pre-exposed mice. This response was observed at 2 hours and sustained up to 48 hours after SGS challenge, but was not a typical

DTH reaction, which is predominantly a mononuclear cell infiltrate. Two hours after injection of immune sera preincubated with SGS in the ear dermis of unexposed mice, there was an inflammatory infiltrate comprised of neutrophils and macrophages, suggesting a potential role of immune complexes in the observed cell infiltration (Silva et al. 2005).

BALB/c mice exposed to repeated *Lu. longipalpis* bites developed antibodies to saliva. Significant IgG and IgG1 anti-saliva antibody responses were elicited, which suggest a predominant Th2 response in these animals. Sera from immune mice recognized with a high frequency and a strong reaction the 45-kD and 44-kD proteins from *Lu. longipalpis* saliva (Silva et al. 2005). These proteins were also the major targets of human antibody response in an endemic area (Barral et al. 2000). Since these proteins are widely recognized, they are natural candidates to be used as markers of exposure to *Lu. longipalpis* bites. Mounting an antibody response against sand fly saliva occurred at the same time as the host developed an anti-leishmania cell-mediated immune response (Gomes et al. 2002). Although tempting, it remains to be demonstrated that protection against *Leishmania* infections is conferred by pre-exposure to sand fly bites in endemic areas for leishmaniasis.

Anopheles stephensi mosquito bites induce dermal mast cell degranulation, leading to fluid extravasation and neutrophil influx (Demeure et al. 2005). This inflammatory response does not occur in mast cell-deficient W/W^y mice, unless these are reconstituted specifically with mast cells. Mast cell activation caused by *A. stephensi* mosquito bites is followed by hyperplasia of the draining lymph node due to the accumulation of CD3⁺, B220⁺, CD11b⁺, and CD11c⁺ leukocytes. The T cell enrichment of the draining lymph nodes results from their sequestration from the circulation rather than local proliferation (Demeure et al. 2005). This work emphasized the critical contribution of peripheral mast cells in inducing T cell and dendritic cell recruitment within draining lymph nodes, a prerequisite for the elicita-

tion of T and B lymphocyte priming. There was also a slight increase in mast cells present in the ear dermis of mice two hours after *Lutzomyia longipalpis* bites (Silva et al. 2005).

Mice immunized with salivary antigens from *Simulium vittatum* developed IgG, IgM, and IgE antibodies which recognized several salivary gland components. Sera from bitten mice recognized fewer antigens than sera from animals intraperitoneally immunized with salivary gland extract, indicating that some components of the salivary gland extract were poorly immunogenic or absent from the saliva secreted during blood-feeding (Cross et al. 1993b).

These data suggest that human and others vertebrate hosts can develop immune responses that block the effects of saliva and that an appropriate vaccine should accelerate the development of these responses in the vaccinated host and thus protect against vector-borne infections. But the development of vector-blocking vaccines will not be a trivial task.

CLOSING REMARKS

The key for the success of blood-feeding arthropod parasitism is the ability of avoiding host immune responses through the production of specific salivary antagonists. Analyzes of these substances reveal a significant biochemical and pharmacological diversity. The isolation of specific molecules through experimental techniques has been made over the last 10 years and contribute to a better understanding of pathogen-vector-host interactions. Although many aspects have been described a few important issues remain to be understood to better explore salivary molecules.

Haematophagy has a polyphyletic origin, but a convergent evolution has equipped many haematophagous animals, with analogous resources for the success blood meal, not only between insects, but even in bats, worms, and leeches. The variation in salivary content has been described among the same species in different geographical regions.

An expanded effort for studying salivary content of species from different parts of the world will certainly increase the chances in finding common molecules that could function as markers or as candidates for a wide-ranging vaccine. The identification of new species or subspecies may also reveal novel molecules or strategies in avoiding host defense mechanism. This natural diversity of substances can serve in therapeutics and biomedical research but a note of caution is necessary as salivary products have diverse behavior in distinct models of inflammation or immune response. Understanding such variation, as well as testing the same molecule in several models, is important for unraveling subtle differences in composition and molecular interaction with potential practical applications. There is also a need in expanding our understanding of host protective mechanisms. Some aspects remain under explored, few studies exist on the interaction of salivary products and innate immunity, e.g. The aspects involved in future adaptive immune response resulting in resistance or susceptibility widely depends on the first attempt of host's innate response to contain infection/infestation that may influence on the predominance of a pattern of future host's immune adaptive response.

The ultimate purpose of research that examines pathogens transmitted by arthropods is to develop an effective vaccine. But it has proven very difficult to develop efficiently host sterile immunity and long-lived vaccines against vector-borne pathogen and parasites. These organisms often present very complex life cycles, enabling the occurrence of new and more pathogenic strains also resistant to conventional treatment. Vaccines that target more than one facet of parasite's life cycle, like the pathogen itself, vector salivary proteins and vector-pathogen interactions, may prove to be more effective, but more resources are needed to improve this knowledge. New genetic sequencing technologies and high efficient proceedings of protein isolation and cloning permit the experimental production of some of these substances indispensable for biochemical,

pharmacological and immunological investigations and even for clinical studies.

High-throughput genomic and proteomic approaches for cloning salivary cDNA have resulted in the discovery of genes and proteins not previously reported in blood feeding arthropods. These reality allows not only the isolation of salivary factors implicated in host hemostasis and inflammation, but also the characterization of novel salivary molecules, for many of which the biological function is unknown (Valenzuela 2001). Within this huge quantity of molecules, those responsible for the salivary modulatory effects on their hosts, which also permit the vector-borne pathogen establishment, may be targeted by an ideal vaccine. The challenge is to encounter a high-throughput expression system to test the biological activities of each candidate molecule. Such perspectives are summarized in Table I.

Thus, for vaccination using vector salivary proteins, the isolation of salivary immunosuppressors to make specific neutralizing antibodies and the pursuit of salivary proteins that elicit optimal cellular responses are strategies that if combined may result in reducing disease burden, rewriting this tale of blood, albeit may not reduce the host tissue tear.

RESUMO

A saliva de artrópodes hematófagos é rica em moléculas com funções diversas que mediam uma alimentação sanguínea bem sucedida. Estas moléculas agem não apenas como armas contra a resposta hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro funcionando também como ferramentas para o estabelecimento de patógenos. Parasitas, vírus e bactérias aproveitando-se deste arsenal dos vetores adaptaram-se facilitando seu estabelecimento no hospedeiro. Hoje, várias moléculas salivares foram identificadas e caracterizadas como novos alvos para o desenvolvimento de vacinas futuras. Neste trabalho, centramos em informação recente sobre a saliva de vetores e as moléculas responsáveis por modificar a resposta hemostática e imunológica assim como seu papel na transmissão de doenças.

TABLE I
Future challenges regarding saliva from haematophagous vectors.

- Identification of new species or subspecies to reveal a wider option of molecules that impair host's defense mechanisms;
- Salivary molecules isolation through new genetic sequencing technologies and high efficient proceedings facilitating the access to study candidate molecules;
- Identify salivary content of species worldwide targeting common molecules from sibling species for a wide-ranging vaccine;
- Understand protective mechanisms regarding the early steps of host's response to salivary molecules that can lead to resistance or susceptibility;
- Test candidate salivary molecules in several models for enlightening subtle differences and similarities within components important for pathogen establishment;
- Development of vaccines that target aspects of pathogens and salivary molecules simultaneously.

Palavras-chave: saliva, picadas, hemostasia, hospedeiro, vetor, infecção.

REFERENCES

- ADER DB, CELLUZZI C, BISBING J, GILMORE L, GUNTHER V, PEACHMAN KK, RAO M, BARVIR D, SUN W AND PALMER DR. 2004. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. *Viral Immunol* 17: 252-265.
- ALEXANDER J, SATOSKAR AR AND RUSSELL DG. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112: 2993-3002.
- ALEXANDER JO. 1986. The physiology of itch. *Parasitol Today* 2: 345-351.
- ANJILI CO, MBATI PA, MWANGI RW, GITHURE JI, OLOBO JO, ROBERT LL AND KOECH DK. 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop* 60: 97-100.
- ARCA B, LOMBARDO F, DE LARA CAPURRO M, DELLA TORRE A, DIMOPOULOS G, JAMES AA AND COLUZZI M. 1999. Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1516-1521.
- BAHL AK, FOREMAN JC AND DALE MM. 1991. The effect of prostaglandin E2 and non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell-associated interleukin one. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 21B: 513-515.
- BARRAL A, HONDA E, CALDAS A, COSTA J, VINHAS V, ROWTON ED, VALENZUELA JG, CHARLAB R, BARRAL-NETTO M AND RIBEIRO JM. 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745.
- BELKAID Y, KAMHAWI S, MODI G, VALENZUELA J, NOBEN-TRAUTH N, ROWTON E, RIBEIRO J AND SACKS DL. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188: 1941-1953.
- BELKAID Y, VALENZUELA JG, KAMHAWI S, ROWTON E, SACKS DL AND RIBEIRO JM. 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6704-6709.
- BELL JF, STEWART SJ AND WIKEL SK. 1979. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-

