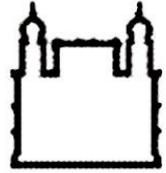




**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**PAPEL DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS COMO MARCADOR  
DE EXPOSIÇÃO E SEU EFEITO NA PROTEÇÃO CONTRA  
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

**KATRINE BEZERRA CAVALCANTI**

**Salvador – Bahia**

**2016**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**PAPEL DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS COMO MARCADOR  
DE EXPOSIÇÃO E SEU EFEITO NA PROTEÇÃO CONTRA  
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

**KATRINE BEZERRA CAVALCANTI**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aldina Barral

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
graduação em Patologia para  
obtenção parcial do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2016**

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

C376p Cavalcanti, Katrine Bezerra.  
Papel da saliva de flebotomos como marcador de exposição e seu efeito na  
proteção contra *Leishmania braziliensis*. / Katrine Bezerra Cavalcanti. - 2016.  
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldina Barral, Laboratório de Imunopatologia.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação  
Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016.

1. Flebótomos. 2. *Lutzomyia whitmani*. 3. Saliva. 4. Vacinação. I. Título.

CDU 595.77:616.993.161

Título da Tese: "PAPEL DA SALIVA DE FLEBÓTOMO COMO MARCADOR DE EXPOSIÇÃO E SEU EFEITO NA PROTEÇÃO CONTRA LEISHMANIA BRAZILIENSIS."

KATRINE BEZERRA CAVALCANTI

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 14 de outubro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA



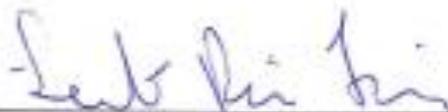
Dr. Sinval Pinto Brandão Filho  
Pesquisador  
Fiocruz Pernambuco



Dra. Camila Alexandrina Viana de  
Figueirêdo  
Professora Associada I  
UFBA



Dr. Ricardo Riccio Oliveira  
Pesquisador  
IGM/Fiocruz



Dr. Leonardo Paiva Farias  
Pesquisador  
IGM/Fiocruz



Dra. Aldina Maria Prado Barral  
Pesquisadora Titular  
IGM/Fiocruz

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

CNPq

CAPES

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho, por me  
motivar todos os dias a ir  
além.

## **AGRADECIMENTOS**

À **Drª Aldina Barral** pela aceitação e comprometimento para com este trabalho. Por todos os ensinamentos, incentivos e oportunidades, o meu muito obrigada!

À **Dr. Manoel Barral-Netto** pelas sugestões sempre muito relevantes e pertinentes.

À **Dr. José Carlos Miranda** por todo o apoio nos trabalhos de campo, pelo carinho, fé e amizade a mim destinados.

À **Drª Camila Indiani** pela constante disposição em contribuir nas orientações durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos **Dr Régis Brandim** e **Drª Clarissa Teixeira** pelas orientações, acompanhamento e discussões essenciais à grande parte do desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais **funcionários LIP/LIMI** pelos ensinamentos e colaboração.

À **Juqueline Cristal** e **Augusto Carvalho** pela colaboração nos experimentos sorológicos deste trabalho.

Aos meus **pais** e **irmão** pelo incentivo e conforto nas horas mais difíceis.

Ao meu esposo, **Samuel do Nascimento**, por todo o amor, carinho, apoio e companheirismo dedicados a mim.

Ao **Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ** e à **Universidade Federal da Bahia**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Patologia**, às **secretárias do PPGPat**, aos **funcionários da biblioteca** e a todos os **professores** e **funcionários** do **CPqGM/UFBA**.

CAVALCANTI, Katrine Bezerra. Papel da saliva de flebótomos como marcador de exposição e seu efeito na proteção contra *Leishmania braziliensis*. 98 f. ils. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma importante patologia causada pelo protozoário *Leishmania braziliensis*, o principal agente etiológico nas Américas. Esse parasita é transmitido aos hospedeiros através durante a alimentação sanguínea do vetor. Comumente encontrados em área endêmica de LT, os flebótomos *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani*, foram incriminados como vetores da *L. braziliensis*. Apesar dos amplos estudos acerca da saliva dos vetores e do papel dos flebótomos na transmissão, muito pouco se sabe sobre o envolvimento de *L. whitmani* na LT. **OBJETIVO.** Este trabalho visou avaliar o papel de *L. whitmani* em etapas críticas da transmissão da *L. braziliensis*, como a avaliação do vetor na área endêmica, a exposição de animais no peridomicílio humano ao flebótomo e o papel da saliva do vetor no estabelecimento da *L. braziliensis* em infecção experimental murina. **MATERIAIS E MÉTODOS.** Para a obtenção dos dados, foram realizados testes sorológicos como ELISA e Western blot no monitoramento das galinhas da área endêmica e nos camundongos mantidos em laboratório. Também foram realizadas coletas e identificação dos flebótomos da área endêmica e ensaios de estimulação celular para análise da resposta celular dos camundongos. **RESULTADOS.** Os resultados mostraram que galinhas no peridomicílio humano produziram anticorpos anti-saliva de *L. whitmani*, apresentando reconhecimento específico à saliva desta espécie. Também foi observado que a imunização de camundongos com saliva de *L. whitmani* é capaz de induzir proteção contra a infecção por *L. braziliensis* em camundongos imunizados. **CONCLUSÃO.** Estudos envolvendo a participação de importantes vetores em área endêmica são fundamentais para o entendimento da dinâmica da cadeia epidemiológica e futuros estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a doença.

**Palavras-chave:** Flebótomos, *Lutzomyia whitmani*, saliva, resposta imune, vacinação.

CAVALCANTI, Katrine Bezerra. The role of sandflies saliva as exposure biomarker and its effective protection against *Leishmania braziliensis*. 98 f. ils. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Cutaneous Leishmaniasis (CL) presents an important public health problem, mostly caused by *Leishmania braziliensis*, the main agent in the Americas. This parasite is transmitted to the vertebrate hosts through the insect vector's bite during females blood feeding. Mostly found in endemic area of CL, the sandflies *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* have been incriminated as vectors of *Leishmania*. Despite extensive studies of vectors saliva and the role of sandflies in the transmission of *Leishmania*, there is no studies about the involvement of *L. whitmani* in CL. **AIM.** This study was developed to evaluate the role of *L. whitmani* in critical steps of the *L. braziliensis* transmission, such as the evaluation of the vector presence in an endemic area, the exposure of animals in the human habitat to this sandfly and the role of vector saliva in the establishment of *L. braziliensis* infection in murine experimental model. **MATERIALS AND METHODS.** For serologics datas was used tests as ELISA and Western blot using chicken and mice sera. For cytokine quantification was performed stimulation of cell culture from mice blood. **RESULTS.** Our data showed that chickens placed in the human habitat produced anti-saliva antibodies to *L. whitmani*, with specific recognition to the salivary components. It was also observed that mice immunization with *L. whitmani* saliva is able to induce protection against infection by *L. braziliensis* in previously immunized mice. **CONCLUSION.** Studies involving the participation of important vectors sandflies of endemic area is an essential tool to understanding the dynamics of the epidemiological chain and for future studies involving the development of vaccines against the disease.

**Keywords:** Sandflies, *Lutzomyia whitmani*, saliva, immune response, vaccination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

- Figura 1. Distribuição mensal de *L. intermedia*, *L. whitmani* e *L. migonei* e precipitação pluviométrica na região de Corte de Pedra/BA 42
- Figura 2. Soroconversão de galinhas imunizadas com o SGS de *L. intermedia* e *L. whitmani*. 43
- Figura 3. Soroconversão para *L. intermedia* em galinhas expostas em área endêmica para LTA. 44
- Figura 4. Soroconversão de galinhas expostas à picadas de *L. whitmani* em área endêmica para LTA. 45
- Figura 5. Perfil de proteínas totais da saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*. 46
- Figura 6. Proteínas salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani* reconhecidas por soros de galinhas experimentalmente imunizadas e galinhas expostas às picadas dos vetores. 47
- Figura 7. Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva da *L. intermedia* e *L. whitmani* entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos. 48
- Figura 8. Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva de *L. intermedia* por galinhas imunizadas com SGS de *L. whitmani* e da saliva de *L. whitmani* por galinhas imunizadas com SGS de *L. intermedia*. 49
- Figura 9. Avaliação do efeito da saliva de *Lutzomyia whitmani* inoculada juntamente com *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/c. 57

- Figura 10. Resposta imune humoral anti-saliva de *Lutzomyia whitmani*. 58
- Figura 11. Medida da espessura e histologia das orelhas dos camundongos BALB/c imunizados com saliva de *Lutzomyia whitmani*. (A) 59
- Figura 12. Produção de citocinas pelo linfonodo e baço após estímulo com saliva. 60
- Figura 13. Frequência e número absoluto da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos T CD4+ no linfonodo após imunização com *Lutzomyia whitmani* SGS. 61
- Figura 14. Frequência e número absoluto da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos T CD8+ no linfonodo após imunização com *Lutzomyia whitmani* SGS. 62
- Figura 15. Efeito da saliva de *L. whitmani* no curso da infecção por *L. braziliensis*. 63
- Figura 16. Dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c imunizados com SGS de *L. whitmani* e posteriormente desafiados com *L. braziliensis*+SGS. 64
- Figura 17. Memória imunológica gerada pela saliva de *Lutzomyia whitmani* controla a infecção por *Leishmania braziliensis*. 65

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1. Frequência relativa de espécies de flebótomos encontrados no distrito de Corte de Pedra/BA, no período de maio/2012 a janeiro/2013. 41
- Tabela 2. Ocorrência de flebótomos nos ambientes intradomiliar e peridomiciliar coletados em residências do distrito de Corte de Pedra/BA. 42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>µg/mL</b>	Microgramas por mililitros
<b>BA</b>	Estado da Bahia
<b>BALB/c</b>	Linhagem de camundongo albino
<b>BSA</b>	“Bovine Serum Albumin”
<b>CDC</b>	“Center for Diseases Control”
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CEPLAC</b>	Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética para Uso de Animais
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DTH</b>	Hipersensibilidade do tipo tardio
<b>ELISA</b>	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>km<sup>2</sup></b>	Kilômetros quadrados
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LD</b>	Leishmaniose Disseminada
<b>LIP</b>	Laboratório de Imunoparasitologia
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucosa
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>m</b>	Metros

<b>Mm</b>	Milímetros
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PpSP44</b>	Proteína salivar de flebotomos
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SGS</b>	Sonicado de glândula salivar
<b>SLA</b>	Antígeno solúvel de Leishmania
<b>SP15</b>	Proteína salivar de flebotomos
<b>SVS/MS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
<b>T CD</b>	Células T com marcação CD
<b>Th</b>	Células T helper
<b>U/mL</b>	Unidades por mililitros
<b>WNV</b>	West Nile Virus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1	LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.2	VETORES DA LTA	18
1.3	O PAPEL DA SALIVA DO VETOR	21
1.3.1	Efeito Imunomodulador da Saliva de Flebótomos e seu uso como Marcador de Exposição	22
1.3.2	Efeito da Saliva de Flebótomos na Infecção por <i>Leishmania</i>	24
1.4	MONITORAMENTO DE ÁREAS ENDÊMICAS: O USO DE ANIMAIS SENTINELA	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b>	34
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	34
	<b>CAPÍTULO 1 – SOROCONVERSÃO DE GALINHAS PARA ANTICORPOS SALIVARES DE <i>L. whitmani</i>: POSSIBILIDADE DE USO COMO SENTINELA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR</b>	35
1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b>	35
2.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	35
2.2	ÁREA DO ESTUDO	36
2.3	CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBÓTOMOS E OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES	36
2.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
2.5	IMUNIZAÇÃO DAS GALINHAS COM SGS DE <i>L. intermedia</i> E <i>L. whitmani</i> PARA CONTROLE POSITIVO DOS TESTES SOROLÓGICOS	38
2.6	EXPOSIÇÃO DAS GALINHAS EM ÁREA ENDÊMICA	38

2.7	SOROLOGIA ANTI-SGS DE <i>L. intermedia</i> E <i>L. whitmani</i>	39
2.8	DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS SALIVARES DE <i>L. intermedia</i> E <i>L. whitmani</i> COM SOROS DE GALINHAS PROVENIENTES DE UMA ÁREA ENDÊMICA	39
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
3.1	CAPTURA DE FLEBÓTOMOS	41
3.2	SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPERIMENTALMENTE IMUNIZADAS COM SGS DE <i>L. intermedia</i> OU <i>L. whitmani</i>	43
3.3	SOROCONVERSÃO DE GALINHAS NATURALMENTE EXPOSTAS ÀS PICADAS DE <i>L. intermedia</i> E <i>L. whitmani</i> EM ÁREA ENDÊMICA PARA LTA	44
3.4	ESPECIFICIDADE NO RECONHECIMENTO DOS COMPONENTES SALIVARES DE <i>L. intermedia</i> E <i>L. whitmani</i>	45
	<b>CAPÍTULO 2 – RESPOSTA IMUNE PARA SALIVA DE <i>L. whitmani</i> PROTEGE CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>L. braziliensis</i></b>	50
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	50
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	50
3.2.	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C	51
3.3.	CULTURA DE PARASITAS	51
3.4.	MEDIDA DAS LESÕES E CARGA PARASITÁRIA	52
3.5.	SOROLOGIA ANTI-SGS DE <i>L. whitmani</i> DOS CAMUNDONGOS	53
3.6.	ANÁLISES HISTOLÓGICAS	54
3.7	AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	54
3.8	DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	55
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	56
4.1	EFEITO DA SALIVA DE <i>L. whitmani</i> NA CO-INOCULAÇÃO COM <i>Leishmania braziliensis</i>	56
4.2	RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM SALIVA DE <i>L. whitmani</i>	58
4.3	RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM SALIVA DE <i>L. whitmani</i>	59
4.4	IMUNIDADE GERADA PELA SALIVA DE <i>L. whitmani</i> CONFERE PROTEÇÃO CONTRA <i>L. braziliensis</i>	62
4.5	MEMÓRIA IMUNOLÓGICA GERADA PELA SALIVA DE <i>L. whitmani</i> CONFERE PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i>	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	77
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representam um complexo de doenças com importante diversidade epidemiológica e espectro clínico. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano.

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo, ao se alimentar em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere macrófagos parasitados com amastigotas de *Leishmania*. No interior do trato digestivo do inseto os macrófagos se rompem e as formas amastigotas livres se transformam em promastigotas (metaciclogênese) que serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo posterior (ALEXANDER e USMA, 1994; SCHLEIN, 1993).

Existem aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebótomos, que são capazes de infectar seres humanos, cada uma causando diferente espectro clínico. As distintas formas clínicas predominantes são: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). Também conhecida como calazar, a LV é uma forma de doença grave, sistêmica, consistindo em uma infecção generalizada que acomete o sistema reticuloendotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos e pode apresentar elevada taxa de mortalidade quando não tratada (revisado em BARRAL-NETTO, et al., 1995). A *Leishmania (Leishmania) infantum* é o agente etiológico da LV no continente Americano, enquanto que que a *Leishmania (Leishmania) donovani* é o principal responsável pelos casos na África e Índia. A LT apresenta um espectro de manifestações clínicas causadas por uma variedade de espécies, sendo os principais agentes etiológicos nas Américas a *Leishmania braziliensis*, a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*, enquanto que no Velho Mundo, as espécies responsáveis por esta manifestação da doença são, entre

outras, a *Leishmania tropica*, a *Leishmania major* e a *Leishmania aethiopica*. As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania* até o estado imunológico do hospedeiro humano (PEARSON e SOUZA, 1996). A infecção por *L. braziliensis* (o principal agente etiológico no Brasil) resulta em três formas clínicas distintas: a Leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada por uma ou mais úlceras tegumentares bem delimitadas de bordas elevadas e fundo granuloso (LLANOS CUENTAS *et al.*, 1984). A evolução clínica da LC é descrita primeiramente com o aparecimento de uma linfadenopatia seguida pela formação de uma pápula e enfim o aparecimento da úlcera (BARRAL *et al.*, 1992; BARRAL *et al.*, 1995; GONTIJO e CARVALHO, 2003). A Leishmaniose Mucosa (LM) é definida por lesões que atingem a mucosa nasal podendo também envolver boca, laringe e faringe. E, por sua vez, a Leishmaniose Disseminada (LD), caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões papulosas, acneiformes e ulceradas em duas ou mais áreas distintas do corpo (TURETZ *et al.*, 2002).

A LT constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. No Continente Americano, há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção apenas do Chile e Uruguai. Devido a ampla distribuição geográfica, alta incidência, alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades no ser humano com grande repercussão psicossocial no indivíduo, a OMS (Organização Mundial de Saúde) passou a incluir essa enfermidade entre as seis doenças infecto-parasitárias consideradas prioritárias no controle de saúde pública pelo órgão ([www.who.int/tdr/diseases/leish/](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/), SVS/MS 2010).

No Brasil, nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, que era inicialmente considerada zoonoses de animais silvestres, acometendo ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a surgir em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Observa-se a existência de três perfis epidemiológicos: a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonoses

de animais silvestres); b) Ocupacional ou de lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para a construção de estradas, extração da madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo (antropozoonose); e c) Rural ou periurbana – áreas de colonização (zoonoses de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (SVS/MS 2010). As populações rurais do Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as mais afetadas. As regiões Norte e Nordeste são responsáveis por cerca de 75% dos casos registrados no país (MARSDEN e JONES, 1985; SILVEIRA, LAINSON e CORBETT, 2004).

## 1.2 VETORES DA LTA

Os vetores transmissores das leishmanioses são insetos holometábolos, diminutos, bastante pilosos, pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, únicas responsáveis pela transmissão da *Leishmania* (MARTINS, WILLIAMS & FALCÃO, 1978). São geralmente encontrados abrigados em locais úmidos e escuros, com temperaturas moderadas. Esses dípteros estão distribuídos em dois gêneros: a) *Phlebotomus* – vetores na Europa, Ásia e África e b) *Lutzomyia* – vetores das leishmanioses nas Américas (YOUNG e DUNCAN, 1994).

Os flebótomos estão adaptados a viverem em abrigos escuros, em condições de alta umidade e de temperaturas moderadas. A maioria das espécies está associada às florestas de vários tipos ou vivem em cavernas ou cavidades entre pedras, mas podem habitar domicílios e anexos ou mesmo invadi-los, em busca da fonte de alimentação sanguínea. Esses insetos possuem hábitos crepusculares no qual realizam a hematofagia, embora nas florestas algumas espécies possuam também hábitos matutinos e vespertinos. A maioria dos flebótomos é silvestre e ataca o homem e os animais domésticos quando as habitações estão muito próximas à mata, pois possuem um reduzido poder de voo. Algumas espécies são

consideradas ecléticas quanto ao abrigo e devido às modificações do habitat pelo homem, se adaptam ao domicílio e peridomicílio (FORATTINI, 1973).

Esses dípteros apresentam o aparelho bucal do tipo picador-sugador. Ambos os sexos utilizam basicamente carboidratos vegetais como sua principal fonte de energia (ALEXANDER e USMA, 1994). As fêmeas são hematófagas e necessitam das proteínas presentes no sangue para maturação de seus folículos ovarianos. Durante o repasto sanguíneo, elas realizam várias tentativas de sondagem e sucção, até encontrarem o local adequado para introduzir a probóscide (FORATTINI *et al.*, 1973).

As espécies vetoras das diferentes formas clínicas da LTA no Brasil, variam dependendo da região, sendo as principais: *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lutzomyia migonei* (França, 1920), *Lutzomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), *Lutzomyia wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971), *Lutzomyia ubiquitalis* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia complexa* (Mangabeira, 1941) e *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942).

*L. intermedia* tem sido prevalente em áreas onde a transmissão de LTA é evidente, como na Bahia (MIRANDA *et al.*, 2002). A sua prevalência em determinados focos, em diferentes regiões, está associada ao encontro de espécimes naturalmente infectadas por espécies de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Viannia* (MENESES *et al.*, 2005). Portanto, esta espécie é considerada como um dos principais vetores responsáveis pela transmissão de leishmanioses no país (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005). Essa espécie apresenta relação com ambientes alterados (CARDOSO *et al.*, 2009), se mostrando bastante eclética quanto às fontes alimentares, podendo ser antropofílica e também facilmente atraída por outros animais domésticos (LUTZ e NEIVA, 1912; FORATTINI, 1953; RANGEL *et al.*, 1990) que poderiam servir de reservatório e participariam assim do ciclo de transmissão. Esse flebótomo apresenta grande capacidade adaptativa às matas residuais e aos ambientes abertos ou domiciliares, sendo que as matas residuais seriam importantes na domiciliação desta espécie. O homem tem adquirido a doença principalmente nos locais onde ocorre devastação de florestas com mudanças drásticas no meio ambiente. Nas áreas rurais e periurbanas do Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte, ocorre a presença maciça de *L. intermedia*, o qual tem sido

incriminado como um importante transmissor da *L. braziliensis* no peridomicílio e domicílio (RANGEL *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2002; ANDRADE-FILHO, GALATI e FALCÃO, 2002; DA SILVA e CUNHA, 2007), e portanto, tem sido sugerido uma domiciliação da espécie (revisado em RANGEL e LAINSON, 2009).

*L. whitmani* pode ser considerada uma das mais importantes espécies vetora da *L. braziliensis* nas regiões do Nordeste, Central, Sul e Sudeste brasileiro (AZEVEDO *et al.*, 1990; TEODORO *et al.*, 2003; ALESSI *et al.*, 2009), com certo grau de antropofilia na maioria dos casos (RYAN *et al.*, 1990; QUEIRÓZ *et al.*, 1994). Na região Norte do país, essa espécie também é vetora de *Leishmania shawi* entre animais silvestres e reservatórios (revisado em DA COSTA *et al.*, 2007). Através de estudos de modelagem ecológica de nichos, Peterson & Shaw (2003) observaram que *L. whitmani* poderia ser capaz de tolerar os efeitos das alterações climáticas globais, o que enfatiza o importante papel dessa espécie como vetor da LTA, baseada na sua larga distribuição e associação com humanos no ambiente peridomiciliar. Na Bahia, estudos anteriores mostraram que *L. whitmani* e *L. intermedia* correspondem à quase totalidade de espécies vetores da LTA presentes em área endêmica (MIRANDA *et al.*, 2002). Dessa forma, o presente trabalho foi orientado a analisar os aspectos de resposta imune frente à saliva desse importante e negligenciado vetor.

Devido ao fato de ambas as espécies pertencerem ao subgênero *Nissomyia*, a proximidade morfológica de estruturas situadas na cabeça e no tórax usadas para identificação torna-se muito grande. Dessa forma, é sugerida a observação de caracteres combinados (número de dentes do cibário) e a visualização de filamentos genitais para os machos e as espermatecas para as fêmeas; além de dados morfométricos e a coloração do tórax que permitam-nos realizar a distinção entre essas duas espécies (MARCONDES e BORGES, 2000). Estes flebotomos apresentam grande polimorfismo e variações interpopulacionais e interespecíficas como variações fenotípicas que foram observadas na fórmula palpal, dentes do cibário, cabeça da espermateca e números de anéis das espermatecas (MARCONDES, 1996; MARCONDES, 1997; MARCONDES, 1998).

Dados importantes na literatura tem mostrado que a distribuição e abundância de vetores tem-se alterado durante o decorrer dos anos na região de Corte de

Pedra, no estado da Bahia, como fora inicialmente relatado em 1986, Vexenat e colaboradores, descreveram esta região como uma área de predominância de *L. whitmani*. Posteriormente, Miranda e colaboradores em 2002, demonstraram na área uma frequência relativa de cerca de metade dos vetores capturados pertencentes à *L. intermedia* e metade *L. whitmani*. Esse fenômeno também foi observado em outros estudos anteriores. Em 1993, Teodoro e colaboradores observou em uma área endêmica para LTA no interior do Paraná que *L. migonei* tinha passado a ocupar a segunda posição como espécie mais prevalente ao invés de *L. intermedia* (TEODORO *et al.*, 1991). Essa alternância de posição dominante entre flebótomos também foi observada no Estado do Rio de Janeiro, por Alves e colaboradores em 2008 (dados não publicados) e por Forattini (1960). Acredita-se que alterações climáticas, aumento nas zonas de desmatamento e atividade antrópica possam estar relacionados com alterações nos nichos ecológicos desses vetores permitindo que algumas espécies se desenvolvam mais que outras em determinadas situações.

### 1.3 O PAPEL DA SALIVA DO VETOR

A aquisição de sangue do hospedeiro pelos flebótomos é de extrema importância, uma vez que esses insetos hematófagos necessitam de suplemento de suas demandas nutricionais associadas ao seu crescimento e ao amadurecimento dos folículos ovarianos (CARRERA, 1991; NEVES *et al.*, 2005). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebótomo introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro vertebrado, causando traumas e laceração de pequenos vasos e pequenas hemorragias locais. A picada do inseto exerce na pele uma ação mecânica e enzimática por meio da saliva do flebótomo. Com a picada do inseto e a presença do parasita, mecanismos naturais de defesa do hospedeiro são ativados no local da inoculação, como reações do sistema complemento, ativação de trombina, plaquetas, anticorpos e fagócitos (CHAMPAGNE, 2005), além da vasoconstrição para evitar a perda sanguínea provocada por lesões teciduais (BOWMAN, *et al.*, 1997; SCHOELER e WIKEL, 2001). Por outro lado, a produção de ovos maduros e, por conseguinte, a perpetuação da espécie do vetor depende do sucesso da alimentação sanguínea. Para tal, esses dípteros, bem como outros insetos

hematófagos, evoluíram a fim de produzir saliva que dispõe de um arsenal molecular capaz de neutralizar essas barreiras hemostáticas (RIBEIRO *et al.*, 1994; CHAMPAGNE, 1994; RIBEIRO, 1995; BASANOVA *et al.*, 2002).

A saliva dos flebótomos, ao interferir nas funções hemostáticas, inflamatórias e imunes do hospedeiro provoca alterações fisiológicas importantes favorecendo a transmissão da *Leishmania* na pele do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2005; ROHOUSOVÁ e VOLF, 2006; MENEZES *et al.*, 2008). De certa forma, os flebótomos não atuam simplesmente como disseminadores de parasitas. Avanços nas pesquisas acerca do papel da saliva de flebótomos na transmissão das leishmanioses vem mostrando a existência de uma relação co-evolutiva entre esses vetores e o patógeno por eles transmitido (revisado em ANDRADE *et al.*, 2007). Nas últimas duas décadas, houve um aumento considerável na quantidade de estudos envolvendo a saliva de flebótomos vetores e suas diversas funções e aplicações, que serão explicitadas em tópicos separados a seguir.

### 1.3.1 EFEITO IMUNOMODULADOR DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS E SEU USO COMO MARCADOR DE EXPOSIÇÃO

Contendo diversos agentes farmacológicos com atividade anti-coagulante, anti-agregação plaquetária e/ou vasodilatadora a saliva dos flebótomos tem uma importante função de facilitar a captação do sangue do hospedeiro pelo vetor (CHARLAB *et al.*, 1999; SACKS *et al.*, 2001). Além das funções hemostáticas, a saliva também precisa evadir as respostas imunes inata e adquirida, através de moléculas imunomodulatórias e anti-inflamatórias, capazes de incitar um microambiente favorável para o repasto sanguíneo (revisado em ANDRADE *et al.*, 2007). A saliva de flebótomos possui o mais potente vasodilatador conhecido, o maxadilan (MORO e LERNER, 1997). Além desta função, também foi descrito que o maxadilan inibe a ação de macrófagos (LERNER *et al.*, 1991; TITUS e RIBEIRO, 1988), aumenta o fluxo sanguíneo e acelera o repasto no hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 1989). Além do maxadilan, foi descrito que as glândulas salivares dos flebótomos apresentam um complexo de moléculas, sendo a apirase e as proteínas da família

*yellow* as mais estudadas (RIBEIRO *et al.*, 1989 LENER *et al.*, 1991; 1986; TEIXEIRA *et al.*, 2010 e SHAZIA e READY, 2011). A apirase funciona como um anti-agregante plaquetário e é encontrada nos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (RIBEIRO *et al.*, 1989 e TEIXEIRA *et al.*, 2010). A família de proteínas *yellow* é considerada o mais importante grupo de proteínas presentes na saliva desses insetos. Esta família é a mais abundantemente expressa e a mais estudada atualmente, tendo a função de remoção de mediadores da inflamação e da resposta hemostática (RIBEIRO *et al.*, 2010 e XUEQING XU *et al.*, 2011).

Algumas proteínas salivares imunogênicas são capazes de estimular a produção de anticorpos e têm sido usadas como ferramenta epidemiológica e marcador biológico de exposição a vetores artrópodes, tais como mosquitos, carrapatos e flebotomíneos (LANE *et al.*, 1999; CORNELIE *et al.*, 2007; POINSIGNON *et al.*, 2007; INOKUMA *et al.*, 2000; BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002 e VOLF *et al.*, 2001). Além disso, estudos recentes demonstram que a presença de anticorpos anti-saliva de vetores hematófagos pode ser utilizada como ferramenta para avaliação de infestação de insetos em áreas endêmicas e o consequente monitoramento do risco de transmissão de doenças em humanos e outros hospedeiros (SOUZA *et al.*, 2010 e SCHWARTZ *et al.*, 2010).

Existem diversas evidências a respeito das propriedades imunogênicas dos componentes salivares dos flebotomíneos, sendo a produção de anticorpos contra as diferentes proteínas da saliva uma delas (BELKAID *et al.*, 1998; GOSH e MUKHOPADHYAY *et al.*, 1998; VOLF e ROHOUSOVÁ *et al.*, 2001). Estudos experimentais com camundongos demonstram a presença de anticorpos anti-saliva após exposição destes animais às picadas de flebotomíneos (BELKAID *et al.*, 1998; GHOSH e MUKHOPADHYAY, 1998; VOLF e ROHOUSOVÁ, 2001; SILVA *et al.*, 2005). A presença de anticorpos contra a saliva de flebotomíneos também foi observada em indivíduos de área endêmica para a Leishmaniose Visceral, sendo detectados anticorpos IgG específicos aos componentes salivares do vetor *L. longipalpis* (BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002). Dados da literatura demonstram que os diferentes constituintes proteicos da saliva de flebotomos podem variar de acordo com a diversidade de espécies vetores existentes, sugerindo que a saliva de flebotomos pode apresentar diferentes componentes

salivares imunogênicos (ROHOUSOVÁ e VOLF, 2006). De fato, neste mesmo trabalho foi demonstrado que diferentes hospedeiros (camundongo e homem) expostos a picadas de flebotomíneos produzem anticorpos que reconhecem antígenos espécie-específicos da saliva de *Phlebotomus sergenti* e *Phlebotomus papatasi*, sugerindo que a especificidade antigênica esteja ligada à distância filogenética entre táxons de insetos, e antígenos compartilhados por espécies distintas são frequentes apenas em espécies correlatas (ROHOUSOVA e VOLF, 2006). GOMES e colaboradores em 2002, ao estudar a resposta específica contra componentes totais da saliva de *L. longipalpis*, observaram a frequência de reconhecimento específico para estas proteínas, verificando que soros de crianças de área endêmica para LV são capazes de reconhecer as proteínas salivares de 45, 44, 43 e a de 35 kDa. Estudos epidemiológicos desta natureza, realizados para a identificação das taxas de exposição aos vetores das leishmanioses, buscam, além do uso do sonicado de glândula salivar (SGS) como marcador de exposição ao vetor, a utilização de proteínas salivares isoladas, como por exemplo, as proteínas recombinantes (BARRAL *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2010 e SOUZA *et al.*, 2010). A utilização dessas proteínas recombinantes da saliva em estudos de exposição à picadas de flebotomos passa, então, a apresentar uma vantagem em relação ao uso da saliva total, uma vez que estas podem ser produzidas em abundância, não havendo variações em seu conteúdo proteico (VALENZUELA *et al.*, 2004). Atualmente já se pode contar com a biblioteca de cDNA de várias espécies de flebotomos, o que possibilita a clonagem e expressão de distintas proteínas contidas na saliva desses vetores.

### 1.3.2. EFEITO IMUNOMODULADOR DA SALIVA DE FLEBÓTOMOS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Diversos trabalhos realizados em áreas endêmicas de leishmanioses vêm sugerindo que a exposição natural à picada do flebótomo não-infectado pode influenciar no desfecho clínico da doença. Observações epidemiológicas sugeriram que viajantes provenientes de áreas não endêmicas, os quais ainda não tinham sido expostos à picada do vetor ou à *Leishmania*, apresentaram maiores riscos de

desenvolver as formas clínicas mais severas da doença (revisado em ANDRADE *et al.*, 2007). Estudos em área endêmica de LV no Brasil mostraram uma associação entre anticorpos anti-SGS de *L. longipalpis* e presença de resposta imune celular contra a *Leishmania* (BARRAL *et al.*, 2000). Além disso, foi mostrado o aparecimento simultâneo da resposta humoral anti-saliva e a resposta celular contra o parasita, caracterizada pela presença do DTH (GOMES *et al.*, 2002). Empregando uma coorte prospectiva, foi demonstrado que a incidência de DTH para antígenos do parasita foi maior em indivíduos que possuíam IgG anti-SGS de *L. longipalpis* (AQUINO *et al.*, 2010). Esses achados favorecem a hipótese que a indução da resposta imune contra a saliva do vetor pode facilitar o desenvolvimento de uma resposta protetora contra a leishmaniose humana. Adicionalmente, outro estudo mostrou que indivíduos expostos experimentalmente a picadas de *L. longipalpis* apresentam resposta imune celular, com grande produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 e aparecimento de reação de hipersensibilidade tardia a antígenos da saliva (VINHAS *et al.*, 2007). Mais importante, a co-cultura de macrófagos infectados por *L. chagasi* com linfócitos autólogos estimulados com SGS reduziu de maneira significativa o número de amastigotas nos macrófagos (VINHAS *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi demonstrado que a resposta DTH em indivíduos residentes em área endêmica naturalmente expostos a picadas de *P. duboscqi* persiste por um tempo de cerca de 48 horas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Nesse estudo, embora as células mononucleares sanguíneas desses indivíduos tenham apresentado respostas Th1, Th2 ou mista através da estimulação *in vitro* com saliva do vetor, as biópsias da pele no sítio da picada com resposta DTH foram dominadas por infiltrados de macrófagos e linfócitos com produção de IFN- $\gamma$ , indicativo de um ambiente Th1. Juntos, esses dados dão suporte à hipótese de que a exposição a antígenos da saliva de *L. longipalpis* contribui para proteção contra *L. infantum*. Todavia, em humanos não está claro se a proteção é devido à neutralização de proteínas da saliva por anticorpos ou devido ao aparecimento de uma resposta imune celular em momentos iniciais após a picada de flebótomos infectados.