- sensitized rabbits: allergic kleudusity. *Am J Trop Med Hyg* 28: 876-880.
- BERGMAN DK, RAMACHANDRA RN AND WIKEL SK. 1995. *Dermacentor andersoni*: salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to concanavalin A *in vitro*. *Exp Parasitol* 81: 262-271.
- BERGMAN DK, RAMACHANDRA RN AND WIKEL SK. 1998. Characterization of an immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary glands. *J Med Entomol* 35: 505-509.
- BISSONNETTE EY, ROSSIGNOL PA AND BEFUS AD. 1993. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. *Parasite Immunol* 15: 27-33.
- BOYCE JA. 2004. The biology of the mast cell. *Allergy Asthma Proc* 25: 27-30.
- BOZZA M, SOARES MB, BOZZA PT, SATOSKAR AR, DIACOVO TG, BROMBACHER F, TITUS RG, SHOEMAKER CB AND DAVID JR. 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol* 28: 3120-3127.
- BROSSARD M AND WIKEL SK. 1997. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol* 11: 270-276.
- BRUMMER-KORVENKONTIO H, LAPPALAINEN P, REUNALA T AND PALOSUO T. 1994. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 93: 551-555.
- BURGDORFER W. 1977. Tick-borne diseases in the United States: Rocky Mountain spotted fever and Colorado tick fever. A review. *Acta Trop* 34: 103-126.
- CAPPELLO M, BERGUM PW, VLASUK GP, FURMIDGE BA, PRITCHARD DI AND AKSOY S. 1996. Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. *Am J Trop Med Hyg* 54: 475-480.
- CAPPELLO M, LI S, CHEN X, LI CB, HARRISON L, NARASHIMHAN S, BEARD CB AND AKSOY S. 1998. Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14290-14295.
- CAVALCANTE RR, PEREIRA MH AND GONTIJO NF. 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87-93.
- CAVASSANI KA, ALIBERTI JC, DIAS AR, SILVA JS AND FERREIRA BR. 2005. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 114: 235-245.
- CHAMPAGNE DE. 1994. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitol Today* 10: 430-433.
- CHAMPAGNE DE AND RIBEIRO JM. 1994. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 138-142.
- CHAMPAGNE DE, NUSSENZVEIG RH AND RIBEIRO JM. 1995a. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 270: 8691-8695.
- CHAMPAGNE DE, SMARTT CT, RIBEIRO JM AND JAMES AA. 1995b. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 694-698.
- CHARLAB R, VALENZUELA JG, ROWTON ED AND RIBEIRO JM. 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15155-15160.
- CHARLAB R, ROWTON ED AND RIBEIRO JM. 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol* 95: 45-53.
- CHINERY WA AND AYITEY-SMITH E. 1977. Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. *Nature* 265: 366-367.
- CHUNG SI, LIVINGSTON CW-JR., EDWARDS JF.

- CRANDELL RW, SHOPE RE, SHELTON MJ AND COLLISSON EW. 1990. Evidence that Cache Valley virus induces congenital malformations in sheep. *Vet Microbiol* 21: 297-307.
- CLARK WG. 1979. Kinins and the peripheral and central nervous systems. *Handbook of Experimental Pharmacology* 25: 311-356.
- COLLIS MG. 1989. The vasodilator role of adenosine. *Pharmacol Ther* 41: 143-162.
- COSTA DJ ET AL. 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72: 1298-1305.
- CROSS ML, CUPP MS, CUPP EW, GALLOWAY AL AND ENRIQUEZ FJ. 1993a. Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 30: 928-935.
- CROSS ML, CUPP MS, CUPP EW, RAMBERG FB AND ENRIQUEZ FJ. 1993b. Antibody responses of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 30: 725-734.
- CROSS ML, CUPP EW AND ENRIQUEZ FJ. 1994a. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 51: 690-696.
- CROSS ML, CUPP EW AND ENRIQUEZ FJ. 1994b. Modulation of murine cellular immune responses and cytokines by salivary gland extract of the black fly *Simulium vittatum*. *Trop Med Parasitol* 45: 119-124.
- CUPP MS, RIBEIRO JM AND CUPP EW. 1994. Vasodilative activity in black fly salivary glands. *Am J Trop Med Hyg* 50: 241-246.
- CUPP MS, RIBEIRO JM, CHAMPAGNE DE AND CUPP EW. 1998. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. *J Exp Biol* 201: 1553-1561.
- DAN A, PEREIRA MH, PESQUERO JL, DIOTAIUTI L AND BEIRAO PS. 1999. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol* 36: 875-879.
- DAVIES CR, JONES LD AND NUTTALL PA. 1990. A comparative study of the infection thresholds of Thogoto virus in *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. *Am J Trop Med Hyg* 43: 99-103.
- DELVES PJ AND ROITT IM. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49.
- DEMEURE CE ET AL. 2005. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol* 174: 3932-3940.
- DICKINSON RG, O'HAGAN JE, SCHOTZ M, BINNINGTON KC AND HEGARTY MP. 1976. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 54: 475-486.
- DIONISOTTI S, ZOCCHI C, VARANI K, BOREA PA AND ONGINI E. 1992. Effects of adenosine derivatives on human and rabbit platelet aggregation. Correlation of adenosine receptor affinities and anti-aggregatory activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346: 673-676.
- DUSBABEK F, BORSKY I, JELINEK F AND UHLIR J. 1995. Immunosuppression and feeding success of *Ixodes ricinus* nymphs on BALB/c mice. *Med Vet Entomol* 9: 133-140.
- EDWARDS JF, LIVINGSTON CW, CHUNG SI AND COLLISSON EC. 1989. Ovine arthrogryposis and central nervous system malformations associated with in utero Cache Valley virus infection: spontaneous disease. *Vet Pathol* 26: 33-39.
- EDWARDS JF, HIGGS S AND BEATY BJ. 1998. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J Med Entomol* 35: 261-265.
- EDWARDS JF, ANGULO AB AND PANNILL EC. 2003. Theriogenology question of the month. In utero infection of the doe by CVV. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1361-1362.
- FAUDRY E, LOZZI SP, SANTANA JM, D'SOUZA-AULT M, KIEFFER S, FELIX CR, RICART CA, SOUSA MV, VERNET T AND TEIXEIRA AR. 2004. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J Biol Chem* 279: 19607-19613.
- FEINGOLD BF AND BENJAMINI E. 1961. Allergy to

- flea bites. Clinical and experimental observations. *Ann Allergy* 19: 1275-1289.
- FERREIRA BR AND SILVA JS. 1998. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet Immunol Immunopathol* 64: 279-293.
- FERREIRA BR AND SILVA JS. 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology* 96: 434-439.
- FERREIRA BR, SZABO MJ, CAVASSANI KA, BECHARA GH AND SILVA JS. 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Vet Parasitol* 115: 35-48.
- FRANCISCHETTI IM, RIBEIRO JM, CHAMPAGNE D AND ANDERSEN J. 2000. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 275: 12639-12650.
- FRANCISCHETTI IM, VALENZUELA JG, ANDERSEN JF, MATHER TN AND RIBEIRO JM. 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99: 3602-3612.
- FUCHSBERGER N, KITA M, HAJNICKA V, IMANISHI J, LABUDA M AND NUTTALL PA. 1995. Ixodid tick salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. *Exp Appl Acarol* 19: 671-676.
- FUENTES-PRIOR P, NOESKE-JUNGLUT C, DONNER P, SCHLEUNING WD, HUBER R AND BODE W. 1997. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11845-11850.
- GILLESPIE RD, MBOW ML AND TITUS RG. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22: 319-331.
- GILLESPIE RD, DOLAN MC, PIESMAN AND TITUS RG. 2001. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J Immunol* 166: 4319-4326.
- GOMES RB, BRODSKYN C, DE OLIVEIRA CI, COSTA J, MIRANDA JC, CALDAS A, VALENZUELA JG, BARRAL-NETTO M AND BARRAL A. 2002. Seroprevalence against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186: 1530-1534.
- GREVELINK SA, YOUSSEF DE, LOSCALZO J AND LERNER EA. 1993. Salivary gland extracts from the deerfly contain a potent inhibitor of platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9155-9158.
- GREVELINK SA, OSBORNE J, LOSCALZO J AND LERNER EA. 1995. Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 33-37.
- GUBLER DJ. 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 4: 442-450.
- HAJNICKA V, FUCHSBERGER N, SLOVAK M, KOCKOVA P, LABUDA M AND NUTTALL PA. 1998. Tick salivary gland extracts promote virus growth *in vitro*. *Parasitology* 116: 533-538.
- HAJNICKA V, VANOVA I, KOCKOVA P, SLOVAK M, GASPERIK J, SLAVIKOVA M, HAILS RS, LABUDA M AND NUTTALL PA. 2005. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130: 333-342.
- HALL LR AND TITUS RG. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155: 3501-3506.
- HASKO G, SZABO C, NEMETH ZH, KVETAN V, PASTORES SM AND VIZI ES. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157: 4634-4640.
- HASKO G, NEMETH ZH, VIZI ES, SALZMAN AL AND SZABO C. 1998. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* 358: 261-268.
- HASKO G, KUHEL DG, NEMETH ZH, MABLEY JG, STACHLEWITZ RF, VIRAG L, LOHINAI Z, SOUTHAN GJ, SALZMAN AL AND SZABO C. 2000. Inosine inhibits inflammatory cytokine pro-

- duction by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* 164: 1013–1019.
- HIGGS GA, VANE JR, HART RJ, PORTER C AND WILSON RG. 1976. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina, Ixodidae). *Bull Entomol Res* 66: 665–670.
- HORN F, DOS SANTOS PC AND TERMIGNONI C. 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch Biochem Biophys* 384: 68–73.
- INOKUMA H, KEMP DH AND WILLADSEN P. 1994. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Vet Parasitol* 53: 293–299.
- INOKUMA H, AITA T, TAMURA K AND ONISHI T. 1997. Effect of infestation with *Rhipicephalus sanguineus* on the antibody productivity in dogs. *Med Vet Entomol* 11: 201–202.
- JONES LD, DAVIES CR, STEELE GM AND NUTTALL PA. 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 237: 775–777.
- JONES LD, DAVIES CR, WILLIAMS T, CORY J AND NUTTALL PA. 1990. Non-viraemic transmission of Thogoto virus: vector efficiency of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 846–848.
- JONES LD, KAUFMAN WR AND NUTTALL PA. 1992. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experientia* 48: 779–782.
- KALVACHOVA P, HRIBALOVA V, KODYM P AND VOLF P. 1999. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 36: 341–344.
- KAMHAWI S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2: 1765–1773.
- KAMHAWI S, BELKAID Y, MODI G, ROWTON E AND SACKS D. 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351–1354.
- KASHINO SS ET AL. 2005. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 110: 12–21.
- KATZ O, WAITUMBI JN, ZER R AND WARBURG A. 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 62: 145–150.
- KOPECKY J AND KUTHEJLOVA M. 1998. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunol* 20: 169–174.
- KUBES M, KOCAKOVA P, SLOVAK M, SLAVIKOVA M, FUCHSBERGER N AND NUTTALL PA. 2002. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. *Parasite Immunol* 24: 23–28.
- LANZARO GC, LOPES AH, RIBEIRO JM, SHOEMAKER CB, WARBURG A, SOARES M AND TITUS RG. 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 8: 267–275.
- LAVOPIERRE MM. 1965. Feeding mechanism of blood-sucking arthropods. *Nature* 208: 302–303.
- LE MOINE O, STORDEUR P, SCHANDENE L, MARCHANT A, DE GROOTE D, GOLDMAN M AND DEVIERE J. 1996. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 156: 4408–4414.
- LENER EA AND SHOEMAKER CB. 1992. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267: 1062–1066.
- LENER EA, RIBEIRO JM, NELSON RJ AND LENER MR. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234–11236.
- LEWIS CD, HOURANI SM, LONG CJ AND COLLIS MG. 1994. Characterization of adenosine receptors in the rat isolated aorta. *Gen Pharmacol* 25: 1381–1387.
- LIMA HC AND TITUS RG. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions

- and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64: 5442-5445.
- LINK AA, KINO T, WORTH JA, MCGUIRE JL, CRANE ML, CHROUSOS GP, WILDER RL AND ELENKOV U. 2000. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 164: 436-442.
- MACALUSO KR AND WIKEL SK. 2001. *Dermacentor andersoni*: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by BALB/c mice. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 413-427.
- MAGNARELLI LA, DUMLER JS, ANDERSON JF, JOHNSON RC AND FIKRIG E. 1995. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol* 33: 3054-3057.
- MBOW ML, BLEYENBERG JA, HALL LR AND TITUS RG. 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 161: 5571-5577.
- MCSORLEY S, PROUDFOOT L, O'DONNELL CA AND LIEW FY. 1996. Immunology of murine leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14: 451-464.
- MORO O AND LERNER EA. 1997. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* 272: 966-970.
- MORO O, TAJIMA M AND LERNER EA. 1996. Receptors for the vasodilator maxadilan are expressed on selected neural crest and smooth muscle-derived cells. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 1019-1025.
- MORRIS RV, SHOEMAKER CB, DAVID JR, LANZARO GC AND TITUS RG. 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167: 5226-5230.
- NASCIMENTO EP, DOS SANTOS MALAFRANTE R AND MARINOTTI O. 2000. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 43: 9-15.
- NAZARIO S, DAS S, DE SILVA AM, DEPONTE K, MARCANTONIO N, ANDERSON JF, FISH D, FIKRIG E AND KANTOR FS. 1998. Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am J Trop Med Hyg* 58: 780-785.
- NOESKE-JUNGBLUT C, KRATZSCHMAR J, HAENDLER B, ALAGON A, POSSANI L, VERHALLEN P, DONNER P AND SCHLEUNING WD. 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem* 269: 5050-5053.
- NOESKE-JUNGBLUT C, HAENDLER B, DONNER P, ALAGON A, POSSANI L AND SCHLEUNING WD. 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem* 270: 28629-28634.
- PAESEN GC, ADAMS PL, HARLOS K, NUTTALL PA AND STUART DI. 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell* 3: 661-671.
- PEREIRA MH, SOUZA ME, VARGAS AP, MARTINS MS, PENIDO CM AND DIOTAIUTI L. 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Trop* 61: 255-261.
- PEREZ DE LEON AA, RIBEIRO JM, TABACHNICK WJ AND VALENZUELA JG. 1997. Identification of a salivary vasodilator in the primary North American vector of bluetongue viruses, *Culicoides variipennis*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 375-381.
- PHIPPS RP, STEIN SH AND ROPER RL. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 12: 349-352.
- PIESMAN J, MATHER TN, TELFORD SR-3RD AND SPIELMAN A. 1986. Concurrent *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infection in nymphal *Ixodes dammini*. *J Clin Microbiol* 24: 446-447.
- QURESHI AA, ASAHINA A, OHNUMA M, TAJIMA M, GRANSTEIN RD AND LERNER EA. 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* 54: 665-671.
- RAMACHANDRA RN AND WIKEL SK. 1992. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol* 29: 818-826.

- RAMACHANDRA RN AND WIKEL SK. 1995. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: *in vitro* cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *J Med Entomol* 32: 338-345.
- REUNALA T, BRUMMER-KORVENKONTIO H, PALOSUO K, MIYANU M, RUIZ-MALDONADO R, LOVE A, FRANCOIS G AND PALOSUO T. 1994. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 104: 366-371.
- RIBEIRO JM. 1987a. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64: 347-353.
- RIBEIRO JM. 1987b. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32: 463-478.
- RIBEIRO JM. 1987c. Vector salivation and parasite transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82(Suppl. 3): 1-3.
- RIBEIRO JM. 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Exp Appl Acarol* 7: 15-20.
- RIBEIRO JM. 1995a. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143-152.
- RIBEIRO JM. 1995b. How ticks make a living. *Parasitol Today* 11: 91-93.
- RIBEIRO JM AND FRANCISCHETTI IM. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.
- RIBEIRO JM AND MATHER TN. 1998. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp Parasitol* 89: 213-221.
- RIBEIRO JM AND MODI G. 2001. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Anandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *J Parasitol* 87: 915-917.
- RIBEIRO JM AND SPIELMAN A. 1986. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp Parasitol* 62: 292-297.
- RIBEIRO JM AND VALENZUELA JG. 1999. Purification and cloning of the salivary peroxidase/ catechol oxidase of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J Exp Biol* 202: 809-816.
- RIBEIRO JM AND WALKER FA. 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J Exp Med* 180: 2251-2257.
- RIBEIRO JM, MAKOUL GT, LEVINE J, ROBINSON DR AND SPIELMAN A. 1985. Antihemostatic, anti-inflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* 161: 332-344.
- RIBEIRO JM, MATHER TN, PIESMAN J AND SPIELMAN A. 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 24: 201-205.
- RIBEIRO JM, WEIS JJ AND TELFORD SR-3RD. 1990. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp Parasitol* 70: 382-388.
- RIBEIRO JM, HAZZARD JM, NUSSENZVEIG RH, CHAMPAGNE DE AND WALKER FA. 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260: 539-541.
- RIBEIRO JM, SCHNEIDER M AND GUIMARAES JA. 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem J* 308 (Pt 1): 243-249.
- RIBEIRO JM, SCHNEIDER M, ISAIAS T, JURBERG J, GALVAO C AND GUIMARAES JA. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol* 35: 599-610.
- RIBEIRO JM, KATZ O, PANNELL LK, WAITUMBI J AND WARBURG A. 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol* 202: 1551-1559.
- RIBEIRO JM, CHARLAB R AND VALENZUELA JG. 2001. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 204: 2001-2010.
- ROCHA AC, BRAGA EM, ARAUJO MS, FRANKLIN BS AND PIMENTA PF. 2004. Effect of the *Aedes fluviatilis* saliva on the development of *Plasmodium gallinaceum* infection in *Gallus (gallus) domesticus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 709-715.

- ROGERS KA AND TITUS RG. 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite Immunol* 25: 127-134.
- ROMANO A, LADIJNSKY E AND ABOUD M. 1983. Effect of hyaluronidase on cell response to the antiviral and interferon inducing activity of poly(rf) . poly(rC). *Arch Virol* 78: 315-319.
- SAMUELSON J, LERNER E, TESH R AND TITUS R. 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 173: 49-54.
- SANDEMAM RM. 1996. Immune responses to mosquitoes and flies. In: WIKEL SK (Ed). *The Immunology of Host-ectoparasitic Arthropod Relationships*. CAB International, Wallingford, p. 175-203.
- SCHNEIDER BS, SOONG L, ZEIDNER NS AND HIGGS S. 2004. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunol* 17: 565-573.
- SCHOELER GB AND WIKEL SK. 2001. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 755-771.
- SCHOELER GB, MANWEILER SA AND WIKEL SK. 1999. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp Parasitol* 92: 239-248.
- SCHOELER GB, MANWEILER SA, BERGMAN DK AND WIKEL SK. 2000. Influence of repeated infestations with pathogen-free *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) on *in vitro* lymphocyte proliferation responses of C3H/HeN mice. *J Med Entomol* 37: 885-892.
- SCHORDERET S AND BROSSARD M. 1993. Changes in immunity to *Ixodes ricinus* by rabbits infested at different levels. *Med Vet Entomol* 7: 186-192.
- SCHWARTZ BS, RIBEIRO JM AND GOLDSTEIN MD. 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132: 58-66.
- SCHWARTZ BS, FORD DP, CHILDS JE, ROTHMAN N AND THOMAS RJ. 1991. Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol* 134: 86-95.
- SHAN EZ, TANIGUCHI Y, SHIMIZU M, ANDO K, CHINZEI Y, SUTO C, OHTAKI T AND OHTAKI N. 1995. Immunoglobulins specific to mosquito salivary gland proteins in the sera of persons with common or hypersensitive reactions to mosquito bites. *J Dermatol* 22: 411-418.
- SHAW MK, TILNEY LG AND MCKEEVER DJ. 1993. Tick salivary gland extract and interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by *Theileria parva* sporozoites. *Infect Immun* 61: 1486-1495.
- SIEGEL JP, SHARON M, SMITH PL AND LEONARD WJ. 1987. The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 238: 75-78.
- SILVA F, GOMES R, PRATES D, MIRANDA JC, ANDRADE B, BARRAL-NETTO M AND BARRAL A. 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72: 94-8.
- SMITH KA. 1992. Interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 4: 271-276.
- SOARES MB, TITUS RG, SHOEMAKER CB, DAVID JR AND BOZZA M. 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160: 1811-1816.
- SOLBACH W AND LASKAY T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* 74: 275-317.
- SPATAFORA M, CHIAPPARA G, D'AMICO D, VOLPES D, MELIS M, PACE E AND MERENDINO AM. 1991. Prostaglandin E2 down-regulates the expression of tumor necrosis alpha gene by human blood monocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 21B: 521-524.
- SPIELMAN A, WILSON ML, LEVINE JF AND PIESMAN J. 1985. Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu Rev Entomol* 30: 439-460.