Um estudo realizado na Turquia, em área de transmissão de *L. tropica*, pacientes com LC ativa apresentaram títulos significativamente maiores de IgG anti-SGS de *P. sergenti* quando comparados com indivíduos sadios (ROHOUSOVA *et al.*, 2005). Nessa perspectiva, em um estudo de coorte prospectivo com duzentas

crianças residentes em área endêmica na Tunísia foi mostrado que a presença de IgG anti-SGS de *P. papatasi* estava associada com o aumento do risco de desenvolver LC causada por *L. major* (MARZOUKI *et al.*, 2011). Em adição, indivíduos naturalmente expostos a picadas de *P. papatasi* apresentaram uma frequência de células T CD8+ produtoras de IL-10 mais elevada (ABDELADHIM *et al.*, 2011). Em Mali, área de transmissão de *L. major*, foi relatado três perfis de resposta imune celular contra a saliva de *P. duboscqi*: enquanto 23% e 25% dos indivíduos sem leishmaniose apresentam uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, respectivamente, 52% dos indivíduos possuem uma resposta mista Th1/Th2 (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Todavia, nesse trabalho não foi possível associar o tipo de resposta imune com o desfecho clínico dos participantes. Em uma área de transmissão de *L. braziliensis* no Brasil, pacientes com LC apresentaram maiores títulos de IgG anti-SGS de *L. intermedia* do que indivíduos que foram infectados pela *L. braziliensis* mas não desenvolveram a doença (DE MOURA *et al.*, 2007), assim como, recentemente, foi mostrado que a exposição à saliva de *L. intermedia* aumenta o risco de desenvolver LC (CARVALHO *et al.*, 2015). Esses dados indicam uma associação entre o desenvolvimento da doença e a resposta imune contra a saliva de *L. intermedia* em humanos. Até o momento não existem trabalhos comparando a resposta imune contra a saliva de *L. whitmani* e o desfecho clínico da LC causada por *L. braziliensis*.

Diversas tentativas de aprimorar o modelo animal de LC, mimetizando o que ocorre na natureza no momento da transmissão do parasita, mostraram que a adição da saliva do flebótomo é um elemento essencial. Foi demonstrado que as proteínas da glândula salivar do vetor inoculadas juntamente com a *Leishmania* na pele do hospedeiro, são importantes para o estabelecimento da infecção (TITUS; RIBEIRO, 1988; TEIXEIRA *et al.*, 2005). A inoculação de *L. major* mais o sonicado da glândula salivar (SGS) de *L. longipalpis* ou *P. papatasi* na pata do camundongo, foi capaz de exacerbar a infecção aumentando o tamanho da lesão e a quantidade de parasitas (TITUS; RIBEIRO, 1988; BELKAID *et al.*, 1998). Posteriormente foi demonstrado que a inoculação de uma proteína específica da saliva, o maxadilán, com *L. major* levou 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 SGS 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).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição do hospedeiro à saliva dos flebotomos resulta em uma resposta imune contra seus componentes. Em animais expostos a picadas de flebotomos ou inoculados com SGS ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune humoral com níveis elevados de anticorpos anti-saliva (revisado em ROHOUSOVA e VOLF, 2006). Além da produção de anticorpos, foi observado um intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no local da exposição (SILVA *et al.*, 2005). Uma forte resposta do tipo DTH é desenvolvida na derme da orelha dos camundongos após o inóculo de SGS de *P. papatasi* (equivalente a 0.1 par) ou após a exposição natural às picadas de *P. papatasi* (BELKAID *et al.*, 2000). Vários estudos demonstraram que as proteínas salivares, inoculadas juntamente com o parasita, foram capazes de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado, promovendo a inibição da resposta imune celular protetora do tipo Th1. Isto ocorre através da diminuição da produção de INF- $\gamma$ , IL-2 e óxido nítrico (NO) (MBOW *et al.*, 1998). A inoculação de *L. major* mais SGS de *P. papatasi* promove o aumento de IL-4 e IL-5, citocinas com perfil não protetor (Th2) na leishmaniose experimental murina (BELKAID *et al.*, 1998). Da mesma maneira, a saliva de *L. longipalpis* na infecção por *L. amazonensis* estimula a produção de IL-10, outra citocina com múltiplos efeitos imunomoduladores e inflamatórios (NORSWORTHY *et al.*, 2004). A IL-10, produzida por monócitos, células Th2, mastócitos e células T reguladoras (O'GARRA *et al.*, 2004), pode inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como INF- $\gamma$ , IL-2, IL-3 e TNF- $\alpha$  (DONNELLY *et al.*, 1995). Portanto, a co-inoculação da saliva de flebotomos juntamente com a *Leishmania* beneficia o parasita no momento do seu estabelecimento no hospedeiro vertebrado, inibindo a produção de citocinas e outras moléculas importantes neste controle, produzidas principalmente por células do sistema fagocítico.

O desenvolvimento de uma resposta imune contra a saliva do flebotomo desempenha um papel importante na proteção contra a infecção pelo parasita.

Diversos trabalhos têm demonstrado que ao mesmo tempo em que a saliva dos flebotomíneos exacerba a infecção pela *Leishmania*, por outro lado, a pré-exposição a saliva ou a picadas de flebotomos não-infectados resulta em redução da lesão a uma infecção subsequente (TITUS *et al.*, 1988; BELKAID *et al.*, 1998; BELKAID *et al.*, 2000; KAMHAWI *et al.*, 2000). A pré-exposição de camundongos a picadas de *P. papatasi* ou a imunização com SGS deste mesmo vetor foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major* (BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000). Camundongos BALB/c imunizados com a saliva de *L. longipalpis* desenvolveram proteção parcial contra desafio com *L. amazonensis* e saliva, resultando em lesões menores que se desenvolveram lentamente (THIAKAKI *et al.*, 2005). Foi demonstrado que camundongos expostos a picadas de *Phlebotomus duboscqi*, outro vetor da *L. major* no Velho Mundo, foram capazes de controlar a infecção após o desafio com *P. duboscqi* infectado com *L. major*, demonstrando a capacidade protetora gerada pela inoculação da saliva do vetor (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento de resposta DTH é a proteção contra *Leishmania* observada em animais que desenvolvem preferencialmente este tipo de resposta. Foi proposto que o local da picada se torna um ambiente inóspito para o estabelecimento da infecção pela *Leishmania*, modulando os eventos iniciais da resposta imune e, por fim, influenciando a resposta do hospedeiro contra o patógeno. A importância do desenvolvimento dessa resposta na proteção contra a infecção foi evidenciada na imunização com uma proteína de 15 kDa, presente na saliva de *P. papatasi* (VALENZUELA *et al.*, 2001). Animais imunizados com o plasmídeo de DNA contendo a sequência SP15 tornaram-se resistentes a um desafio posterior constituído de *L. major* mais saliva. Os animais imunizados apresentaram uma intensa resposta celular e alta produção de anticorpos. A resposta protetora foi associada ao desenvolvimento do DTH, uma vez que camundongos deficientes de células B, quando imunizados com o plasmídeo, mostraram proteção contra um desafio com *Leishmania* (VALENZUELA *et al.*, 2001). Entretanto, OLIVEIRA e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína PpSP44, também presente na saliva de *P. papatasi* foi capaz de induzir uma forte reação de DTH mas foi incapaz de proteger camundongos contra a infecção por *L. major*. Por outro lado, a imunização de hamsters com o plasmídeo LMJ19, que

codifica uma proteína indutora de DTH e de IFN-  $\gamma$  foi capaz conferir proteção após o desafio com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis* (GOMES *et al.*, 2008). A partir desses dados, foi sugerido que a resposta DTH contra a saliva nem sempre pode ser correlacionada com a proteção contra a infecção por *Leishmania*. Provavelmente, esses distintos padrões de resposta podem ser associados à grande variação antigênica presente na saliva dos diferentes tipos de flebótomos das mais diversas regiões geográficas (ROHOSOUVA *et al.*, 2005; THIAKAKI *et al.*, 2005; revisado em ROHOSOUVA & VOLF, 2006).

Nos estudos experimentais com *L. braziliensis*, foi demonstrado que a inoculação do SGS de *L. intermedia*, não conferiu proteção frente à infecção por *L. braziliensis* mais o SGS de *L. intermedia* (DE MOURA *et al.*, 2007). Entretanto, o plasmídeo expressando a proteína salivar Linb-11, isolado da saliva de *L. intermedia*, foi capaz de proteger contra a infecção com *L. braziliensis* mais SGS de *L. intermedia* (DE MOURA *et al.*, 2013).

Outro flebótomo, *L. whitmani*, é capturado nas áreas de transmissão de *L. braziliensis*, onde a presença deste inseto chega a ser dez vezes maior que *L. intermedia* em áreas peridomiciliares (MIRANDA *et al.*, 2002;). Nos estados como Ceará, Pernambuco e Mato Grosso do Sul, áreas de ocorrência de LC, o *L. whitmani* é considerado o vetor natural da *L. braziliensis* (DE QUEIROZ *et al.*, 1994; GALATI *et al.*, 1996). Apesar de *L. whitmani* estar presente nas áreas de transmissão de LC e também ser comprovadamente considerado um dos vetores de *L. braziliensis* assim como *L. intermedia*, muito pouco se sabe sobre o efeito da saliva deste vetor em hospedeiros vertebrados. Um estudo realizado por Bezerra e Teixeira (2001) demonstrou o papel exacerbador do SGS de *L. whitmani* em camundongos quando inoculado juntamente com *L. braziliensis* na pata destes animais. Apesar da saliva de *L. whitmani* exacerbar a infecção por *L. braziliensis* neste modelo, não foi verificado se animais imunizados com a saliva de *L. whitmani* seriam capazes de controlar a infecção.

#### 1.4 MONITORAMENTO DE ÁREAS ENDÊMICAS: O USO DE ANIMAIS SENTINELA

Devido à grande variedade de patologias animais circulantes no mundo inteiro a manutenção de sistemas de vigilância e monitoramento de doenças para cada patógeno específico é de suma importância para garantir a saúde animal e de populações humanas em regiões rurais. Muitos fatores bióticos e abióticos podem estar envolvidos no aumento da incidência de doenças como as Leishmanioses, entre eles encontram-se as mudanças climáticas, a intensificação das áreas agropecuárias e o processo de urbanização, especialmente em países em desenvolvimento (SUTHERST, 2004). Essa propagação é sustentada pelo fato de que nos últimos anos, mudanças ambientais provocadas pelo aquecimento global constituem um complexo sistema que influencia o estabelecimento de doenças transmitidas por vetores (CHEVALIER, *et al.*, 2016). Sistemas de monitoramento de doenças animais tem dois objetivos principais, um dos quais trata-se de usar os próprios animais como uma ferramenta para avaliar o estado de saúde de uma população (o que inclui a detecção do surgimento de doenças exóticas e seus vetores, bem como o monitoramento de alterações nas prevalências das doenças endêmicas); o segundo objetivo determina a eficácia de estratégias de controle específicas já implementadas para controlar a dispersão da doença, como exames de rotina aplicados em programas de erradicação de doenças (revisado em RACLOZ, 2007). Nesse sentido, os sistemas de animais sentinela apresentam-se como modelos de vigilância ativa, a qual inclui a análise de animais que possam ser usados como indicadores de surgimento e dispersão de doenças.

Animais sentinela são definidos como um grupo de animais em um local pré-determinado, que é monitorado durante um determinado período de tempo em relação a um agente específico de doença (WARD *et al.*, 1995). Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal, unidades sentinela são descritas como animais com geografia bem conhecida, com testes de diagnóstico regulares para detecção de antígenos e/ou anticorpos contra agentes etiológicos de diferentes doenças. Portanto, esses animais são capazes de monitorar e identificar possíveis locais criadouros de insetos vetores e possíveis riscos de epidemias.

O uso de galinhas como animais sentinela tem sido descrito em diversas doenças tais como *West Nile Virus* (WNV) nos Estados Unidos (revisado em RACLOZ et al., 2007), *Avian Influenza* França e Holanda e, encefalite de *St. Louis* nos Estados Unidos (revisado por RACLOZ et al., 2007), sendo utilizadas em programas de controle epidemiológico. Estes animais permitem o monitoramento ou identificação de surtos causados por agentes infecciosos, investigação de mudanças na prevalência ou incidência de uma determinada doença, além de avaliar a eficácia de programas de controle epidemiológico instituído em determinada área (RACLOZ et al., 2007). Em resposta a exposição vetorial e/ou doença em áreas endêmicas, as aves sentinelas podem produzir anticorpos específicos (KWAN et al., 2010), sendo IgG o isotipo principal.

Aves utilizadas como sentinela podem soroconverter de acordo com o local em que foram inseridas e o tempo de permanência em área endêmica. Esse modelo tem sido associado com o fator de risco para transmissão da doença e é utilizado para mensurar e estabelecer medidas de intervenção emergencial (KWAN et al., 2010). Galinhas sentinelas são capazes de fazer soroconversão para WNV e a presença de anticorpos anti-WNV nestas aves foi detectada simultaneamente com casos confirmados de doenças humanas no mesmo local (BUCKLEY et al., 2003 e KWAN et al., 2010). Além de apresentarem anticorpos contra antígenos de patógenos, galinhas também são usadas como sentinelas em programas de monitoramento de infestação de vetores. Na Bolívia, essas aves têm se mostrado eficientes no controle de vigilância epidemiológica, uma vez que apesar de não se infectarem por *Tripanossoma cruzi*, são capazes de desenvolver rapidamente resposta imune detectável contra componentes da saliva do vetor, os triatomíneos (SCHWARZ et al., 2009a). Atualmente já se sabe que aves expostas a picadas de artrópodes hematófagos desenvolvem anticorpos contra componentes da saliva desses vetores (SCHWARZ et al., 2009a). Este modelo apresenta relevância em programas de controle de surtos epidêmicos e até mesmo programas para verificação de reinfestações vetoriais em áreas anteriormente tratadas (SCHWARZ et al., 2009b). Em 2013, SOARES e colaboradores, observaram que galinhas inseridas em área endêmica para LV no interior da Bahia foram capazes de produzir títulos de anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis*, e que estes títulos aumentaram progressivamente durante o tempo do estudo. Entretanto, apesar da importância

epidemiológica de galinhas como sentinelas em diferentes doenças, não existem estudos que demonstrem o papel dessas aves sentinelas em área endêmica para leishmaniose tegumentar, sobretudo considerando-se a detecção de anticorpos contra a saliva dos flebotomíneos.

Já é bem conhecido que as aves não se infectam por *Leishmania* devido as suas características fisiológicas, principalmente a alta temperatura corporal e pela atividade do sistema complemento que impede o seu desenvolvimento (OTRANTO, *et al.*, 2009). Apesar de galinhas não atuarem como reservatório, alguns estudos epidemiológicos sobre as leishmanioses têm demonstrado que a presença de galinheiros próximos as habitações humanas constituem um fator de risco para a transmissão da doença, (ALEXANDER *et al.*, 2002; CALDAS *et al.*, 2001) e que indivíduos residentes em casas próximas a galinheiros possuem risco 4.21 maior de contrair a LV (RODRIGUES *et al.*, 1999). Inúmeros são os fatores que podem favorecer a alimentação de flebotomíneos em sangue de galinha: menores níveis de hemoglobina, a inatividade durante o período noturno e por possuírem áreas de exposição que facilitam a alimentação, como cristas e barbelas ricas em capilares e sua epiderme mais fina, o que também facilita a introdução da probóscide destes insetos (FREEMAN *et al.*, 1984; ALEXANDER *et al.*, 2002). Além de possuir características fisiológicas favoráveis para alimentação de flebotomíneos, as galinhas também são importantes na atração das fêmeas para alimentação e posterior realização da corte (BRAY *et al.*, 2010). Inicialmente os machos são atraídos para o local da alimentação liberando feromônios. Estes têm a sua volatilização favorecida devido à alta temperatura corporal das aves (41°C), que somado a emissão de CO<sub>2</sub> parece auxiliar a orientação das fêmeas para realização do repasto sanguíneo (PETERS *et al.*, 1983 e BRAY *et al.*, 2010). A relação entre galinhas e os flebótomos já havia sido verificada por TEODORO e colaboradores (1999), quando observaram que o galinheiro se mostra bastante atrativo para flebótomos, como *L. longipalpis*, que encontra nestes locais abundância de alimento e matéria orgânica úmida para seus criadouros. Com base nestas evidências, a proximidade de casas e galinheiros constitui um fator de risco para transmissão da leishmaniose. Deste modo, compreender o papel específico da galinha na cadeia epidemiológica de transmissão da LT pode auxiliar na implementação de medidas preventivas sustentáveis contra a doença, sobretudo porque estas aves são criadas

em abundância em zonas rurais e bairros de baixa renda nas grandes cidades do Brasil (ALEXANDER *et al.*, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos envolvendo a biologia populacional e de interação entre vetores de doenças humanas e seus hospedeiros é de suma importância, visto a gravidade de suas implicações para a saúde pública no país. A observação de que o flebótomo *L. whitmani*, também incriminado como vetor de *L. braziliensis*, é encontrado em grande quantidade nas áreas endêmicas de LC, ressalta sua relevância na epidemiologia da LC. Até o momento, entretanto, muito pouco foi estudado sobre o efeito da saliva deste vetor. No que concerne ao conhecimento científico adquirido, essa pesquisa apresenta dados relevantes sobre a biologia de um inseto vetor da LC muito pouco conhecido, o *Lutzomyia whitmani*, além de demonstrar como a saliva deste flebótomo interage com o sistema imune, as citocinas e os tipos celulares ativados e envolvidos neste processo, resultando numa possível indução de uma resposta celular protetora, pode-se abrir novas perspectivas para o entendimento do papel deste vetor em áreas de transmissão de LC.