- STARK KR AND JAMES AA. 1996a. Anticoagulants in vector arthropods. *Parasitol Today* 12: 430–437.
- STARK KR AND JAMES AA. 1996b. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 33: 645–650.
- STARK KR AND JAMES AA. 1998. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 273: 20802–20809.
- TELFORD SR-3RD, DAWSON JE, KATAVOLOS P, WARNER CK, KOLBERT CP AND PERSING DH. 1996. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6209–6214.
- TELFORD SR-3RD, ARMSTRONG PM, KATAVOLOS P, FOPPA I, GARCIA AS, WILSON ML AND SPIELMAN A. 1997. A new tick-borne encephalitis-like virus infecting New England deer ticks, *Ixodes dammini*. *Emerg Infect Dis* 3: 165–170.
- THEODOS CM AND TITUS RG. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite Immunol* 15: 481–487.
- THEODOS CM, RIBEIRO JM AND TITUS RG. 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 59: 1592–1598.
- THEZE J, ALZARI PM AND BERTOGLIO J. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17: 481–486.
- TITUS RG AND RIBEIRO JM. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306–1308.
- TITUS RG AND RIBEIRO JM. 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today* 6: 157–160.
- URIÖSTE S, HALL LR, TELFORD SR-3RD AND TITUS RG. 1994. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a non-prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Exp Med* 180: 1077–1085.
- VALENZUELA JG, WALKER FA AND RIBEIRO JM. 1995. A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *J Exp Biol* 198: 1519–1526.
- VALENZUELA JG, CHARLAB R, GALPERIN MY AND RIBEIRO JM. 1998. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*: A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem* 273: 30583–30590.
- VALENZUELA JG, FRANCISCHETTI IM AND RIBEIRO JM. 1999. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 38: 11209–11215.
- VALENZUELA JG, BELKAID Y, ROWTON E AND RIBEIRO JM. 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol* 204: 229–237.
- VARGAFTIG BB, CHIGNARD M AND BENVENISTE J. 1981. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. *Biochem Pharmacol* 30: 263–271.
- VOGT W. 1974. Activation, activities and pharmacologically active products of complement. *Pharmacol Rev* 26: 125–169.
- WAITUMBI J AND WARBURG A. 1998. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infect Immun* 66: 1534–1537.
- WANASEN N, NUSSENZVEIG RH, CHAMPAGNE DE, SOONG L AND HIGGS S. 2004. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol* 18: 191–199.
- WANG H AND NUTTALL PA. 1994. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109: 525–530.
- WANG H AND NUTTALL PA. 1995a. Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunol* 17: 517–524.
- WANG H AND NUTTALL PA. 1995b. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. *Parasitology* 111: 161–165.

- WARBURG A, SARAIVA E, LANZARO GC, TITUS RG AND NEVA F. 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345: 223-230.
- WASSERMAN HA, SINGH S AND CHAMPAGNE DE. 2004. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite Immunol* 26: 295-306.
- WEIGELT H, ADDICKS K, HAUCK G AND LUBBERS DW. 1979. Vitalmicroscopic studies in regard to the role of intraendothelial reactive structures in the inflammatory process. *Bibl Anat*, p. 11-20.
- WIKEL SK. 1979. Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. *Am J Trop Med Hyg* 28: 586-590.
- WIKEL SK. 1982. Immune responses to arthropods and their products. *Annu Rev Entomol* 27: 21-48.
- WIKEL SK. 1985. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. *Ann Trop Med Parasitol* 79: 195-198.
- WIKEL SK. 1996. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol* 41: 1-22.
- WIKEL SK. 1999a. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience* 49: 311-320.
- WIKEL SK. 1999b. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol* 29: 851-859.
- WIKEL SK AND OSBURN RL. 1982. Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 405-414.
- WIKEL SK, GRAHAM JE AND ALLEN JR. 1978. Acquired resistance to ticks. IV. Skin reactivity and *in vitro* lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. *Immunology* 34: 257-263.
- WIKEL SK, RAMACHANDRA RN, BERGMAN DK, BURKOT TR AND PIESMAN J. 1997. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect Immun* 65: 335-338.
- YIN H, NORRIS DE AND LANZARO GC. 2000. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. *Insect Mol Biol* 9: 309-314.
- ZEIDNER N, MBOW ML, DOLAN M, MASSUNG R, BACA E AND PIESMAN J. 1997. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect Immun* 65: 3100-3106.
- ZEIDNER NS, HIGGS S, HAPP CM, BEATY BJ AND MILLER BR. 1999. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol* 21: 35-44.
- ZER R, YAROSLAVSKI I, ROSEN L AND WARBURG A. 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 31: 810-814.

10.4 ANEXO 4

MARIA JÂNIA TEIXEIRA; CLARISSA R. TEIXEIRA; BRUNO B. ANDRADE;
MANOEL BARRAL-NETTO; ALDINA BARRAL. Chemokines in host parasite
interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology** 22: 32-40, 2006.

Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis

Maria Jania Teixeira^{1,2}, Clarissa Romero Teixeira^{1,3}, Bruno Bezerril Andrade^{1,3}, Manoel Barral-Netto^{1,3} and Aldina Barral^{1,3}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, Bahia, Brazil

²Fiocruz Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Ceará, Rua Alexandre Baraúna 949, 60430-160 Fortaleza, Ceará, Brazil

³Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, 40110-100 Salvador, Bahia, Brazil

Crucial to the defense against leishmaniasis is the ability of the host to mount a cell-mediated immune response capable of controlling and/or eliminating the parasite. Cell recruitment to the site of infection is essential to the development of the host cellular immune response. The process is controlled by chemokines, which are chemotactic cytokines produced by leukocytes and tissue cells.

Leishmaniasis: a worldwide problem

Leishmania are protozoan parasites that cause a wide spectrum of clinical manifestations. In the skin, these range from localized cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL) leishmaniasis to diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), whereas in the viscera they range from subclinical to potentially fatal disease [1]. The most severe forms are associated either with high parasite numbers and the absence of an effective T helper cell type 1 (Th1) immune response, as seen in patients with visceral leishmaniasis (VL), or with a high inflammatory response with few parasites but exhibiting tissue damage, as seen in MCL [1]. Worldwide, 12 million people are infected with this parasite, and more than 400 000 new cases are reported annually (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). Parasites that cause New World CL are grouped under the *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* complexes, whereas those that cause VL are grouped under the *Leishmania donovani* complex [1]. The etiological agents of Old World CL are represented by *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* and *Leishmania major*.

Leishmania parasites are obligate intracellular pathogens that preferentially invade macrophages or dendritic cells (DCs) for replication. Early events in host–parasite interactions are likely to influence the future course of the disease. Following infection with *Leishmania* in the skin, a local inflammatory process is initiated; this involves the accumulation of leukocytes at the site of parasite delivery [2]. The composition of the cell populations recruited in this early phase of the infection seems to be essential for defining the outcome of the disease. During this process,

members of the chemokine family have a fundamental role in attracting specific subsets of leukocytes to the site of infection and then stimulating them [3] (Box 1). The potential roles of chemokines in *Leishmania* infection include host defense functions such as leukocyte recruitment, participation in cell-mediated immunity, cell activation and antileishmanial activity.

Cytokine–chemokine networks

Cytokines have long been recognized as key elements in the host response against *Leishmania*. Macrophages, which harbor *Leishmania* preferentially, produce interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-12, all products implicated in the inflammatory response. Th1 cells produce interferon (IFN)- γ , and Th2 cells produce IL-4. Other cells are also implicated in cytokine production, with DCs producing IL-12 and natural killer (NK) cells IFN- γ [4,5].

Cytokines are directly involved with chemokine production and can also precede the expression of some chemokines, which, in turn, induce the production of additional inflammatory mediators. Cytokines exert a secondary effect on leukocyte recruitment by inducing the expression of several chemokine genes [6]. TNF- α and IL-1 β released from activated neutrophils (PMNs) and macrophages have been implicated in chemokine synthesis in several cell types, including PMNs, fibroblasts, and endothelial and epithelial cells [7]. In leishmaniasis, cytokines seem to synergize with leishmanial elements to regulate chemokine production. TNF- α and IL-1 β , together with macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α (also known as CCL3), were reported to regulate Langerhans cell-mediated transport of *Leishmania* from the infected skin to regional lymph nodes (LNs) in murine CL [8]. IL-12 is required for the induction of Th1-related chemokines such as XCL1 (also known as lymphotactin), IFN-inducible protein 10 (also known as CXCL10 or IP-10; hereafter referred to as CXCL10) and monocyte chemoattractant protein 1 (also known as CCL2 or MCP-1; hereafter referred to as CCL2) in LNs of resistant *L. major*-infected mice [9].

Interestingly, Th1- and Th2-derived cytokines can have antagonistic effects on chemokines. For example, some

Corresponding author: Barral, A. (abarral@cpqgm.fiocruz.br).

Available online 23 November 2005

Box 1. Chemokines and chemokine receptors

Chemokines are a superfamily of low molecular weight (6–17 kDa) cytokines that recruits distinct subsets of leukocytes and then activates them through increased adhesion, degranulation and the respiratory burst [3]. To date, >44 different chemokines have been described and there are 21 known chemokine receptors.

Most chemokines are secreted proteins of 67–127 amino acids. Their production is stimulated by a variety of agents, including lipopolysaccharides, mitogens, proinflammatory cytokines and several pathogens [7]. The two major structural subfamilies are distinguished by the arrangement of the two amino-terminal cysteine residues, which are either separated by a single amino acid (CXC) or are in adjacent (CC) positions. C chemokines (which lack two out of four canonical cysteines) and CX3C chemokines (with three intervening amino acids between the first two cysteines) are minor structural subfamilies [29].

Chemokine actions are mediated via specific cell-surface receptors, which are members of the seven-transmembrane domain, G-protein-coupled receptor family. The chemokine receptors are named CXC, CC, XC and CX3C, followed by R and a number (according to their ligands: CCR1–10, CXCR1–6, XCR1–2 and CX3CR1). The chemokine-receptor interaction is characterized by considerable promiscuity:

each receptor interacts with several chemokines, and each chemokine binds to several receptors [63]. Although the systematic nomenclature has generally been adopted for the receptors, chemokines are still mostly designated by their traditional names, and recently a new nomenclature was adopted [64].

The actions of chemokines are specific to particular cellular groups: members of the CXC class act mainly on PMNs, whereas members of the CC class act on a larger group of cells, including monocytes, basophils, eosinophils, and lymphocytes, but not PMNs. Lymphotactin, the only C chemokine, acts solely on specific subgroups of B and T lymphocytes. Fractalkine, a CX3C-type cytokine, has been reported to attract monocytes, PMNs and T lymphocytes [29].

Previously, chemokines were grouped into the subfamilies termed 'inflammatory' and 'homeostatic' chemokines. However, several chemokines have been described recently as 'dual-function' chemokines. Inflammatory chemokines have broad target-cell selectivity and act on cells of the innate, as well as the adaptive, immune system. Homeostatic chemokines navigate leukocytes during hematopoiesis. Dual-function chemokines participate in immune defense functions and also target non-effector leukocytes [7].

chemokines, such as monokine induced by IFN- γ (also known as CXCL9 or MIG; hereafter referred to as CXCL9) and CXCL10 are more selectively induced by IFN- γ [10]. The Th2-related cytokines IL-4 and IL-13 induce macrophage-derived chemokine (also known as CCL22 or MDC) and CCL6 (also known as C10) production in macrophages, and this production is inhibited by IFN- γ [11,12].

During infection, cytokines can also act synergistically with chemokines. IFN- γ acts with CCL2 to eliminate *L. major* from infected macrophages that have been stimulated by CCL2, whereas IL-4 antagonizes the production of this chemokine by *Leishmania*-infected macrophages [13]. Cytokine regulation of chemokines also appears to be cell specific, as illustrated by the observation that IL-4 and IL-13 strongly induce the production of CCL2 in endothelial cells but inhibit production in epithelial cells [14].

Therefore, there is interplay between cytokines and chemokines. Chemokines are implicated in cell migration and/or activation of both resident and migratory cells, and such cells, in turn, produce cytokines that influence chemokine expression.

The potential roles of chemokines in *Leishmania* infection

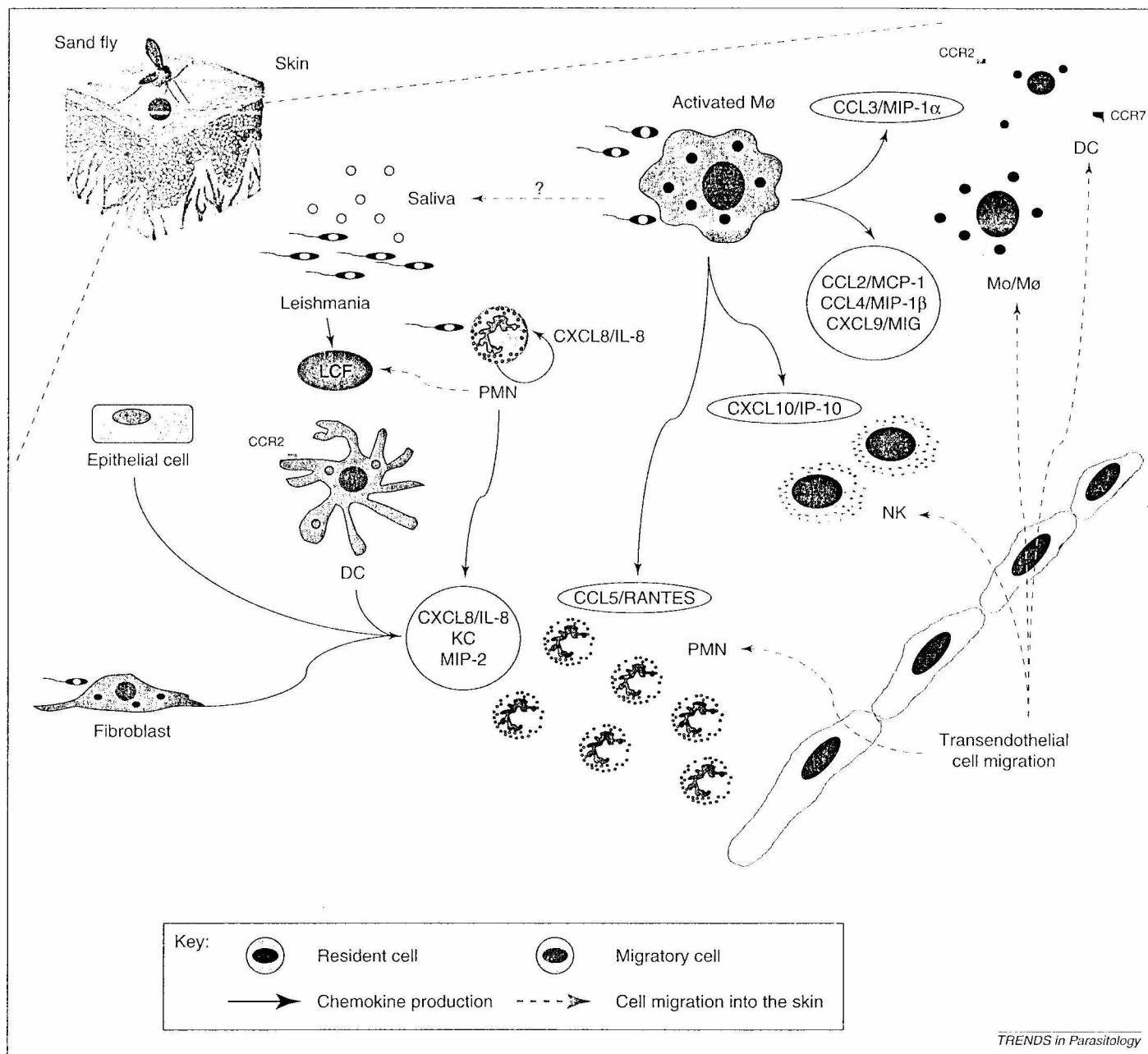
Leukocyte recruitment (innate immunity)

Chemokines have different roles in *Leishmania* infection; the most obvious is the recruitment of immune cells to the site of parasite delivery but they also have roles in adaptive immunity and in macrophage activation and parasite killing. The immune response is initiated at the site of pathogen entry by sentinel cells, including DCs, macrophages and $\gamma\delta$ T lymphocytes. Such cells are well equipped with Toll-like receptors (TLRs) [15] and phagocytic receptors [16], enabling the detection of pathogen-associated molecular patterns [17] and uptake of pathogens and opsonized particles. Sentinel cells also express various receptors for cytokines and, together with tissue cells, produce numerous

chemokines initiating a cascade of innate responses [18]. *L. major*-infected mice induce overall upregulation of CCL5 [also known as regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)], MIP-1 α , CXCL10 and CCL2 in the footpads and LNs, whereas these chemokines are constitutive in the spleens of TLR4-competent and -deficient mice. However, the expression patterns are not affected directly by the presence or absence of TLR4 [19].

Infection with *Leishmania* begins when an infected female sand fly takes a blood meal from a human host (Figure 1). The sand fly injects the mammalian host with *Leishmania* within its saliva. Sand fly saliva contains well-characterized molecules that have several activities, including vasodilation, inhibition of coagulation and immunomodulatory effects [20]. It also contains uncharacterized molecules that attract PMNs as well as macrophages [21,22]. The parasite itself also produces a chemoattractant protein called *Leishmania* chemotactic factor, which can attract PMNs [23]. It has recently been shown that, two hours after saliva injection, an intense and diffuse inflammatory infiltrate comprising PMNs, eosinophils and macrophages is induced only in mice pre-exposed to saliva [24].

PMNs are the first cells to arrive at the site of *Leishmania* infection [2]. In humans, PMNs containing *Leishmania* start secreting chemokines such as IL-8 (also known as CXCL8) [25] that are essential in attracting more PMNs to the site of infection. Upon experimental infection with *L. major*, MIP-2 and keratinocyte-derived cytokine (KC; also known as CXCL1), the functional murine homologs of human IL-8 [26], are rapidly produced in the skin [2]. *In vitro* studies have also shown that *L. major* promastigotes induce rapid and transient expression of KC by murine macrophages [27] and of IL-8 by human macrophages [28]. All of these chemokines are chemoattractants for PMNs [29]. PMNs can function as phagocytic cells,



TRENDS in Parasitology

Figure 1. The initial host chemokine interactions in cutaneous leishmaniasis and its effects on the innate immune response. After being inoculated to the host skin by sand fly mouthparts, *Leishmania* promastigotes, together with insect salivary components, induce IL-8, MIP-2 and KC production by sentinel cells (gray). PMNs are attracted early to the site of infection, ingest parasites and produce MIP-1 β and IL-8, which, in turn, recruit macrophages (M ϕ) and more granulocytes, respectively. Recruited macrophages are activated, phagocytose *Leishmania* and release CCL2, which attracts CCR2⁺ cells such as NK cells, DCs and more macrophages. Infected macrophages also secrete other chemoattractants for monocytes (Mo): MIP-1 α , MIP-1 β and CCL5.

taking up and killing *Leishmania* [30], and they have been implicated in early parasite control.