## 3 HIPÓTESE

A resposta dos hospedeiros em área de LTA contra a saliva de *L. whitmani* pode ser útil como marcador epidemiológico de exposição e como modulador da resposta imune contra a *Leishmania*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar etapas críticas da possível transmissão da *L. braziliensis* pela *L. whitmani*, analisando diversas etapas do processo como avaliação da presença do vetor em área endêmica de Leishmaniose cutânea; a exposição de animais do peridomicílio humano a flebótomos e o papel da sua saliva no estabelecimento da *L. braziliensis* em infecção experimental murina.

## **CAPÍTULO 1 – SOROCONVERSÃO DE GALINHAS COM PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SALIVA DE *L. whitmani*: POSSIBILIDADE DE USO COMO SENTINELA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

### **1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a distribuição da frequência relativa dos vetores *L. intermedia* e *L. whitmani* numa área endêmica para LT.
- Acompanhar a soroconversão em relação à saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani* em galinhas naturalmente expostas numa área endêmica para LT.
- Analisar a reação cruzada dos anticorpos de galinhas expostas à saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani* com saliva de outros insetos vetores.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Galinhas provenientes de granja comercial foram mantidas no peridomicílio de residências na área endêmica por um período de oito meses, com coleta bimestral de sangue. Simultaneamente, foram realizadas capturas mensais de insetos nas mesmas residências onde foram mantidas as aves do estudo para avaliar a densidade de flebótomos vetores na área.

## 2.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na área de Corte de Pedra (13° 26' de latitude Sul e 59° 30' de longitude Oeste no meridiano de Greenwich), localizado na região cacaeira no sudeste do estado da Bahia, pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, cobre uma área de 8.000 km<sup>2</sup>, aproximadamente a uma distância de 275 km da capital do estado. Altitude média de 600 m acima do nível do mar, sendo o relevo regional ondulado típico tabular cortado por vales em forma de "U". O clima da região é tropical úmido, caracterizando-se por ser quente e úmido, sem estação seca. A temperatura média local é variada, entre 18 a 24° C, possuindo solo recoberto por florestas secundárias em diversas fases de evolução. A expansão das plantações de cacau foi realizada em detrimento da Mata Atlântica. Tem como principal atividade econômica a lavoura do cacau e cravo da Índia Apresenta uma população de 10.728 habitantes, sendo 1.920 na zona urbana e 8.808 na zona rural (COSTA et al., 1998). Eleita por sua alta endemicidade, Corte de Pedra apresenta a maior incidência de LCA na região do Nordeste brasileiro. Enquanto que a incidência de LCA na Bahia varia de 1,5 a 3,2 casos para cada 10.000 indivíduos, em Corte de Pedra essa taxa varia de 15 a 35 para cada 10.000 (BARRAL-NETTO, et al.,1997). O distrito encontra-se em uma região de Mata Atlântica, quase completamente desmatada para a atividade de cultivo, porém ainda restam algumas poucas áreas de preservação. Para a introdução das galinhas nesta área e realização deste estudo, cinco residências localizadas no distrito foram selecionadas pelos membros integrantes da pesquisa.

## 2.3 CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBÓTOMOS E OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Os flebótomos foram capturados em armadilhas distribuídas na proximidade de cinco casas selecionadas no distrito de Corte de Pedra, conforme mencionado no item anterior. Foram utilizados para captura armadilhas do tipo C.D.C.- Center for Diseases Control Light Trap (SUDIA e CHAMBERLAIN, 1962), as quais foram

armadas ao entardecer e retiradas logo após o amanhecer. As armadilhas foram sempre colocadas no peridomicílio, próximo aos galinheiros, bem como no intradomicílio. As coletas foram realizadas mensalmente durante os 8 meses da pesquisa a fim de se observar a frequência relativa das espécies de flebótomos encontradas na área. As fêmeas adultas capturadas foram utilizadas para a obtenção de glândulas salivares.

Para a identificação, os insetos coletados foram transportados da área endêmica (local de coleta) até o Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP-CPqGM/FIOCRUZ) em tubos contendo álcool a 70%. Então foram triados, separados os flebótomos machos e fêmeas, clarificados e montados em lâminas para microscopia para identificação a partir de estruturas das genitálias internas desses insetos. A identificação taxonômica de cada espécie foi realizada de acordo com os critérios definidos por Young e Duncan (1994).

Glândulas salivares de fêmeas adultas de *L. intermedia* e *L. whitmani* em jejum sanguíneo mantidas apenas com solução açucarada, foram extraídas sob um estereomicroscópio através de dissecação com auxílio de pinça e estiletos entomológicos. As glândulas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo solução salina e armazenadas a  $-70^{\circ}$  C até o momento do uso. Antes de sua utilização, as glândulas salivares foram rompidas através de ultrasonicação a uma frequência de 40 Hz com duas seqüências de 20 pulsos (Branson Sonifier 450, Danbury, USA) em microtubos de 1,5 mL e então centrifugadas a 10.000 rpm, a  $4^{\circ}$  C por 2 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Os sobrenadantes foram coletados para os experimentos, constituindo o sonificado de glândula salivar (SGS). O nível de contaminação por lipopolisacarídeos (LPS) foi testada usando um kit comercial LAL cromogênico (QCL-1000; Lonza Biologics) e obteve concentração de LPS  $< 0,1\text{ng/mL}$ .

## 2.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, sob número de protocolo 013/2012. Todos

os animais utilizados nesta pesquisa receberam água e alimentos *ad libitum*, sem restrições de recursos.

## 2.5 IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS COM SGS DE *L. intermedia* E *L. whitmani* PARA CONTROLE POSITIVO DOS TESTES SOROLÓGICOS

Galinhas (*Gallus gallus*) com aproximadamente 25 semanas de idade (n = 6) foram obtidas de uma granja comercial. As mesmas foram imunizadas 3 vezes, com intervalo de 15 dias a cada imunização, com 30 µg de SGS (sonicado de glândula salivar) de *L. intermedia* ou *L. whitmani* (aproximadamente 30 pares/ave), sendo 3 galinhas imunizadas com SGS de cada espécie vetora, ressuspensos em 500 µL de PBS (Tampão fosfato salina, pH 7.4) misturadas a um igual volume de adjuvante completo de *Freund* (na primeira imunização). A mistura antígeno-adjuvante após homogeneização foi inoculada via intramuscular no músculo peitoral das galinhas através de seringa e agulha com calibre de 0,4 mm de espessura, ambas esterilizadas e descartáveis. Na segunda e terceira imunização foi utilizado adjuvante incompleto de *Freund* nas mesmas concentrações e de acordo com o mesmo protocolo citado acima. O sangue das aves foi coletado semanalmente antes de cada imunização e quinze dias após a última inoculação para o acompanhamento da soroconversão.

## 2.6 EXPOSIÇÃO DAS GALINHAS EM ÁREA ENDÊMICA

Um total de 50 galinhas provenientes de uma granja comercial foram distribuídas no peridomicílio de 5 residências em Corte de Pedra (10 galinhas por residência). Os domicílios utilizados no presente estudo foram selecionados por exibir ampla densidade dos vetores em avaliações prévias. A coleta do sangue das aves foi realizada previamente à exposição e a cada dois meses até o oitavo mês da pesquisa.

## 2.7 SOROLOGIA ANTI-SGS DE *L. intermedia* E *L. whitmani*

O teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foi utilizado para avaliar a titulação de anticorpos IgG anti-saliva obtidos dos soros das aves imunizadas e das aves inseridas na área endêmica de LC. Cada poço da placa Nunc MaxiSorp de 96 poços, foi sensibilizado com 1 µg/mL do sonificado de glândula salivar (SGS) de *L. intermedia* ou *L. whitmani* diluído em Tampão-carbonato bicarbonato pH 9.6, (100µL/poço) e incubado durante à noite, a 4°C. Posteriormente, os poços foram lavados 4 vezes com PBS/Tween 0,05% e então bloqueados com PBS Tween 0,05% + 1% de BSA por 1 hora a 37° C. Após 5 lavagens com PBS/Tween 0,05%, os soros das galinhas foram então adicionados na diluição de 1:50 em PBS Tween 0,05% + 1% de BSA e incubados durante 1 hora a 37°C. Os soros das pessoas residentes na área endêmica diluídos em 1:100 também foram incubados durante 1 hora a 37°C. Após 5 lavagens, foi adicionado o anticorpo anti-IgY (Sigma, EUA) conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:5.000 em PBS Tween 0,05% + 1% de BSA BSA para as galinhas ou anti-IgG humano conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:5.000 em PBS Tween 0,05% + 1% de BSA (Sigma, EUA); em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes e a reação foi revelada após a adição do substrato p-nitrofenil fosfato: 1µg/mL e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com NaOH 3M, e a leitura da placa foi realizada a 405 nm. O cálculo do cut-off foi realizada como resultado das médias dos controles negativos mais o desvio padrão multiplicado por 3.

## 2.8 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS SALIVARES DE *L. intermedia* E *L. whitmani* COM SOROS DE GALINHAS PROVENIENTES DE UMA ÁREA ENDÊMICA

Proteínas salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani* foram separadas em um gel Bis-Tris NuPage 4-12%. Um total de 10 pares de glândulas salivares

(aproximadamente 10 µg de proteínas totais) de cada espécie vetor foram usadas por canaleta. As proteínas salivares foram desnaturadas durante 2 minutos a 85° C e, foram aplicadas em seguida nas respectivas canaletas. Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o equipamento iBlot Invitrogen durante 7 minutos. Após a transferência as membranas foram bloqueadas durante à noite com PBS Tween 0,05% e leite desnatado a 5% por 4° C. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e as tiras correspondentes às canaletas foram cortadas e incubadas com os soros das galinhas diluídos (1:50) em PBS Tween 0,05% e 5% de leite desnatado. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo IgY anti-chicken Sigma diluído na proporção de (1:1000) em PBS Tween 0,05% e 5% de leite desnatado em temperatura ambiente. Após uma hora de incubação as membranas foram novamente lavadas e reveladas com a adição do substrato Western Blue (Promega) e a reação foi interrompida pela lavagem da membrana com água destilada.

Como controle positivo, foram utilizados soros de galinhas experimentalmente imunizadas com SGS e adjuvante de *Freund*. Soros de galinhas de área não endêmica, por sua vez, foram usados como controle negativo.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos: teste t pareado e não pareado, teste de Wilcoxon, teste de correlação de Spearman, teste de Mann-Whitney, teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e One-way Anova com Boferonis. Todos os testes foram bicaudais com nível de significância de 5% (Graphpad Prism 5).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CAPTURA DE FLEBÓTOMOS

Foram coletados, no total, 5321 flebótomos, incluindo machos e fêmeas de três espécies, tanto no ambiente intradomiciliar quanto no peridomicílio, durante o período de maio de 2012 a janeiro de 2013. As espécies *L. intermedia* e *L. whitmani* foram encontradas como as mais abundantes, representando 91,6% dos flebótomos capturados, seguidas apenas por *L. migonei*, conforme pode-se observar na tabela 1.

**Tabela 1:** Frequência relativa de espécies de flebótomos encontrados na área de Corte de Pedra/BA, no período de maio/2012 a janeiro/2013.

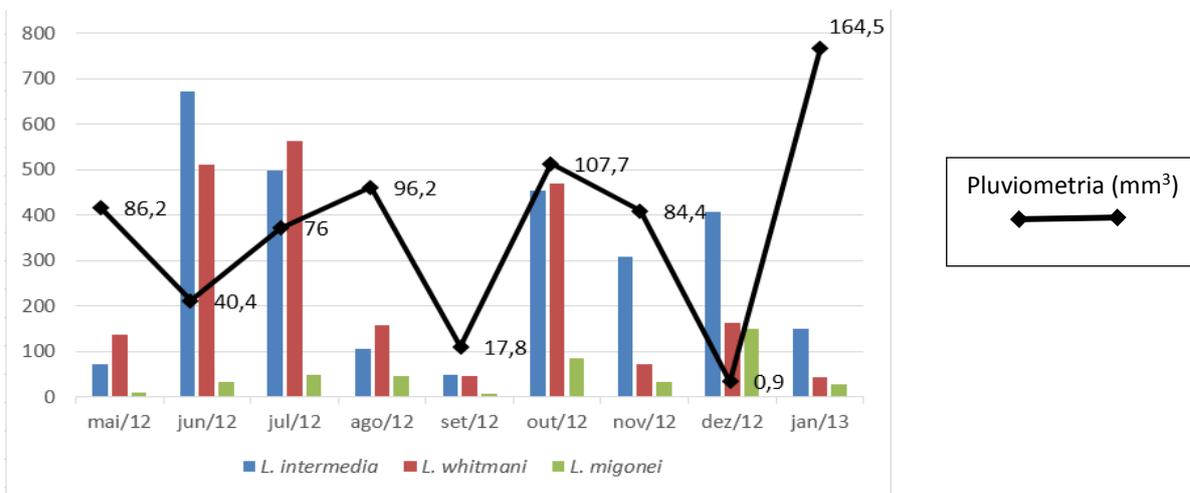
Espécies de flebótomos	Total capturado
<i>L. intermedia</i>	2715 (51%)
<i>L. whitmani</i>	2161 (40,6%)
<i>L. migonei</i>	445 (8,4%)

Quando comparados os resultados obtidos das coletas realizadas no intradomicílio com o peridomicílio, foi observado que todas as espécies de flebótomos encontradas apresentaram maior ocorrência no ambiente peridomiciliar (92,6% do total de flebótomos coletados - ver tabela 2).

**Tabela 2:** Ocorrência de flebótomos nos ambientes intradomiciliar e peridomiciliar coletados em residências do distrito de Corte de Pedra/BA.

Espécies de flebótomos	Intradomicílio	Peridomicílio
<i>L. intermedia</i>	126 (2,4%)	2589 (48,6%)
<i>L. whitmani</i>	242 (4,5%)	1919 (36,1%)
<i>L. migonei</i>	25 (0,5%)	424 (7,9%)
<b>TOTAL</b>	<b>393 (7,4%)</b>	<b>4932 (92,6%)</b>

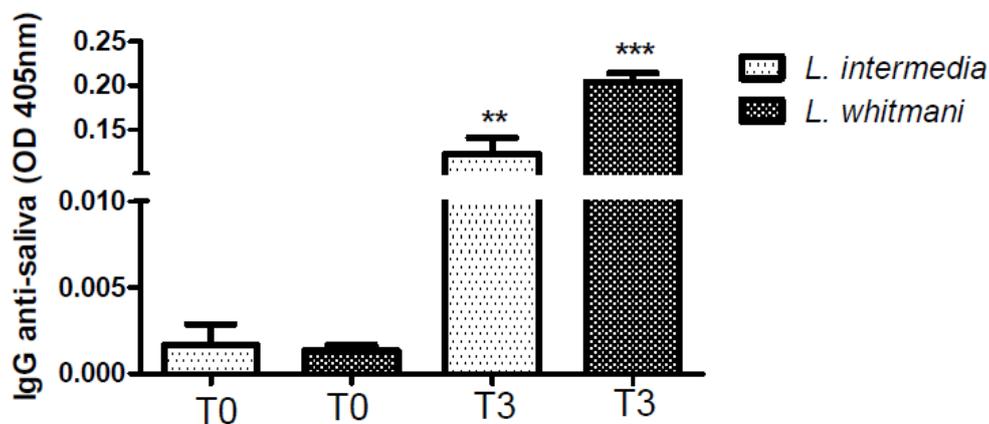
Para analisar se a presença desses vetores na área havia estabelecido alguma relação com a precipitação pluvial da região, os dados obtidos no presente estudo foram plotados em gráfico juntamente com os dados pluviométricos fornecidos pelo CEPLAC/BA. No entanto, não foi possível correlacionar a ocorrência de *L. intermedia* e/ou *L. whitmani* associada aos meses chuvosos (figura 1).