The role of PMNs in the context of the early response to *Leishmania* has undergone a major change in the past ten years. Early influx of PMNs has been demonstrated to be beneficial for *Leishmania* survival in infected tissue [31]. Moreover, *Leishmania* extends the lifespan of PMNs [32] and can survive intracellularly in these cells for hours or days after infection [31]. After being ingested by PMNs, *Leishmania* induce the release of MIP-1 β , recruiting macrophages to the site of infection [31]. Infected PMNs taken up by macrophages do not activate macrophage microbicidal function

[31,33]. After ingesting apoptotic PMNs, macrophages undergo inhibition of their proinflammatory cytokine production, through mechanisms involving transforming growth factor- β , prostaglandin E₂ and platelet-activating factor [34,35]. These events contribute to a 'silent' entry of *Leishmania* into macrophages, its main host cell type [36] (Figure 1).

Macrophages are the second wave of cells that enter the site of *Leishmania* infection (Figure 1). They have multiple functions; they serve as host cells for parasite replication, as antigen-presenting cells and as a source of cytokines modulating the T cell-mediated immune response. Moreover, after appropriate activation by Th1

cells, they serve as effector cells for intracellular parasite killing. Monocytes are attracted in the early stages of infection by products of sand fly saliva [21,22] and, two to three days later, by chemokines such as MIP-1 β [31]. *Leishmania* can also induce other monocyte-attractant chemokines. Accordingly, *L. major* promastigotes induce rapid and transient expression of JE, a protein inducible by platelet-derived growth factor, in murine macrophages [27] and of its homolog CCL2 in human macrophages [28]. Besides attracting monocytes and macrophages, CCL2 can attract other cells such as NK cells and DCs that are positive for the chemokine receptor CCR2 [13,37]. In human leishmaniasis, CCL2 and MIP-1 α seem to be responsible for macrophage activation in the skin lesions. Biopsy samples from patients with *L. mexicana* localized CL exhibited high

CCL2 expression and moderate levels of MIP-1 α ; by contrast, low levels of CCL2 and high levels of MIP-1 α were present in the nonhealing DCL lesions [38]. The authors [38] suggest that macrophages stimulated by the synergistic action of CCL2 and IFN- γ kill parasites in localized CL [15], whereas the presence of IL-4 in DCL lesions might suppress CCL2 expression and progression of disease.

NK cells come to the site of infection as early as 24 hours after *Leishmania* infection [2] (Figures 1 and 2). *L. major* infection leads to migration of NK cells, both to the infected skin and into the draining LNs [39]. NK cells are also detectable very early in the lesions of *L. braziliensis*-infected mice [40]. The migration of NK cells correlates with the expression of the NK cell-activating chemokine CXCL10 in resistant

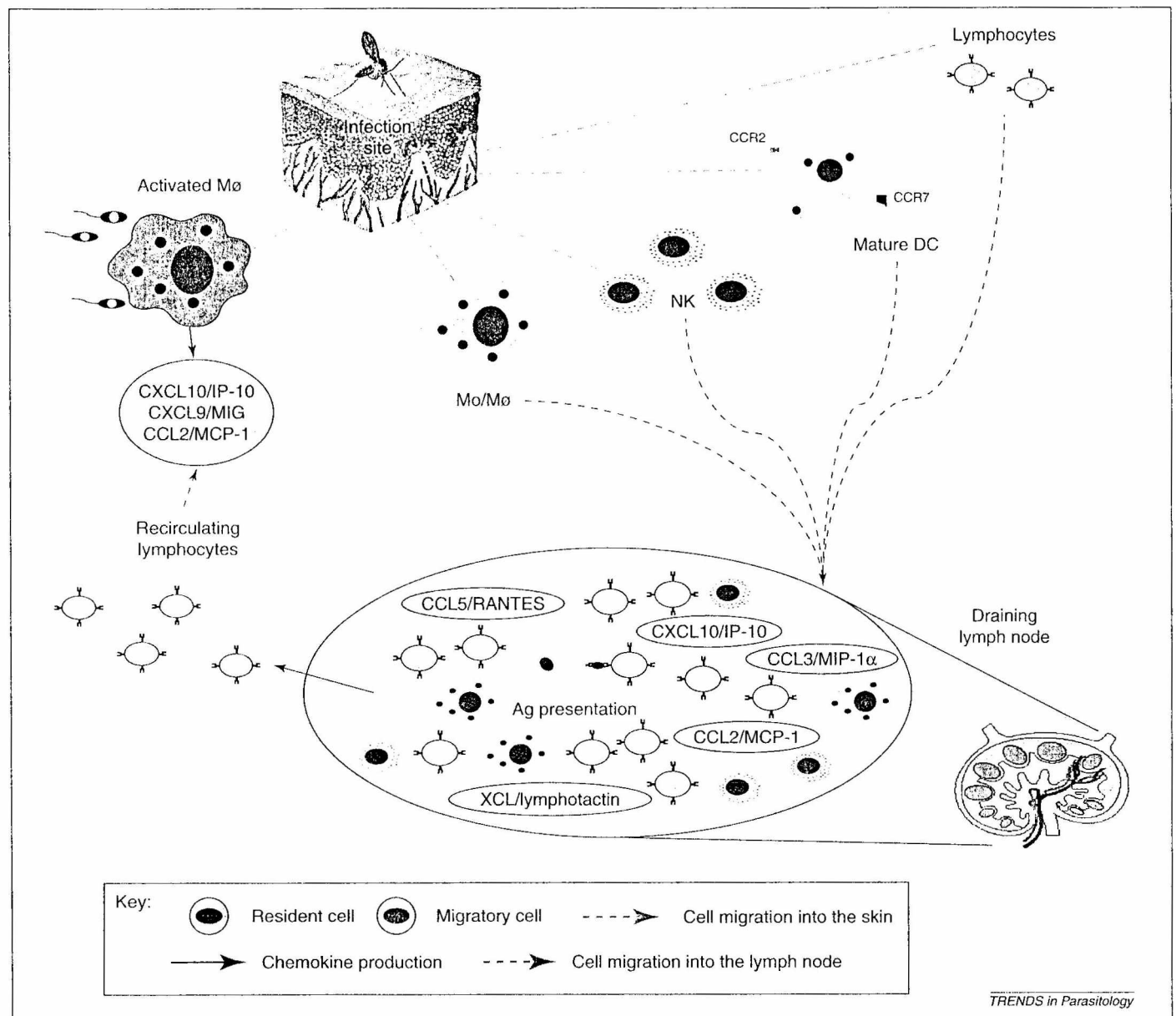


Figure 2. Host innate and adaptive immune response interactions in cutaneous leishmaniasis. Mature DCs, NK cells, macrophages and lymphocytes migrate to the draining lymph nodes, which produce CCL2, CXCL10, CCL5, MIP-1 α and XCL1. DCs present antigen to naive T cells and induce antigen-specific clonal expansion. Therefore, mature Th1 lymphocytes migrate back to the infection site, attracted by CXCL10, CXCL9 and probably CCL2, thereby orchestrating the host delayed type hypersensitivity response against *Leishmania*.

mice [41]. Treatment of susceptible BALB/c mice with recombinant CXCL10 results in significantly increased NK cell cytotoxic activity in the draining LN [2,41]. NK cells are known to produce IFN- γ , and its early activity might influence the kinetics of the Th1 response. Moreover, NK cells have been shown to be important, although not essential, for overall resistance to *L. major* infection [42]. Immune-deficient T cell-reconstituted mice, which selectively lack NK cells, have efficient IL-12-dependent IFN- γ production by CD4⁺T-cells and heal their lesions [43].

Cell-mediated immunity (adaptive immunity)

Cutaneous leishmaniasis

Skin DCs, which are potent antigen-presenting cells, have a decisive role as a bridge from innate to adaptive immune responses by priming naïve T cells (Figure 2). DCs take up *Leishmania* parasites, acquire a mature phenotype by upregulation of class I and II major histocompatibility complex surface antigens, increase their expression of co-stimulatory molecules (CD40, CD54, CD80 and CD86), release IL-12 p40 and transport the parasites from the infected skin to the draining LNs for presentation to antigen-specific T cells [44]. In *Leishmania*-infected mice, the ability of DCs to transport the parasites to the draining LNs seems to rely on the expression of CCR2 and CCR7. In CCR2-deficient mice, which are susceptible to *L. major* infection, DC migration to the draining LN and spleen was found to be markedly impaired, especially for the CD8 α ⁺ Th1-inducing DC subset, and these mice had a dominant Th2 phenotype [45]. CCR7 is also required for the migration of mature DCs from tissues to T cell areas of draining LNs [46]. *L. donovani*-induced down-regulation of CCR7 impairs DC migration, contributing to disease progression [47].

Indeed, mice lacking CCL2, a major CCR2 ligand, have impaired Th2 responses but secrete normal amounts of IFN- γ and are resistant to *L. major* infection [48]. This discrepancy might not be surprising, given the fact that CCR2 has at least two additional high-affinity ligands in the mouse [CCL7 (also known as MCP-3) and CCL12 (also known as MCP-5)], which, in the appropriate context, induce Th1 polarization in CCL2-deficient mice. Mature Th1 lymphocytes migrate back to the infection site, attracted by CXCL10, CXCL9 and probably CCL2, as seen in the lesions of patients with localized CL [38]. In summary, it is clear that the CCR2–CCL2 axis participates in innate immunity to *Leishmania* infection, such as in cell recruitment, but its participation in adaptive immunity through control of Th1 versus Th2 balance still remains controversial.

Other chemokine receptors have also been studied. CCR1-deficient C57BL/6 mice infected with *L. major* showed that CCR1 (which is preferentially expressed on CD4⁺ Th1 cells) upregulates the production of Th2-type cytokines such as IL-4 and IL-10 in the early course of disease [49]. However, CCR1 is not essential for T cell and macrophage trafficking, either to the site of infection or to the LNs following *L. major* infection [49]. By contrast, CXCR3 has a crucial role in the host defense against CL

caused by *L. major*. CXCR3^{-/-} mice mount an efficient Th1 response, evident by IL-12 production, but fail to control the parasite replication that is associated with lower IFN- γ production in the lesion compared with CXCR3^{+/+} mice [50].

Visceral leishmaniasis

In VL, some chemokines and chemokine receptors have a role in the development of the Th1 response because their deletion influences IFN- γ production by T cells. Following the ligation of T cell receptors in *L. donovani* infection, IFN- γ is produced, inducing macrophage activation and the killing of parasites. *L. donovani*-infected mice lacking CCR5 or MIP-1 α (a ligand for CCR5) demonstrate a low antigen-specific IFN- γ response during the early phases of infection [51]. This defective response is transient because it is restored during chronic infection and it correlates with enhanced control of parasite replication. In this system, however, CCR5 and MIP-1 α are not essential for the containment of murine infection.

Chemokines also seem to be implicated in T cell amplification of the inflammatory response, an important step for protective host defense in VL. *L. donovani*-infected mice undergo a rapid hepatic accumulation of MIP-1 α , CCL2 and CXCL10 after infection [52]. However, only CXCL10 expression, amplified by T cells, remains high during the late phase, and this is essential to enable liver granuloma formation and the inflammatory response. Monocytic cells attracted by MIP-1 α and CCL2, and following IFN- γ stimulation, could be the source of Th1-mobilizing chemokines such as CXCL10 [10]. Unlike liver cells, spleen cells from *Leishmania infantum*-infected mice produce both Th1- and Th2-type cytokines, with the Th2-type response being dominant. This is compatible with the sustained expression of CCL2 rather than CXCL10, thereby showing that there is an influx of macrophages rather than T cells in the spleen [53] (Figure 3). This explains, in part, why the liver usually controls the infection, whereas parasites persist in the spleen [54].

Macrophage activation and parasite killing

In leishmaniasis, some chemokines such as CCL2 can activate macrophages that participate in reducing parasite numbers [15,38]; these chemokines also induce antileishmanial activity in both *L. donovani*-infected and *L. major*-infected human macrophages [13,38]. CCL2 and MIP-1 α can induce leishmanicidal ability *in vitro* in *L. infantum*-infected human macrophages and can control the intracellular growth and multiplication of *L. donovani* via a nitric oxide-mediated regulatory mechanism [55].

Chemokines and parasite virulence

In addition to other factors, the virulence of *Leishmania* seems to be linked to the early modulation of chemokine expression in the host (Table 1). Some *Leishmania* strains might evade host immune responses by preventing the early production of cytokines, chemokines and chemokine receptors, and thus impairing antigen-specific Th1 cell development. Mice infected with *Leishmania amazonensis* had delayed and reduced MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5, MIP-2,

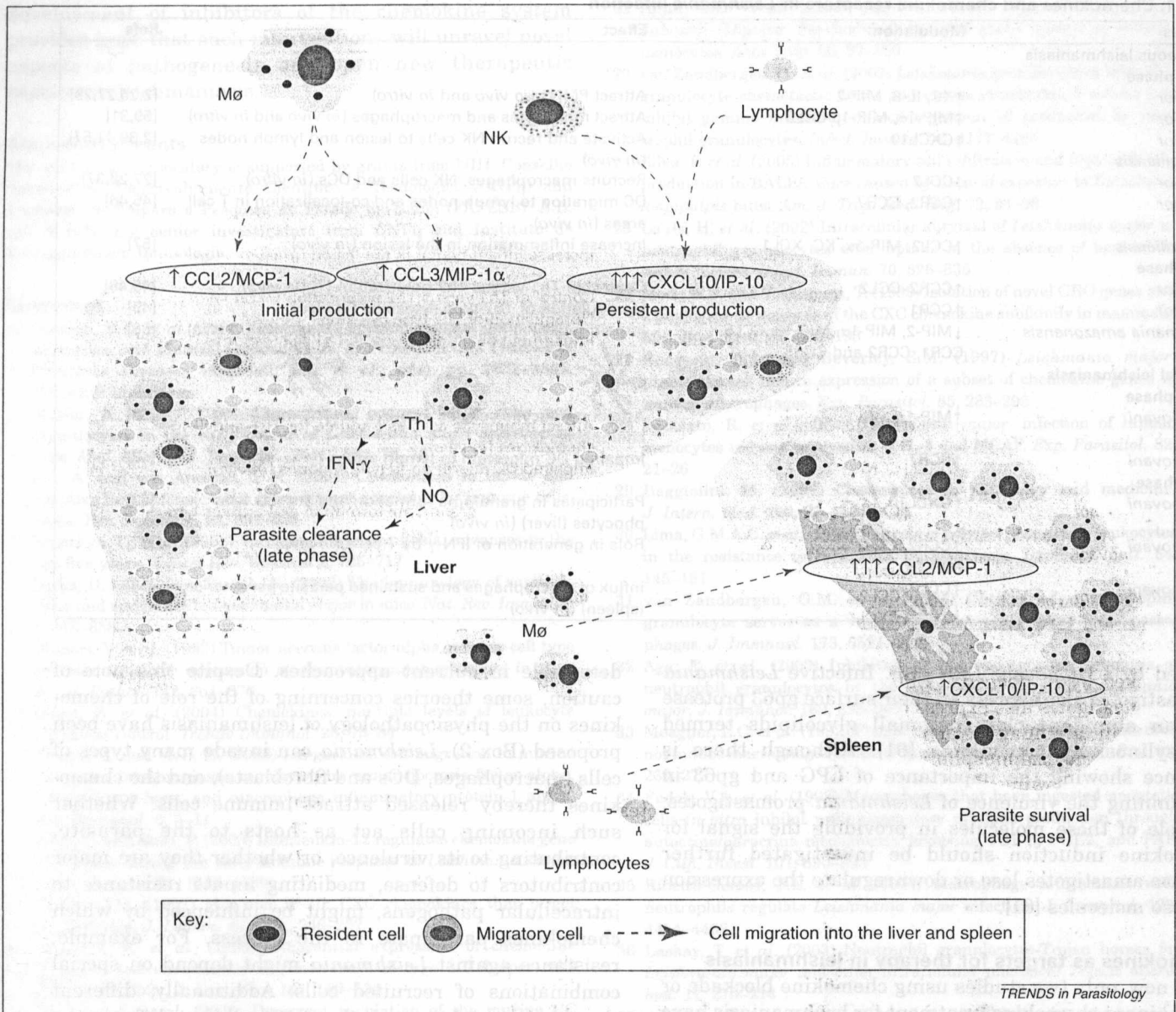


Figure 3. Role of chemokines in visceral leishmaniasis. After *Leishmania* infection, a rapid hepatic accumulation of CCL2, MIP-1 α and CXCL10 is seen. The CXCL10 expression remains high over time postinfection and this attracts more Th1 cells than macrophages to liver, resulting in hepatic parasite control. By contrast, in the spleen, a consistent expression of CCL2 rather than CXCL10 is seen, leading to an influx of macrophages rather than T cells, with a dominance of Th2 cytokines and sustained parasite persistence.

CCR1, CCR2 and CCR5 expression in the early stages of infection, compared with *L. major*-infected mice. These alterations were accompanied by reduced responsiveness of T cells [56]. Recently, it has been shown that lesions from BALB/c mice caused by a more pathogenic *L. braziliensis* strain have a higher expression of CCL2, MIP-1 α , KC, CCL11 (also known as eotaxin), XCL1 and their respective receptors when compared with lesions caused by a less pathogenic *L. braziliensis* strain [57]. This higher expression of chemokines correlates with recruitment of more leukocytes to the lesions, resulting in the increased inflammation observed in pathogenic *L. braziliensis*-infected mice. However, studies performed with murine macrophages show that the induction of chemokines upon infection with *Leishmania* is dependent on parasite virulence; the magnitude of CCL2 and KC expression is higher with avirulent than with virulent

strains of *L. major* [27]. The differences in CCL2 expression reported here might be related to the *Leishmania* strain used (*L. major* versus *L. braziliensis*), the kinetics of infection (early versus late infection) and the experimental system used (*in vitro* versus *in vivo*).

The parasite lipophosphoglycan (LPG), a major surface molecule that binds to macrophage surface receptors, seems to be involved in modulating the signal for chemokine induction. *L. donovani* LPG alters the migration of monocytes by decreasing the expression of adhesion molecules and inhibiting the induction and release of CCL2 [58]. Indeed, the expression of the genes encoding CCL5, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL10 and CCL2 is more strongly upregulated in the air pouch lining of viscerotropic *L. donovani*-infected animals than in that of dermatropic *L. major*-infected animals [59], suggesting that leukocyte transendothelial migration could be