**Figura 1:** Distribuição mensal de *L. intermedia*, *L. whitmani* e *L. migonei* e precipitação pluviométrica medida por mm<sup>3</sup> na região de Corte de Pedra/BA

### 3.2 SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPERIMENTALMENTE IMUNIZADAS COM SGS DE *L. intermedia* OU *L. whitmani*

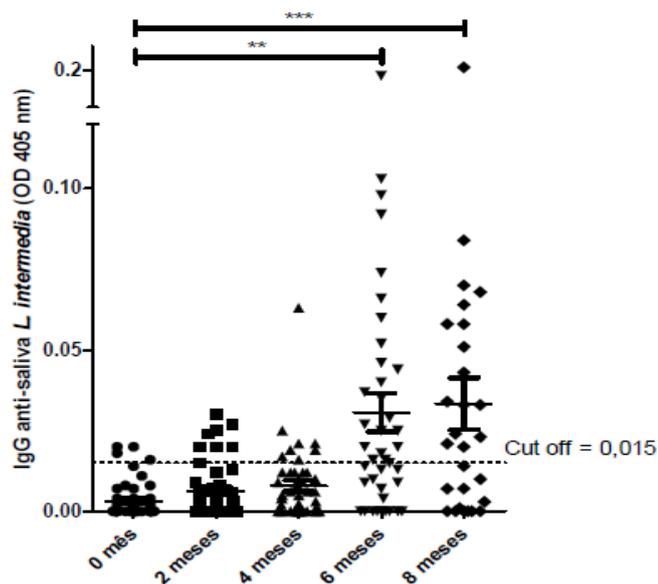
A produção de anticorpos contra antígenos salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani* em galinhas foi avaliado a partir de imunizações experimentais realizadas em laboratório utilizando SGS dos flebótomos vetores, sendo cada imunização realizada em um intervalo de 14 dias. Foi possível observar que as galinhas imunizadas tanto com SGS de *L. intermedia* como com SGS de *L. whitmani*, apresentaram altos níveis de anticorpos anti-SGS das respectivas espécies de flebótomos e esta produção foi estatisticamente significativa entre as primeiras e terceiras imunizações (figura 2). Esses resultados indicam que galinhas são capazes de produzir anticorpos em altas quantidades contra antígenos salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani*.



**Figura 2. Soroconversão de galinhas imunizadas com o SGS de *L. intermedia* e *L. whitmani*.** Três galinhas foram imunizadas três vezes com o SGS de *L. intermedia* e três com SGS de *L. whitmani*. Após imunização as mesmas foram acompanhadas para a soroconversão contra o SGS através de ELISA. T0 corresponde à coleta sanguínea antes da primeira imunização e T3 após a última imunização. Os dados apresentam a média e o erro padrão da média de experimentos realizados com três galinhas respectivas a cada barra. Asterisco representa diferenças estatisticamente significantes calculadas entre os tempos T0 e T3 de cada grupo experimental (\*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$ ).

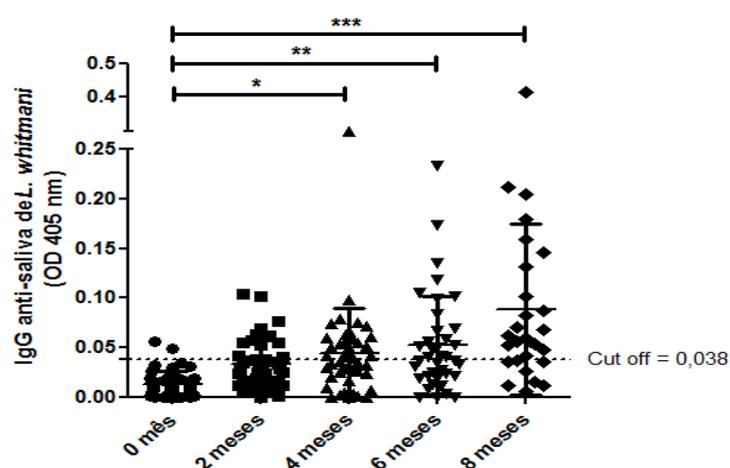
### 3.3 SOROCONVERSÃO DE GALINHAS NATURALMENTE EXPOSTAS ÀS PICADAS DE *L. intermedia* E *L. whitmani* EM ÁREA ENDÊMICA PARA LTA

Foi avaliado o desenvolvimento do anticorpo anti-saliva em galinhas naturalmente expostas às picadas desses vetores em uma área endêmica para LTA em um período de 8 meses. Ao mensurar os níveis séricos destes anticorpos, observamos um aumento dos níveis de IgY a partir do sexto mês de exposição (figuras 3 e 4). Antes da exposição (mês 0) as galinhas, cujos níveis de anticorpos anti-SGS de *L. intermedia* foram medidos, variaram seus valores de densidades ópticas (DO) entre 0.001 a 0.017. Após dois meses de exposição, 18% destas soroconverteram e a partir do sexto mês 57% se tornaram positivas com valor máximo de DO de 0.207 (figura 3). O aumento da leitura da DO após oito meses de exposição foi de mais de 10X sobre o valor do cut-off.



**Figura 3. Soroconversão para *L. intermedia* em galinhas expostas em área endêmica para LTA.** Galinhas (n=50) naturalmente expostas a picadas de flebotomos no período de 8 meses em área endêmica foram avaliadas quanto à produção de anticorpo IgG anti-saliva por ELISA. Dados apresentam a densidade óptica para cada galinha no período avaliado. Asterisco representa diferenças estatisticamente significantes (\*\*p < 0.01 \*\*\*p < 0.001).

As mesmas aves também foram capazes de produzir anticorpos anti-SGS de *L. whitmani*, de forma gradual durante o período do estudo. Após dois meses de exposição, 34% das aves soroconverteram e ao sexto mês 71,4% se tornaram positivas com valor máximo de DO de 0.417 (figura 4). O aumento da DO após oito meses de exposição foi de mais de 10X sobre o valor do cut-off. Em conjunto, esses dados mostram uma soroconversão contra antígenos da saliva de *L. whitmani*, produzindo anticorpos contra a saliva desses vetores em poucos meses de exposição em área endêmica para LTA.

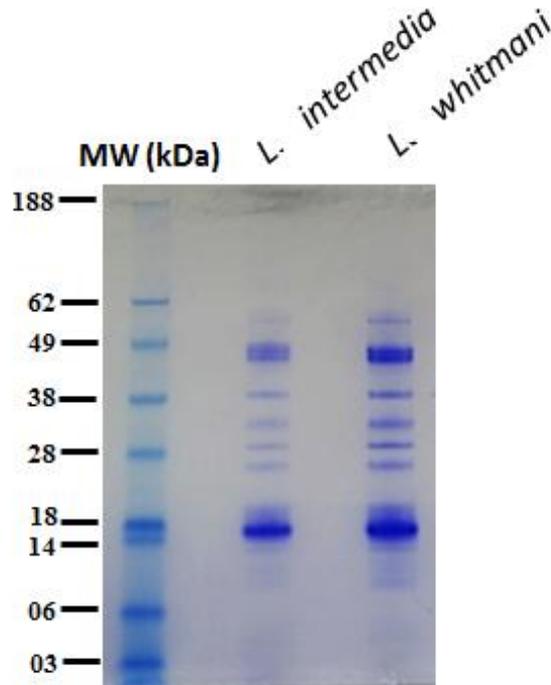


**Figura 4. Soroconversão de galinhas expostas à picadas de *L. whitmani* em área endêmica para LTA.** Galinhas (n=50) naturalmente expostas a picadas de flebotomos no período de 8 meses em área endêmica foram avaliadas quanto à produção de anticorpo IgG anti-saliva por ELISA. Dados apresentam a densidade óptica para cada galinha no período avaliado. Asterisco representa diferenças estatisticamente significantes (\* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.4 ESPECIFICIDADE NO RECONHECIMENTO DOS COMPONENTES SALIVARES DE *L. intermedia* E *L. whitmani*

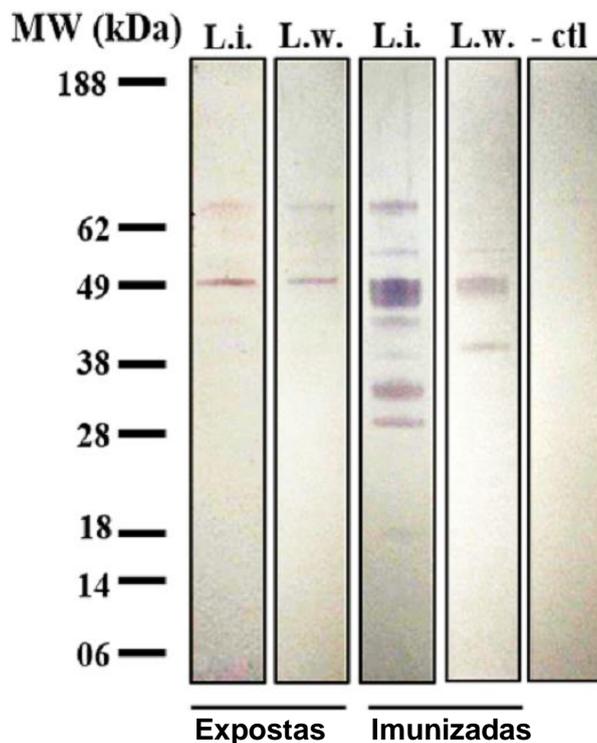
Após verificada a capacidade imunogênica dos antígenos salivares de vetores artrópodes, surgiu a necessidade de avaliar o perfil de reconhecimento das proteínas salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani* em soros de galinhas expostas em área endêmica e a possibilidade de reação cruzada com a saliva de outros artrópodes. Dessa forma, então, o próximo passo foi avaliar o perfil protéico salivar de cada um desses vetores. Inicialmente foram visualizadas em um gel, as proteínas salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani*, com o objetivo de avaliar o perfil protéico

salivar dessas espécies. Pela análise dos resultados foi possível observar que ambas as espécies apresentaram conjuntos de proteínas salivares bem semelhantes, conforme mostrado na figura 5.



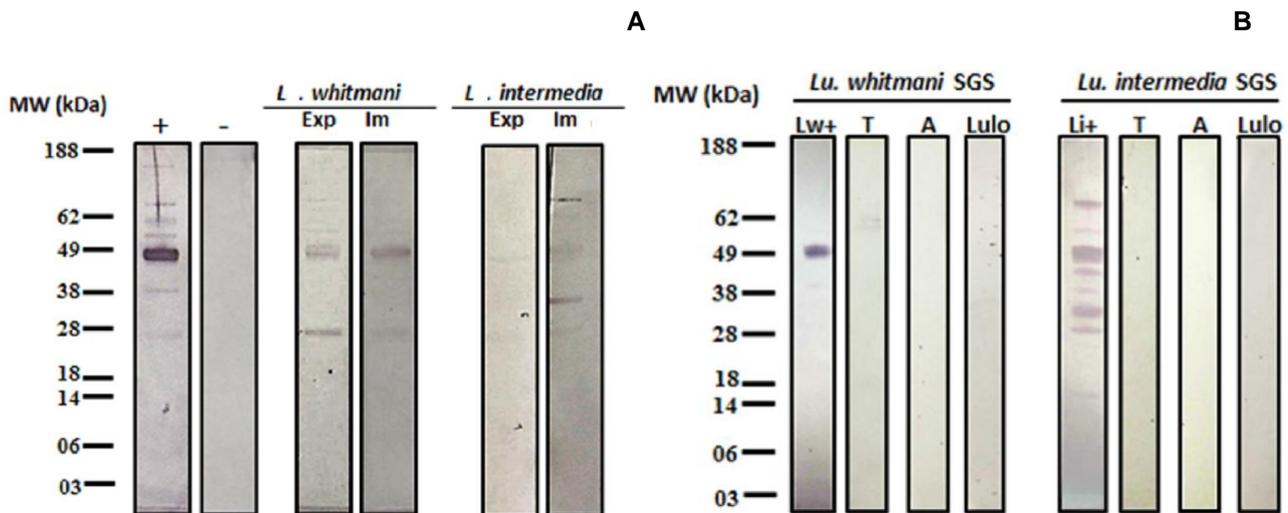
**Figura 5. Perfil de bandas proteicas totais da saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*.** SDS page contendo sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. intermedia* e *L. whitmani*, separadamente.

Para avaliar a especificidade do reconhecimento das proteínas totais da saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*, através da técnica de Western blot, foram utilizados soros das aves naturalmente expostas em área endêmica (as quais apresentaram os maiores títulos de anticorpos anti-saliva observado pelo Elisa) e, como antígeno, SGS de cada uma das espécies vetoras analisadas. Como controles positivos foram usados os soros das galinhas experimentalmente imunizadas em laboratório, e para os controles negativos foram usados os soros das mesmas aves antes da primeira imunização. Nossos resultados mostraram que um grupo de proteínas foi identificado, sendo reveladas 7 bandas que possuíam reconhecimento específico aos soros das galinhas, variando entre 28 e 65 kDa (figura 6). Dentre as proteínas identificadas, as que mostraram-se mais fortemente reativas apresentaram peso molecular aproximado de 45 kDa, similar às proteínas pertencentes à família *yellow*; e aproximadamente 15 kDa, similar à família SP15.



**Figura 6. Proteínas salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani* reconhecidas por soros de galinhas experimentalmente imunizadas e galinhas expostas às picadas dos vetores.** O reconhecimento das proteínas da saliva de *L. intermedia* (L.i.) e *L. whitmani* (L.w.) em *pools* de soros de galinhas (n=5) expostas naturalmente a picadas destes vetores e experimentalmente imunizadas com SGS desses flebótomos (n=5) foi demonstrado por Western Blot. Como controle negativo (-ctl) foi utilizado soros de aves de área não endêmica para Leishmaniose.

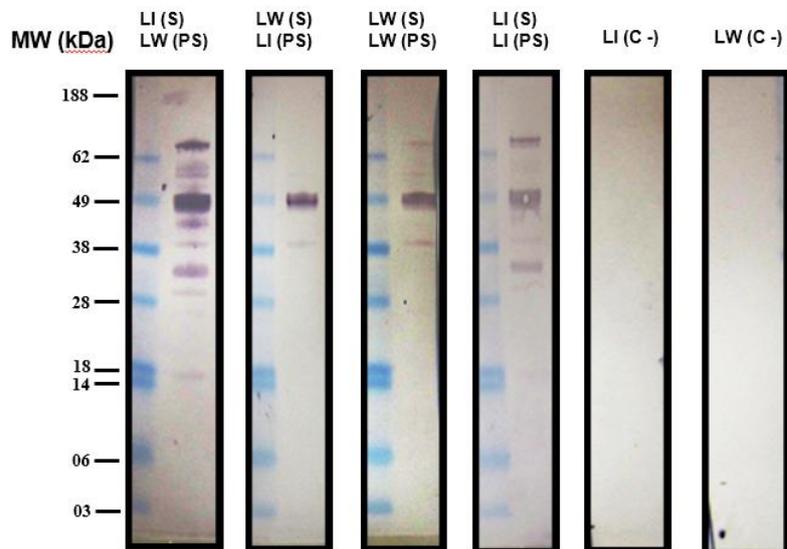
Com o objetivo de avaliar a possibilidade de reação cruzada entre as proteínas salivares dos flebótomos da região com outros artrópodes vetores, nas galinhas expostas na área endêmica para LTA e experimentalmente imunizadas, foi observado que essas aves também foram capazes de reconhecer proteínas da saliva de *L. longipalpis*, principalmente aquelas similares às proteínas da família *yellow* (figura 7A). Também foi possível observar nas aves imunizadas com SGS de *L. intermedia* o forte reconhecimento de uma banda protéica com peso aproximado de 35 kDa, similar à proteína apirase. Porém, quando avaliado se soros de galinhas expostas à picadas de outros vetores hematófagos, como *Aedes aegypti*, *L. longipalpis* e triatomíneos seriam capazes de reconhecer proteínas salivares de *L. intermedia* ou *L. whitmani*, não foi observada nenhuma reatividade cruzada (figura 7B).



**Figura 7. Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva da *L. intermedia* e *L. whitmani* entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos.** (A) Reconhecimento protéico de componentes salivares de *L. longipalpis* anticorpos de galinhas naturalmente expostas em área endêmica (Exp) e experimentalmente imunizadas (Im) com saliva de *L. intermedia* ou *L. whitmani*. Como controle positivo (+) foram usados soros de galinhas expostas às picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV e para o controle negativo (-) foi utilizado soro de ave de área não endêmica para Leishmaniose. (B) Pool de soros de galinhas experimentalmente expostas a picadas de diversas espécies de triatomíneos (T), *Ae. aegypti* (A) e *L. longipalpis* (Lulo) foram testados para verificação de reatividade cruzada com saliva total dos flebómos *L. intermedia* e *L. whitmani*. Como controle positivo foi utilizado soro de galinhas de alta experimentalmente imunizadas com SGS de cada um dos flebótomos vetores estudados: *L. whitmani* (Lw+) ou *L. intermedia* (Li+).

De acordo com os dados anteriores, foi possível constatar a possibilidade de reação cruzada entre componentes proteicos da saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*, demonstrados pelos perfis semelhantes de reconhecimento dos anticorpos das aves para cada uma das espécies vetoras. Para avaliar a existência dessa reatividade cruzada nas galinhas, foram realizados testes de Western Blot com SGS de *L. intermedia* e soros de aves que haviam sido experimentalmente imunizadas com SGS de *L. whitmani*. O mesmo também foi feito com SGS de *L. whitmani* e soros de aves que haviam sido imunizadas com SGS de *L. intermedia*. Foi possível observar que os anticorpos produzidos pelas aves imunizadas com SGS de *L. intermedia* foi capaz de reconhecer cerca de sete bandas proteicas presentes na saliva de *L. whitmani*, sendo que a mais fortemente reconhecida apresentou peso molecular em torno de 45 kDa, similar ao das proteínas da família *yellow* (figura 8). No caso das aves imunizadas com SGS de *L. whitmani*, também foi observado um reconhecimento proteico da saliva de *L. intermedia*, porém apresentando uma

quantidade menor de proteínas reconhecidas e, novamente, a proteína mais fortemente reconhecida foi a proteína similar às proteínas da família *yellow*.



**Figura 8. Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva de *L. intermedia* por galinhas imunizadas com SGS de *L. whitmani* e da saliva de *L. whitmani* por galinhas imunizadas com SGS de *L. intermedia*.** Na primeira coluna observa-se o reconhecimento protéico de componentes salivares de *L. whitmani* (LW (PS)) por anticorpos de galinhas experimentalmente imunizadas com SGS de *L. intermedia* (LI (S)). Na segunda coluna observa-se o reconhecimento protéico de componentes salivares de *L. intermedia* (LI (PS)) por anticorpos de galinhas experimentalmente imunizadas com SGS de *L. whitmani* (LW (S)). Os controles positivos são mostrados nas terceira e quarta colunas, nas quais foram usados soros de aves experimentalmente imunizadas com saliva de *L. whitmani* ou *L. intermedia* e o antígeno protéico da respectiva espécie. Como controle negativo (-) foi utilizado soro de aves de área não endêmica para Leishmaniose (LI (C-) e LW(C-)). S = soro; PS = proteína salivar; C- = controle negativo.

## **CAPÍTULO 2 – RESPOSTA IMUNE PARA SALIVA DE *L. whitmani* PROTEGE CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *L. braziliensis***

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver um modelo experimental murino de LC injetando *L. braziliensis* na presença do SGS de *L. whitmani*.
- Caracterizar a resposta imune à saliva de *L. whitmani*.
- Avaliar a capacidade protetora e a resposta imune gerada pela imunização com SGS *L. whitmani* após o desafio com *L. braziliensis* na presença de SGS *L. whitmani*.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Avaliamos o papel imunomodulador da saliva de *L. whitmani* em camundongos BALB/c e também o efeito da pré-exposição à esta saliva em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis*.

Para avaliar a resposta imune desenvolvida por animais com a saliva de *L. whitmani*, foram comparados os grupos imunizados com saliva de *L. whitmani* e o grupo controle (animais injetados com salina). A avaliação do local da inoculação da saliva (orelha), e do linfonodo de drenagem e do baço dos animais do estudo foi realizada por histopatologia, ELISA e citometria de fluxo.

O papel da pré-exposição à saliva de *L. whitmani* sobre a infecção por *L. braziliensis* nos animais imunizados, foi avaliado pela medida da lesão da orelha infectada e pela determinação da carga parasitária.

### 3.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Fêmeas de camundongos BALB/c foram obtidas do Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA, onde eles foram mantidos em condições livres de patógenos. Os camundongos usados nos experimentos tinham entre 6 e 8 semanas de idade e todos os protocolos de experimentação utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do próprio centro de pesquisa (CEUA-CPqGM/FIOCRUZ-BA), cujo número de protocolo é 017/2013.

Para avaliar o efeito da imunização pelo SGS de *L. whitmani*, grupos de camundongos BALB/c (com 5 animais em cada grupo) foram anestesiados com Quetamina e Xilazina (100 mg/kg + 5 mg/kg) através de via intraperitoneal e então imunizados com SGS de *L. whitmani* (o equivalente a 1 par de glândula salivar por animal) ou solução salina. A imunização com SGS foi feita intradérmica na orelha direita do animal em um volume de 10 µl, utilizando-se seringa de insulina BD ULTRAFINE (BD PHARMINGEN). Ambos os grupos foram imunizados três vezes, com intervalos de duas semanas entre cada imunização. No grupo controle foi administrado apenas salina. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados na orelha esquerda com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* mais o SGS de *L. whitmani* (o equivalente a 1 par de glândula salivar por animal), utilizando seringa de insulina BD ULTRAFINE (BD PHARMINGEN) (10 µl/animal). Antes de cada imunização, uma alíquota de soro foi coletada de cada animal para determinação de anticorpos anti-SGS por ELISA.

### 3.3 CULTURA DE PARASITAS

Promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco, EUA), L-glutamina, penicilina 100 U/mL e streptomicina 100 µg/mL a 23° C. Os parasitas foram

utilizados nas infecções por volta dos dias 6 ou 7 de cultura após atingirem a fase estacionária.

### 3.4 MEDIDA DAS LESÕES E CARGA PARASITÁRIA

Posteriormente às três imunizações intradérmicas com SGS (1 par de glândula salivar/animal) ou salina (grupo controle) na derme da orelha direita, os camundongos foram inoculados com SGS de *L. whitmani* na derme da orelha esquerda. Após 48 horas, as lesões nas orelhas dos animais foram medidas utilizando um paquímetro (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ).

Duas semanas após a última imunização com SGS de *L. whitmani* ou salina (animais controle) na derme da orelha direita, os camundongos foram infectados na derme da orelha esquerda com promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* ( $10^5$  parasitas) + SGS (equivalente a 1 par de glândula/animal) em 10  $\mu$ L de salina. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente usando um paquímetro digital (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). A carga parasitária foi estimada por meio do teste quantitativo de diluição limitante, conforme descrito anteriormente (TITUS, *et al.*, 1985). Para tal, os animais foram eutanasiados e a orelha infectada e o linfonodo de drenagem foram assepticamente retirados e homogeneizados em 1 mL de meio Schneider (Sigma, EUA). O tecido da orelha foi processado conforme descrito em XU *et al.*, 2011 e PETERS *et al.*, 2009. A seguir, as orelhas coletadas foram lavadas com álcool a 70%. Os folhetos das orelhas foram separados e incubados com meio RPMI incompleto contendo 0,2 mg/mL de Liberase (Roche Diagnostic Corp.), durante 1 hora a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. As orelhas foram homogeneizadas utilizando a máquina Medmachine (Beckton Dickson). Em seguida, as células foram passadas através de um filtro de 30  $\mu$ m adaptado a uma seringa (BD Biosciences). Este homogeneizado foi diluído de forma seriada em meio Schneider suplementado e colocado em placas de 96 poços contendo meio ágar sangue bifásico (Novy-Nicolle-McNeal). A partir do homogeneizado inicial foram realizadas diluições seriadas, de forma que o número de parasitas viáveis foi

determinado pela diluição mais alta, nas quais as promastigotas, quando existentes, cresceram até duas semanas de incubação a 25° C.

### 3.5 SOROLOGIA ANTI-SGS DE *L. whitmani* DOS CAMUNDONGOS

Para a análise da titulação de anticorpos séricos foi realizada coleta sanguínea dos camundongos imunizados, através de coleta do plexo venoso orbital, antes de cada etapa de imunização. A dosagem de anticorpos anti-saliva (IgG total) foi realizada conforme já descrito anteriormente em (SILVA, *et al.*, 2005), utilizando ELISA como técnica padrão. As placas da marca Nunc MaxiSorp de 96 poços foram sensibilizadas com 1 par de SGS de *L. whitmani*, diluído em cada 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6) e incubada durante a noite a 4° C. Após 3 lavagens com PBS Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado, durante 2 horas a temperatura ambiente. Após mais 3 lavagens, os soros previamente diluídos (1/50) em PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado, foram incubados durante 1 hora a 37° C. A seguir, após 3 lavagens foi adicionado o segundo anticorpo constituído de anti-IgG camundongo (Promega, Madison, EUA) conjugado a fosfatase alcalina e diluído em PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado (1/1000). As placas foram novamente incubadas durante 1 hora a 37° C. Posteriormente a novas lavagens, a revelação foi feita utilizando o substrato paranitrofenil fosfato (1mg/mL) (Sigma, St. Louis, EUA). A reação foi interrompida com a adição de NaOH 3M e a seguir, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 405 nm.

Além dos testes ELISA aplicados, também foram realizadas análises de proteínas sorológicas através de Western blot, no qual o equivalente a 10 pares de SGS de *L. whitmani* foi aplicado em cada canaleta de um gel Bis-Tris 4-12% NuPAGE (Invitrogen). As proteínas salivares foram previamente desnaturadas durante 2 minutos a 85° C e, então, foram aplicadas em seguida nas respectivas canaletas. Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o equipamento iBlot (Invitrogen, CA) durante 7 minutos. Após a transferência as membranas foram bloqueadas durante à noite com

PBS Tween 0,05% e leite desnatado a 5% por 4° C. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS Tween 0,05% e as tiras correspondentes às canaletas foram cortadas e incubadas com os soros dos camundongos imunizados (foram misturados os soros dos 5 animais que foram imunizados), obtidos duas semanas após a última imunização, diluídos (1:20) em PBS Tween 0,05% e 5% de leite desnatado. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo IgG anti-mouse fosfatase-alcálica conjugada diluído na proporção de 1:1000 em PBS Tween 0,05% e 5% de leite desnatado em temperatura ambiente. Após uma hora de incubação as membranas foram novamente lavadas e reveladas com a adição do substrato alcalino-fosfatase (Promega) e a reação foi interrompida pela lavagem da membrana com água destilada.

### 3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para avaliar o infiltrado inflamatório após 48 horas no local da inoculação, com SGS de *L. whitmani* ou salina, os camundongos foram eutanasiados e as orelhas retiradas e fixadas em solução de formalina a 10%. Os tecidos das orelhas foram posteriormente processados e embebidos em parafina para obtenção de secções de 5 mm para coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

### 3.7 AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar o perfil da resposta imune produzida pela imunização com a saliva de *L. whitmani*, foi analisado a população celular e a produção de citocinas intracelulares obtidas nos linfonodos drenantes dos camundongos previamente imunizados. Para tal, os anticorpos usados para os marcadores de superfície celular e citocinas intracelulares foram obtidos da BD Bioscience (San Diego, EUA). A mensuração da produção das citocinas *in vitro* já foi descrita anteriormente (DE MOURA *et al.*, 2005; DE MOURA *et al.*, 2007). Inicialmente, as células foram

ativadas na presença de anti-CD3 e anti-CD28 e posteriormente incubadas com Brefeldina A (10 µg/mL). As células foram bloqueadas com anticorpo anti-Fc (2.4G2) e duplamente marcadas, simultaneamente com anti-CD4 e anti-CD8, conjugados com FITC ou cychrome, respectivamente. Para a marcação intracelular das citocinas, as células foram permeabilizadas com Cytotfix/Citospin Plus (BD Pharmingen) e incubadas com anticorpos anti-citocinas conjugadas com diferentes fluorocromos. Foram utilizados os seguintes anticorpos: PerCP ou FITC anti-CD4 (RM4-5 e GK1.5, respectivamente), PerCP anti-CD8 (53-6.7), APC anti-TCR-β (HC57-597), FITC-anti-IFN-γ (XMG 1.2) ou PE anti-IL4 (11B11). Um mínimo de 100.000 eventos foi adquirido usando FACS Aria e os dados foram analisados pelo software Flow Jo.

### 3.8 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

As células do linfonodo e baço dos camundongos imunizados foram obtidas em diferentes tempos após imunização e, em seguida, foram cultivadas numa concentração de  $1 \times 10^6$  /mL em meio RPMI 1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomicina, 10% de soro bovino fetal inativado (Life Technologies) e 0,05 M de 2-mercaptoetanol. As células foram cultivadas em placas de 96 poços na presença ou ausência do SGS de *L. whitmani* para as avaliações imunológicas, de promastigotas de *L. braziliensis* para os estudos de infecção (cinco parasitas para uma célula) ou estimuladas com Concavalina A (10 µg/mL). As placas com as culturas foram incubadas a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado 72 horas depois para a dosagem de IL-4, IL-10 e INF-γ. A dosagem da produção de citocinas *in vitro* no sobrenadante das culturas celulares foi analisada através da técnica de ELISA utilizando kit comercial (BD Biosciences) e seguindo o protocolo do fabricante.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados testes não paramétricos: teste t pareado e não pareado. Todos os testes foram bicaudais com nível de significância de 5% (Graphpad Prism 5).

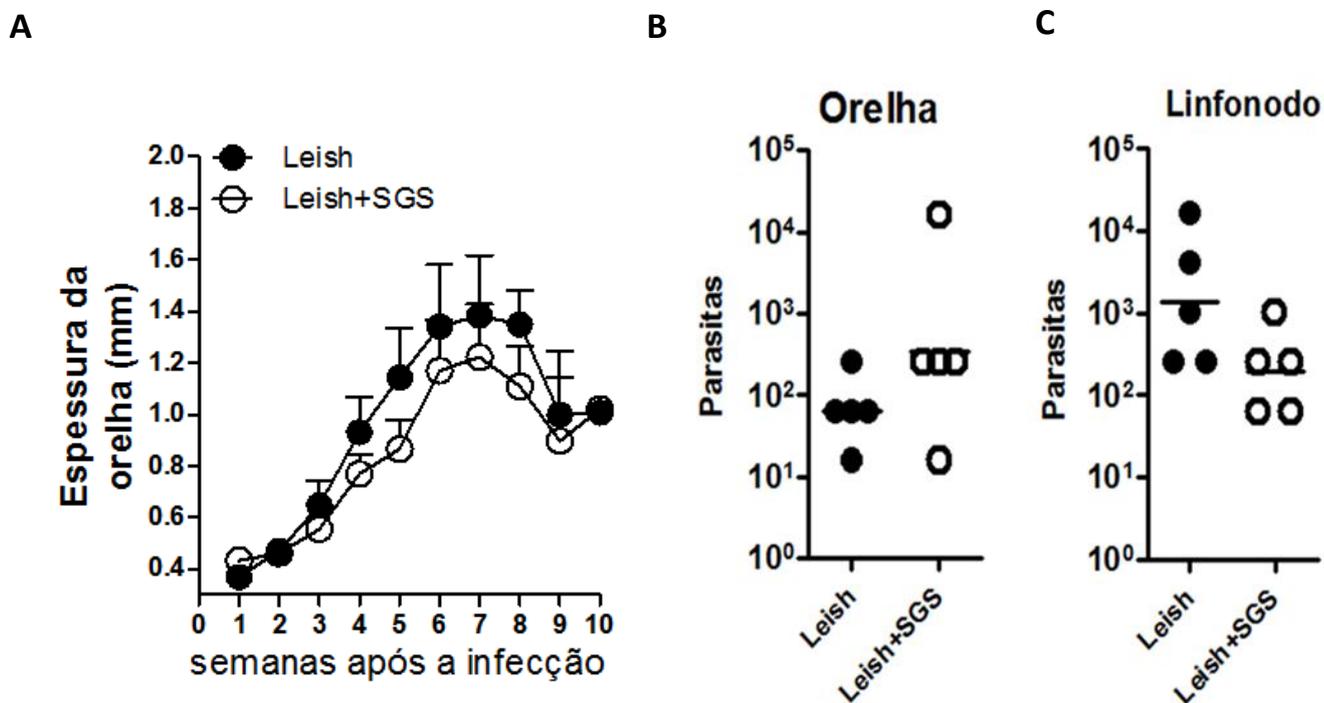
## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DA SALIVA DE *L. whitmani* NA CO-INOCULAÇÃO COM *Leishmania braziliensis*

Para avaliar o efeito da saliva de *L. whitmani* no estabelecimento da leishmaniose cutânea (LC) experimental, inicialmente foi avaliado se a co-inoculação de SGS de *L. whitmani* com *L. braziliensis* seria capaz de exarcebar a infecção. Para tal, o modelo experimental foi desenvolvido utilizando a co-inoculação de 1 par de SGS de *L. whitmani* mais  $10^5$  de *L. braziliensis* na orelha de camundongos BALB/C. Conforme observado na Figura 9A, a inoculação de *L. braziliensis* juntamente com a saliva de *L. whitmani* na orelha em camundongos BALB/c não foi capaz de exarcebar a lesão. O desenvolvimento da lesão no grupo de camundongos que foram apenas inoculados com a *L. braziliensis* e no grupo que recebeu a co-inoculação de SGS de *L. whitmani* com *L. braziliensis*, apresentaram-se bastante similares. Em ambos os grupos, a lesão se desenvolve após a quarta semana, com pico durante a sétima semana e redução gradativamente a partir da oitava semana (figura 9A).

Na décima semana de acompanhamento das lesões nas orelhas dos animais infectados, foi determinada a carga parasitária na orelha e no linfonodo através do ensaio de diluição limitante (figuras 9B e 9C). Não foram observadas diferenças significantes em relação à quantidade de *Leishmania* na orelha e no linfonodo entre

os animais infectados com *L. braziliensis* na presença ou não de SGS (figuras 9B e 9C).