Table 1. Chemokines and chemokine receptors in *Leishmania* infection

Species	Modulation	Effect	Refs
Cutaneous leishmaniasis			
Initial phase			
<i>L. major</i>	↑KC, IL-8, MIP-2	Attract PMNs (<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>)	[2,25,27,28]
<i>L. major</i>	↑MIP-1 α , MIP-1 β CCL5	Attract monocytes and macrophages (<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>)	[59,31]
<i>L. major</i>	↑CXCL10	Activate and recruit NK cells to lesion and lymph nodes (<i>in vivo</i>)	[2,39,41,57]
<i>L. braziliensis</i>			
<i>L. major</i>	↑CCL2	Recruits macrophages, NK cells and DCs (<i>in vitro</i>)	[27,28,37]
<i>L. major</i>	↑CCR2, CCR7	DC migration to lymph nodes and co-localization in T cell areas (<i>in vivo</i>)	[45,46]
<i>L. braziliensis</i>	↑CCL2, MIP-1 α , KC, XCL1	Increase inflammation in the lesion (<i>in vivo</i>)	[57]
Late phase			
<i>L. major</i>	↑CCR2-CCL2	Control of Th1 versus Th2 polarization (?) (<i>in vivo</i>)	[45,48]
<i>L. major</i>	↑CCR1	Upregulation of Th2 type cytokines (<i>in vivo</i>)	[49]
<i>Leishmania amazonensis</i>	↓MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5, CCR1, CCR2 and CCR5	Impairment of antigen-specific Th1 cell response (<i>in vivo</i>)	[56]
Visceral leishmaniasis			
Initial phase			
<i>L. donovani</i>	↑MIP-1 α , CCL2	Attract monocytic cells as a source for Th1-mobilizing chemokines (<i>in vivo</i>)	[52]
<i>L. donovani</i>	↓CCR7	Impaired DC migration to lymph nodes (<i>in vivo</i>)	[47]
Late phase			
<i>L. donovani</i>	↑CXCL10	Participates in granuloma formation and attracts lymphocytes (liver) (<i>in vivo</i>)	[52]
<i>L. donovani</i>	↑CCR2, CCR5 MIP-1 α	Role in generation of IFN- γ by T cells (<i>in vivo</i>)	[51]
<i>L. donovani</i>	↑CCL2 ↓CXCL10	influx of macrophages and sustained parasite persistence (spleen) (<i>in vivo</i>)	[53]

blocked by *L. donovani* LPG [60]. Infective *Leishmania* promastigotes also express on their surface gp63 protease and an abundant class of small glycolipids termed glycosylinositolphospholipids [61]. Although there is evidence showing the importance of LPG and gp63 in determining the virulence of *Leishmania* promastigotes, the role of these molecules in providing the signal for chemokine induction should be investigated further because amastigotes lose or downregulate the expression of these molecules [61].

Chemokines as targets for therapy in leishmaniasis

Until now, only two studies using chemokine blockade or recombinant chemokine treatment for leishmaniasis have been reported. The administration of recombinant mouse CXCL10 to susceptible BALB/c mice significantly enhanced NK cell cytotoxic activity and resistance against *L. major*, indicating that CXCL10 might contribute to promoting the development of a protective immune response [41]. Treatment with Met-RANTES (a functional antagonist of CCR1 and CCR5) or anti-CCL5 rendered C57BL/6 mice more susceptible to *L. major*, skewing the immune response towards Th2 [62]. Whether chemokines can be exploited therapeutically to limit the extent of inflammation, and whether this would be beneficial in leishmaniasis, is uncertain. The feasibility of these mediators for the treatment of inflammatory diseases will become clearer as a more complete understanding of the biology of chemokines emerges.

Concluding remarks

Studies of leishmaniasis reinforce the notion of redundancy in chemokine action; however, to prove this concept, *in vivo* inhibition of certain chemokines will need to be achieved because subtle *in vivo* regulation might not be

detectable in current approaches. Despite this note of caution, some theories concerning of the role of chemokines on the physiopathology of leishmaniasis have been proposed (Box 2). *Leishmania* can invade many types of cells (macrophages, DCs and fibroblasts), and the chemokines thereby released attract immune cells. Whether such incoming cells act as hosts to the parasite, contributing to its virulence, or whether they are major contributors to defense, mediating innate resistance to intracellular pathogens, might be influenced by which chemokines participate in the process. For example, resistance against *Leishmania* might depend on special combinations of recruited cells. Additionally, different chemokines might recruit the same cells but differ in the state of activation they induce in them. Even though much less is known concerning the involvement of chemokines in protozoan diseases compared with viral diseases, it is clear that chemokines are of paramount importance in the pathophysiology of leishmaniasis. It is likely that the concerted and timely actions of several chemokines and chemokine receptors are relevant in this regard. The

Box 2. Future challenges regarding chemokines in *Leishmania* infection

- Explore immunopathogenesis through the use of inhibitors of the chemokine system
- Investigate the role of chemokines in inducing different stages of cell activation in cells which have been recruited early postinfection
- Understand the role of distinct parasite strains or parasite stages (e.g. amastigotes) in altering host chemokine expression
- Search for and test key chemokines which might be useful in vaccination against leishmaniasis
- Identify the target chemokines to block to limit tissue damage in the hyperergic forms of leishmaniasis

development of inhibitors of the chemokine system provides hope that such interventions will unravel novel aspects of pathogenesis and open new therapeutic avenues in leishmaniasis.

Acknowledgements

The work in our laboratory is supported by grants from NIH, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). A.B. and M.B.-N. are senior investigators from CNPq and Instituto de Investigação em Imunologia.

References

- Pearson, R.D. *et al.* (2000) *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell, G.L. *et al.*, eds), pp. 2832–2845, Churchill Livingstone
- Muller, K. *et al.* (2001) Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 190, 73–76
- Rot, A. and von Andrian, U.H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 891–928
- Brodskyn, C. *et al.* (2003) Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev. Vaccines* 2, 705–717
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845–858
- Ohmori, Y. *et al.* (1993) Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 142, 861–870
- Moser, B. *et al.* (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25, 75–84
- Arnoldi, J. and Moll, H. (1998) Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor α , interleukin-1 β , and macrophage inflammatory protein-1 α . *Dev. Immunol.* 6, 3–11
- Zaph, C. and Scott, P. (2003) Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 71, 1587–1589
- Farber, J.M. (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 61, 246–257
- Bonecchi, R. *et al.* (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187, 129–134
- Orlofsky, A. *et al.* (2000) Divergent regulation of the murine CC chemokine C10 by Th(1) and Th(2) cytokines. *Cytokine* 12, 220–228
- Ritter, U. and Moll, H. (2000) Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. *Eur. J. Immunol.* 30, 3111–3120
- Kucharzik, T. *et al.* (1998) β -4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 152–157
- Muzio, M. *et al.* (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 5998–6004
- Ross, G.D. (2000) Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Crit. Rev. Immunol.* 20, 197–222
- Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927–930
- Spellberg, B. (2000) The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci.* 67, 477–502
- Antoniazzi, S. *et al.* (2004) Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72, 5168–5174
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453–483
- Zer, R. *et al.* (2001) Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* 31, 810–814
- Anjili, C.O. *et al.* (1995) The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop.* 60, 97–100
- van Zandbergen, G. *et al.* (2002) *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect. Immun.* 70, 4177–4184
- Silva, F. *et al.* (2005) Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 94–98
- Laufs, H. *et al.* (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.* 70, 826–835
- Modi, W.S. and Yoshimura, T. (1999) Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 16, 180–193
- Racoon, E.L. and Beverley, S.M. (1997) *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* 85, 283–295
- Badolato, R. *et al.* (1996) *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* 82, 21–26
- Baggiolini, M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250, 91–104
- Lima, G.M.A.C. *et al.* (1998) The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 64, 145–151
- van Zandbergen, G.M. *et al.* (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* 173, 6521–6525
- Aga, E. *et al.* (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 169, 898–905
- Meagher, L.C. *et al.* (1992) Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J. Leukoc. Biol.* 52, 269–273
- Padok, V.A. *et al.* (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101, 890–898
- Ribeiro-Gomes, F.L. *et al.* (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 172, 4454–4462
- Laskay, T. *et al.* (2003) Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11, 210–214
- Allavena, P. *et al.* (1994) Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24, 3233–3236
- Ritter, U. *et al.* (1996) Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173, 699–709
- Laskay, T. *et al.* (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 25, 2220–2227
- Indiani de Oliveira, C. (2004) *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 6, 977–984
- Vester, B. *et al.* (1999) Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 67, 3155–3159
- Martin-Fontecha, A. *et al.* (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for Th1 priming. *Nat. Immunol.* 5, 1260–1265
- Satoskar, A.R. *et al.* (1999) Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 162, 6747–6754
- Moll, H. (2000) The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 479, 163–173
- Sato, N. *et al.* (2000) CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cell: absence of CCR2 shifts the *Leishmania*

- major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J. Exp. Med.* 192, 205–218
- 46 Forster, R. *et al.* (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33
- 47 Ato, M. *et al.* (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to development of visceral leishmaniasis. *Nat. Immunol.* 3, 1185–1191
- 48 Gu, L. *et al.* (2000) Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404, 407–411
- 49 Rodriguez-Sosa, M. *et al.* (2003) CC chemokine receptor 1 enhances susceptibility to *Leishmania major* during early phase of infection. *Immunol. Cell Biol.* 81, 114–120
- 50 Rosas, L.E. *et al.* (2005) CXCR3^{-/-} mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* 35, 515–523
- 51 Sato, N. *et al.* (1999) Defects in the generation of IFN- γ are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1- α -, or CCR2-deficient mice. *J. Immunol.* 163, 5519–5525
- 52 Cotterell, S.E. *et al.* (1999) *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a cell-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 29, 203–214
- 53 Rousseau, D. *et al.* (2001) Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur. Cytokine Netw.* 12, 340–347
- 54 Kaye, P.M. *et al.* (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol. Rev.* 201, 239–253
- 55 Bhattacharyya, S. *et al.* (2002) Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J. Infect. Dis.* 185, 1704–1708
- 56 Ji, J. *et al.* (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 71, 4278–4288
- 57 Teixeira, M.J. *et al.* (2005) Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different pace of chemokine expression patterns. *Infect. Immun.* 73, 1191–1195
- 58 Sticherling, M. *et al.* (1995) Detection of the chemokine RANTES in cytokine-stimulated human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 105, 585–591
- 59 Matte, C. and Olivier, M. (2002) *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J. Infect. Dis.* 185, 673–681
- 60 Lo, S.K. *et al.* (1998) *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol.* 160, 1857–1865
- 61 Matlashewski, G. (2001) *Leishmania* infection and virulence. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 190, 37–42
- 62 Santiago Had, C. *et al.* (2004) Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72, 4918–4923
- 63 Mahalingam, S. and Karupiah, G. (1999) Chemokines and chemokines receptors in infectious diseases. *Immunol. Cell Biol.* 77, 469–475
- 64 Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121–127