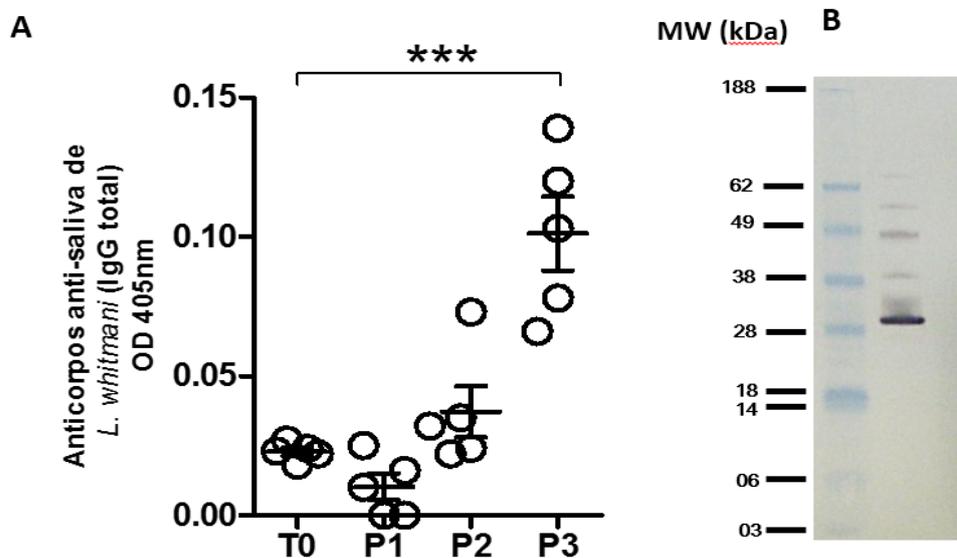


**Figura 9. Avaliação do efeito da saliva de *Lutzomyia whitmani* inoculada juntamente com *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/c.** Camundongos BALB/c foram inoculados com *L. braziliensis* ( $10^5$ ) na presença ou não do sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. whitmani* (1 par de SGS/animal). (A) As lesões na orelha dos grupos de animais infectados foram monitoradas semanalmente por 10 semanas (5 animais por grupo). (B) Carga parasitária da orelha. (C) Carga parasitária do linfonodo. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Dessa forma, foi possível observar que a co-inoculação de *L. braziliensis* com SGS de *L. whitmani* não foi capaz de exarcebar a lesão nos animais infectados. Porém, devido à escassez de trabalhos envolvendo o papel da saliva desse vetor na leishmaniose, decidimos avaliar se a pré-exposição aos componentes salivares de *L. whitmani* seria capaz de desenvolver resposta imunológica nesses animais.

## 4.2 RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM SALIVA DE *L. whitmani*

Com o objetivo de avaliar a produção de anticorpos anti-SGS de *L. whitmani*, foi coletado soro dos camundongos imunizados com SGS ou salina antes de cada imunização. Somente duas semanas após a segunda imunização foi possível detectar a presença de anticorpos nos animais imunizados com SGS de *L. whitmani*, aumentando significativamente após a terceira imunização (figura 10A). Para avaliar o reconhecimento protéico específico pela técnica de western blot, foram selecionados soros com os mais altos títulos de anticorpos anti-SGS de *L. whitmani* (figura 10B). Os resultados revelaram o reconhecimento de pelo menos 5 bandas proteicas salivares com tamanho variando de 62 a 30 kDa.

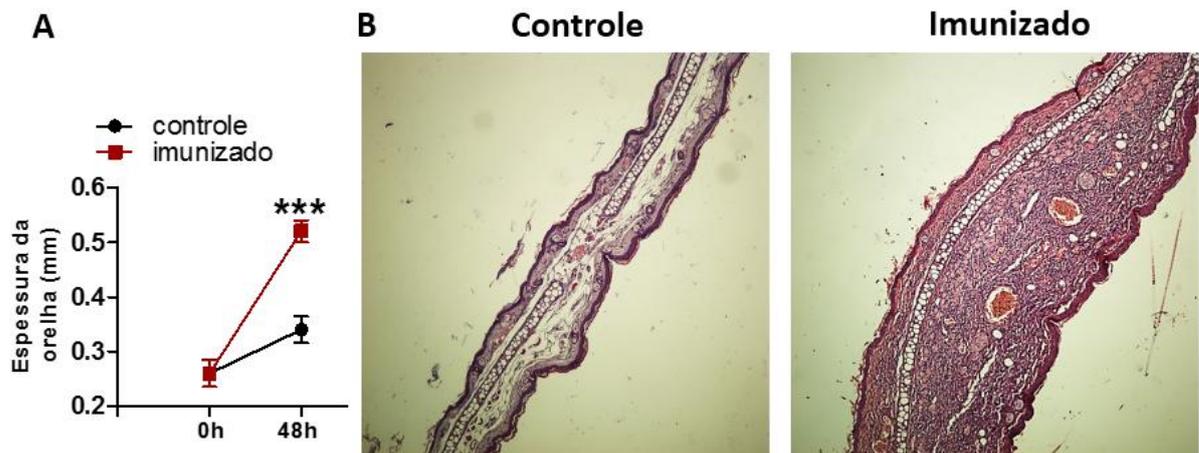


**Figura 10. Resposta imune humoral anti-saliva de *Lutzomyia whitmani*.** IgG total anti-saliva de *L. whitmani* em camundongos imunizados com SGS de *L. whitmani*. (A) Anterior a primeira imunização (T0), duas semanas após a primeira imunização (P1), duas semanas após a segunda imunização (P2) e duas semanas após a terceira imunização (P3). Os anticorpos foram detectados através da técnica ELISA. (B) *Western blot* utilizando o soro dos camundongos imunizados com o SGS de *L. whitmani*. \*\*\* $p < 0.001$ .

### 4.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM SALIVA DE *L. whitmani*

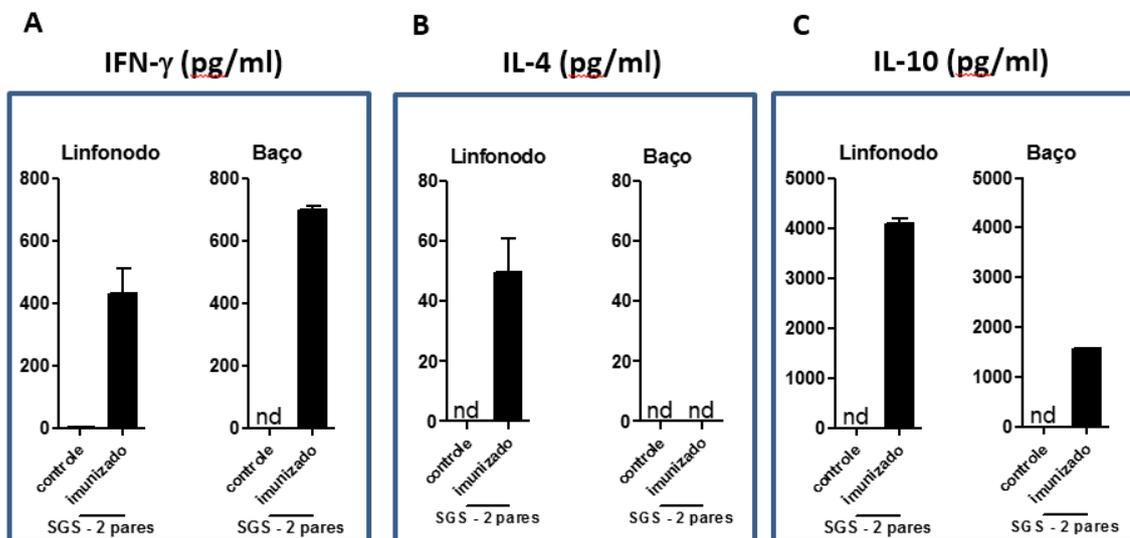
Com o objetivo de avaliar a capacidade da saliva de *L. whitmani* em induzir um infiltrado celular no sítio da inoculação em camundongos BALB/c, foi analisado o recrutamento celular na orelha dos animais imunizados com SGS do vetor e do grupo controle com salina. Também foi avaliado a capacidade das células T CD4<sup>+</sup> produzirem citocinas. Nestes mesmos grupos de animais, as células do linfonodo e do baço foram estimulados com SGS de *L. whitmani* (2 pares/poço). O sobrenadante foi coletado 72 horas depois para a dosagem de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.

Um intenso infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e congestão vascular foi observado na orelha dos animais imunizados com o SGS de *L. whitmani*, a qual também apresentou a espessura significativamente aumentada (figura 11A e 11B). O grupo inoculado com salina não apresentou nenhuma alteração significativa (figura 11A e 11B).



**Figura 11. Medida da espessura e histologia das orelhas dos camundongos BALB/c imunizados com saliva de *Lutzomyia whitmani*.** (A) A medida da espessura foi medida 48 horas após a injeção de 1 par de SGS na orelha oposta à que foi utilizada nas imunizações utilizando um paquímetro. (B) Secções dos tecidos das orelhas foram obtidas 48 horas após a inoculação da saliva. Os animais controles foram injetados com salina. Os tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as secções analisada por microscopia óptica. \*\*\* $p < 0.001$ .

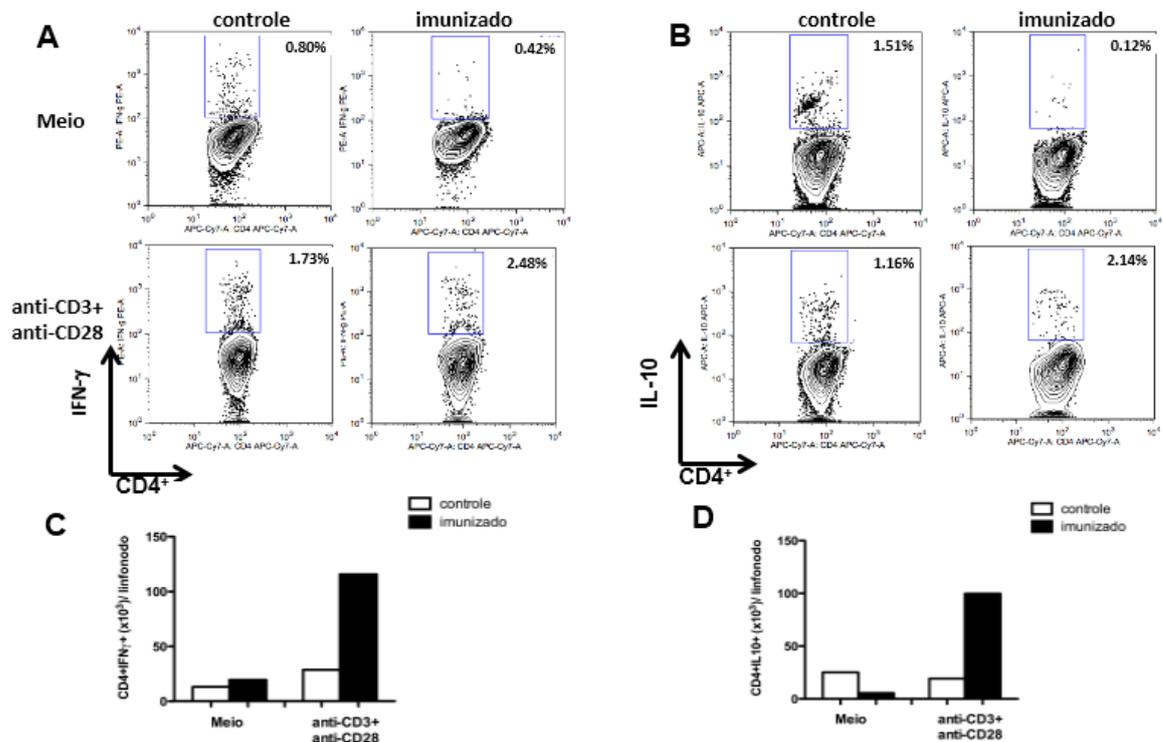
Simultaneamente à avaliação das orelhas, avaliamos também as citocinas produzidas nos linfonodos e baços dos animais controles e imunizados com SGS de *L. whitmani*. Para isso, os linfonodos e baços foram retirados no mesmo dia que as orelhas e foram re-estimulados *in vitro* na presença do SGS. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. A dosagem das citocinas nos mostrou que os animais imunizados com a saliva de *L. whitmani* foram capazes de produzir IFN- $\gamma$  no baço e no linfonodo, assim como IL-10. A citocina IL-4 foi detectada somente no linfonodo dos animais imunizados, mas numa concentração menor quando comparada com IFN- $\gamma$  e IL-10 (figura 12A, B e C).



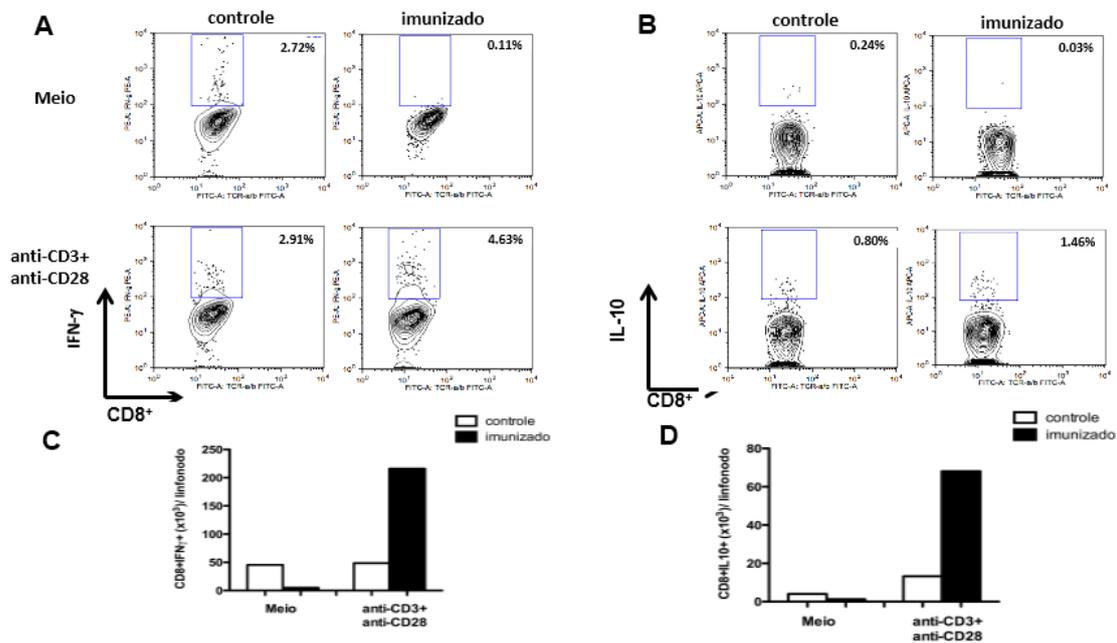
**Figura 12. Produção de citocinas pelo linfonodo e baço após estímulo com saliva.** O linfonodo e o baço dos camundongos BALB/c controle (salina) e imunizados 3 vezes com saliva de *Lutzomyia whitmani* foram obtidos e cultivados por 72 horas após o estímulo de 2 pares de SGS de *L. whitmani*. As citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) foram dosadas por ELISA no sobrenadante da cultura.

Posteriormente, verificamos a frequência e o número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> capazes de expressar as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos linfonodos dos animais imunizados (Figura 13 e 14). As células dos linfonodos dos animais controles (salina) e os animais imunizados com SGS de *L. whitmani* foram estimulados com anti-CD3 e anti-CD28 *in vitro*. Foi observado uma maior frequência e um maior aumento nos números absolutos de células T CD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$  (figura 13 A e C) e IL-10 (figura 13 B e D) no grupo de animais imunizados com SGS

de *L. whitmani*, quando comparados com os grupos controles. De maneira interessante, foi também verificado uma maior frequência, e um aumento nos números absolutos de células T CD8<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$  (figura 14 A e C) e IL-10 (figura 14 B e D), nos linfonodos dos animais imunizados com SGS de *L. whitmani* e estimulados *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28.



**Figura 13.** Frequência e número absoluto da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> no linfonodo após imunização com *Lutzomyia whitmani* SGS. Camundongos foram imunizados intradermicamente com um par de *L. whitmani* SGS ou salina (controle), três vezes com duas semanas de intervalo. Duas semanas após a última imunização, células do linfonodo foram estimuladas (anti-CD3 e anti-CD28) ou não (Meio) por 16h, coletadas e marcadas com TCR- $\beta$ , CD4, IFN- $\gamma$  e IL-10 para determinação da frequência de linfócitos T (A) CD4<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e (B) CD4<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. Número absoluto de linfócitos T (C) CD4<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e (D) T CD4<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. Dados representativos de dois experimentos independentes.

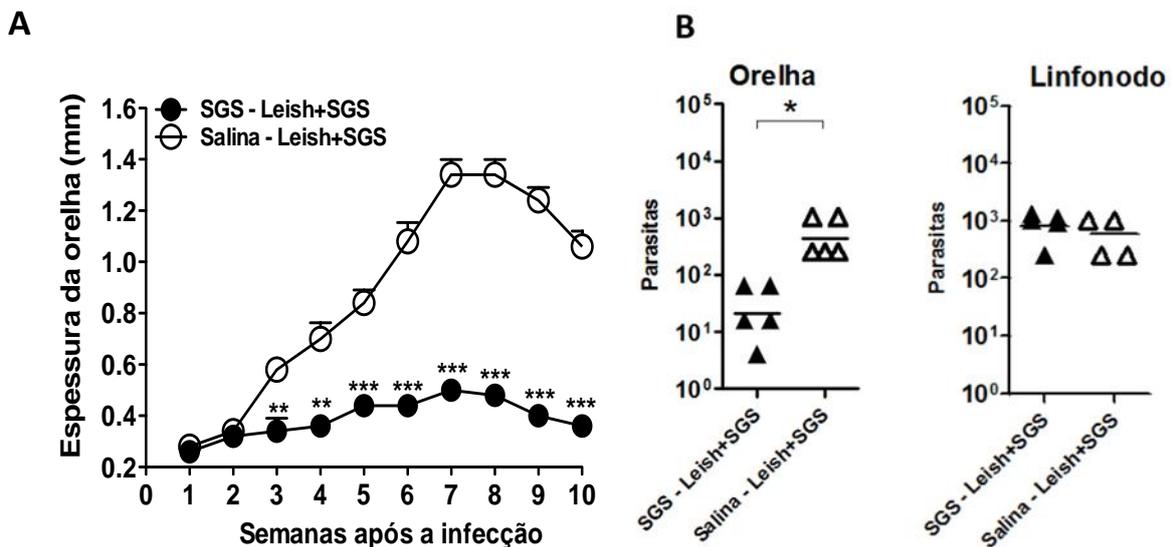


**Figura 14.** Frequência e número absoluto da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> no linfonodo após imunização com *Lutzomyia whitmani* SGS. Camundongos foram imunizados intradermicamente com um par de *L. whitmani* SGS ou salina (controle), três vezes com duas semanas de intervalo. Duas semanas após a última imunização, células do linfonodo foram estimuladas (anti-CD3 e anti-CD28) ou não (Meio) por 16h, coletadas e marcadas com TCR- $\beta$ , CD4, IFN- $\gamma$  e IL-10 para determinação da frequência de linfócitos T (A) CD8<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e (B) CD8<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. Número absoluto de linfócitos T (C) CD8<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e (D) T CD8<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. n=3. Dados representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.4 IMUNIDADE GERADA PELA SALIVA DE *L. whitmani* CONFERE PROTEÇÃO CONTRA *L. braziliensis*

Para avaliar se a imunização com saliva de *L. whitmani* altera o curso de infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, um novo grupo de animais foi imunizado com SGS de *L. whitmani* e posteriormente desafiado com *L. braziliensis* juntamente com SGS de *L. whitmani*. O desenvolvimento das lesões nas orelhas dos animais foi medido semanalmente durante dez semanas e, na décima semana, os animais foram sacrificados para a avaliação da carga parasitária na orelha e no linfonodo. Foi verificado que os animais imunizados com saliva de *L. whitmani* foram capazes de controlar as lesões de maneira significativa durante as 10 semanas em

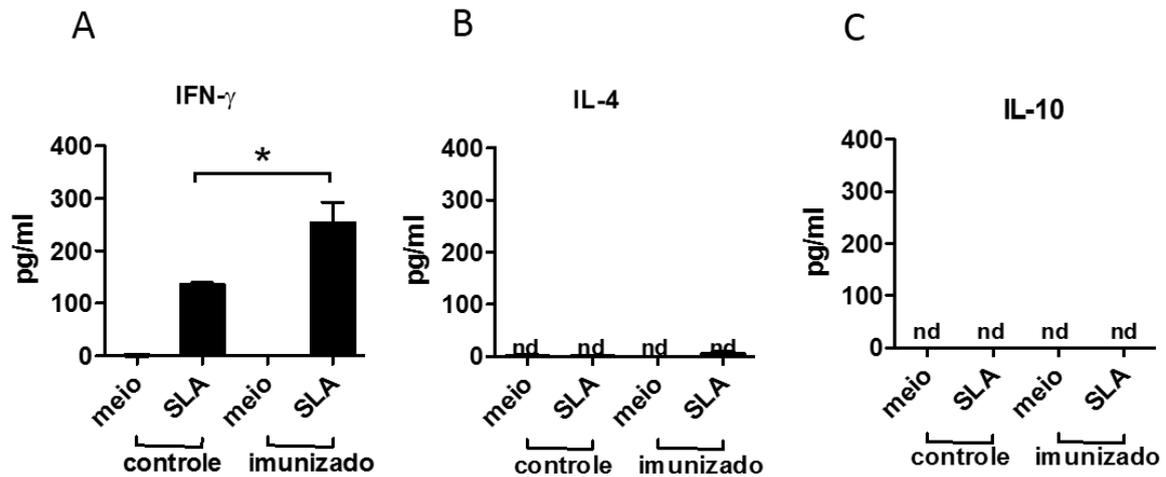
que foram acompanhados (figura 15A). O grupo controle imunizado somente com salina desenvolveu lesões que tiveram um aumento por volta da quarta semana, reduzindo em seguida e mantendo-se até a décima semana (figura 15A). Posteriormente, foi avaliado a carga parasitária na orelha e linfonodo dos animais imunizados com saliva de *L. whitmani* e o grupo controle na décima semana após a infecção com a *Leishmania*. Observou-se uma redução significativa na quantidade de parasitas encontrados na orelha dos camundongos imunizados com SGS de *L. whitmani*, quando comparada ao grupo controle (figura 15B). Entretanto, não foi observado nenhuma diferença na quantidade de parasitas nos linfonodos de ambos os grupos experimentais (figura 15B).



**Figura 15. Efeito da saliva de *L. whitmani* no curso da infecção por *L. braziliensis*.** Os camundongos BALB/c imunizados 3 vezes com saliva de *L. whitmani* foram desafiados com *L. braziliensis* mais SGS. O grupo controle foi injetado com salina. (A) O curso da infecção foi acompanhado durante 10 semanas. (B) Dez semanas após a infecção o grupo imunizado e controle foram sacrificados para a realização da carga parasitária na orelha e linfonodo. Dados representativos de 3 experimentos independentes. \*p < 0.05. \*\*p < 0.01. \*\*\*p < 0.001.

Com o objetivo de avaliar a resposta imune sistêmica dos animais imunizados com SGS de *L. whitmani* e protegidos contra o parasita, os baços destes animais foram obtidos na décima semana após a infecção e estimulados *in vitro* com o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). A produção de citocinas foi determinada por ELISA. Nos camundongos imunizados com saliva de *L. whitmani* foi observada uma produção significativamente maior de IFN- $\gamma$  após o estímulo com SLA quando

comparado com o grupo controle (figura 16 A). A produção de IL-4 e IL-10 não foi detectada tanto nos animais controle quanto nos imunizados com SGS de *L. whitmani* (figura 16B e C).

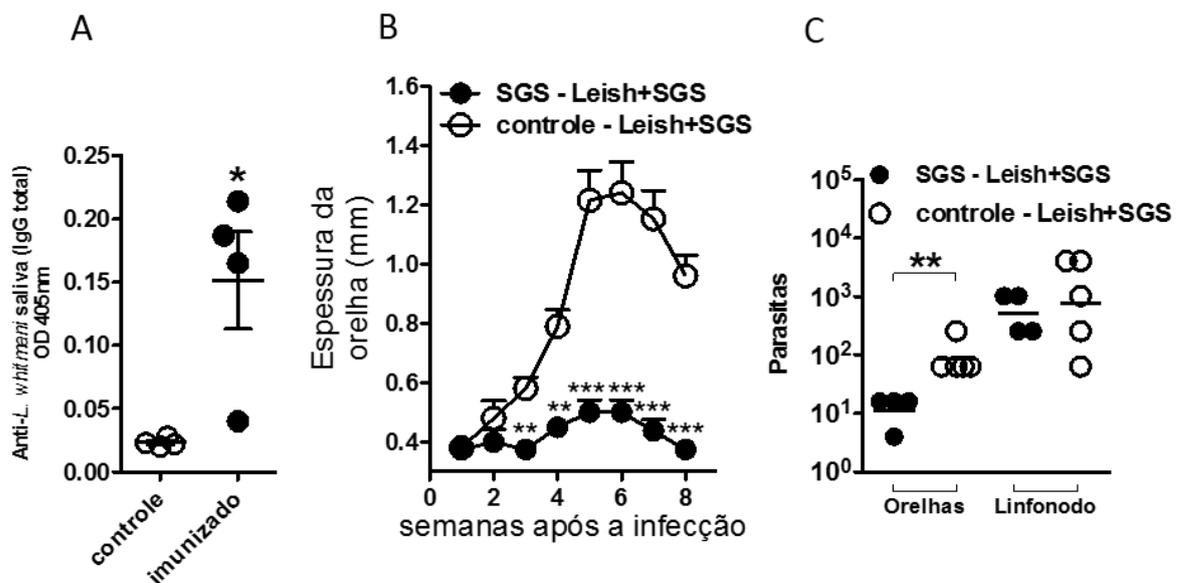


**Figura 16.** Dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c imunizados com SGS de *L. whitmani* e posteriormente desafiados com *L. braziliensis*+SGS. Camundongos BALB/c foram imunizados com SGS de *L. whitmani* (1 par/animal) ou salina (controle). Duas semanas após a última imunização os camundongos foram desafiados na derme da orelha esquerda com *L. braziliensis* ( $10^5$ /animal) mais SGS de *L. whitmani*. As células do baço foram coletadas 10 semanas após a infecção e estimuladas com 50 $\mu$ g/ml de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). A produção de citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) foi determinada por ELISA após 72 horas de cultivo *in vitro*. Dados representativos de 3 experimentos independentes. \* $p < 0.05$ .

#### 4.5 MEMÓRIA IMUNOLÓGICA GERADA PELA SALIVA DE *L. whitmani* CONFERE PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

Com o objetivo de avaliar se a imunização com o SGS de *L. whitmani* seria capaz de manter a resposta imune por um período de tempo maior, um novo grupo de camundongos foi imunizado e, 3 meses após a última imunização, foi desafiado com *L. braziliensis* mais saliva de *L. whitmani*. Foi observado que 3 meses após a última imunização, os camundongos apresentaram títulos de anticorpos IgG anti-saliva significativamente aumentados (figura 17A). O desenvolvimento das lesões nas orelhas dos animais foi medido semanalmente durante oito semanas e, na oitava semana, os animais foram sacrificados para a avaliação da carga parasitária

na orelha e no linfonodo. Os animais imunizados com saliva de *L. whitmani* foram capazes de controlar as lesões de maneira significativa durante as 8 semanas que foram acompanhados (figura 17B). O grupo controle imunizado somente com salina desenvolveu lesões que tiveram um aumento por volta da quarta semana, reduzindo de forma progressiva por volta da sexta semana (figura 17B). Ainda foi avaliado se havia correspondência entre o desenvolvimento da lesão e a replicação parasitária nos animais imunizados com saliva de *L. whitmani*. Para isto, na oitava semana após a infecção, a carga parasitária na orelha dos animais imunizados com saliva de *L. whitmani* foi analisada e observou-se uma redução significativa na quantidade de parasitas encontrados na orelha quando comparada ao grupo controle (figura 17C). Entretanto, não foi observado nenhuma diferença na quantidade de parasitas no linfonodo de ambos os grupos experimentais (figura 17C).



**Figura 17. Memória imunológica gerada pela saliva de *Lutzomyia whitmani* controla a infecção por *Leishmania braziliensis*.** Os camundongos BALB/c foram imunizados 3 vezes com saliva de *L. whitmani* e desafiados 3 meses após a última imunização com *L. braziliensis* mais o SGS de *L. whitmani*. O grupo controle foi injetado com salina. (A) A presença de anticorpos anti-SGS de *L. whitmani* foi determinada por ELISA, utilizando o soro de camundongos imunizados com SGS de *L. whitmani* ou salina. (B) O curso da infecção foi acompanhado durante 8 semanas. (C) Na oitava semana após a infecção o grupo imunizado e controle foram sacrificados para a realização da carga parasitária na orelha e linfonodo. Dados representativos de 3 experimentos independentes. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$ .

## 5 DISCUSSÃO

---

Apesar da importância do monitoramento de casos humanos e da presença do vetor na área endêmica, pouca atenção tem sido direcionada para avaliação de animais domésticos ou silvestres como indicadores de risco de exposição às Leishmanioses. Diversos programas de vigilância epidemiológica tanto na África, América do Norte, Ásia, Europa e Oceania vem utilizando há décadas animais sentinelas como estratégias de vigilância para detecção de exposição desses vertebrados aos vetores de diversas doenças, como é o caso do Vírus do Oeste do Nilo (WNV), doença de Lyme, encefalite de St. Louis, dentre várias outras (revisado em RACLOZ, *et al.*, 2007).

No presente trabalho foi possível monitorar a presença de *L. intermedia* e *L. whitmani*, dois importantes vetores da LTA numa região endêmica para a doença no interior da Bahia, os quais predominaram nos locais de coleta representando em torno de 51% e 40%, respectivamente, de todos os flebotomos coletados. Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo nessa mesma área demonstrou a presença dessas duas espécies, porém com predomínio de cerca de 10 vezes de *L. whitmani* sobre *L. intermedia* (MIRANDA *et al.*, 2002). Ao considerar que durante esse período, essa mesma região sofreu importante intervenção humana com a expansão da agricultura, ocupação urbana, extração de madeira e o forte cultivo de cacau o que provocou a devastação da floresta Atlântica e modificação da cobertura vegetal, o que certamente pode ter alterado os nichos biológicos dos flebotomos presentes e suas produções. Em outro distrito municipal do interior da Bahia, Jitaúna, com aspectos fitogeográficos muito semelhantes a Corte de Pedra, um estudo desenvolvido em 2003 também relatou a presença massiva de *L. whitmani* e *L. intermedia*, sendo a primeira a mais abundante (DIAS-LIMA, *et al.*, 2003). Miranda e colaboradores (2002), observou através das coletas que *L. whitmani* apresentou-se predominantemente em ambiente peridomiciliar, o que corroborava com os resultados encontrados no presente trabalho. Uma terceira espécie de flebotomo encontrada na região foi *L. migonei*, que apesar de apresentar uma predominância local menor que *L. whitmani* e *L. intermedia*, tem sido associada com a transmissão

de leishmaniose cutânea, além de ser principalmente encontrada nos ambientes silvestres e nos peridomicílios em áreas endêmicas (RANGEL, *et al.*, 2009).

Atualmente, é conhecida uma variedade de animais que já foram identificados como fontes alimentares de flebótomos (BOREHAM, 1975, apud LAINSON & SHAW, 1979; CHRISTENSEN *et al.*, 1982; TESH *et al.*, 1971). Estudos com insetos vetores do gênero *Lutzomyia* mostram que o caráter oportunista parece predominar na alimentação desses insetos que podem se alimentar em uma ampla variedade de vertebrados. As combinações nas alimentações sanguíneas relatadas por diversos autores apontam que frequentemente sangue de aves é encontrado no conteúdo estomacal destes insetos (DIAS, LOROZA e REBÊLO, 2003; AFONSO *et al.*, 2012). A preferência alimentar por aves bem como o papel das mesmas na cadeia de transmissão da doença ainda não é bem esclarecida (ALEXANDER *et al.*, 2002 e REBÊLO 2003). Galinhas são animais criados com facilidade e abundância nos peridomicílios em áreas endêmicas e, apesar de não atuarem como reservatório são importantes na atração e manutenção da fauna flebotomínica, sendo consideradas como fator de risco em áreas de transmissão de leishmanioses (ALEXANDER *et al.*, 2002; CALDAS *et al.*, 2004). Por constituir forte atrativo para vetores e/ou facilidade destes em se alimentarem, aves são usadas como animais sentinelas em diversos estudos para monitoramento de transmissão de doenças (KOMAR, *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi avaliado o papel de galinhas como sentinela, tendo como objetivo a utilização destas aves como monitores de exposição a flebótomos na área de estudo. Galinhas imunizadas experimentalmente desenvolveram gradativamente anticorpos anti-saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*, demonstrando a capacidade da saliva dessas duas espécies em produzir uma resposta imune humoral específica. Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório com imunizações de galinhas com SGS de *L. longipalpis*, também demonstrou a presença de altos títulos de anticorpos anti-saliva (SOARES *et al.*, 2013).

Ao avaliar a soroconversão contra proteínas salivares em galinhas expostas naturalmente a picadas dos vetores, notou-se que o aumento significativo na produção destes anticorpos ocorreu a partir do sexto mês de exposição em área endêmica para os antígenos salivares de *L. intermedia* e a partir do quarto mês para os antígenos de *L. whitmani*. Em estudos realizados com indivíduos residentes em

área endêmica para LV é sugerido que a presença de anticorpos anti-saliva seja resultado da exposição natural à picada de flebotomíneo, o que pode influenciar na epidemiologia da doença (BARRAL *et al.*, 2000). Outro estudo do nosso grupo observou que galinhas naturalmente expostas às picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV foram capazes de soroconverter a partir do quarto mês de exposição (SOARES, *et al.*, 2013). Todavia, a resposta de anticorpos anti-saliva avaliada no presente estudo pode ser considerada tardia quando comparadas com respostas imunes geradas por galinhas expostas a triatomíneos, onde em apenas dois dias de exposição à picada dos insetos, foi possível detectar uma resposta precoce com baixos títulos de anticorpos contra seus antígenos salivares (SCHWARZ *et al.*, 2009). Estes achados nos leva a concluir que a exposição regular e frequente de galinhas a saliva dos vetores da LTA, assim como outros hospedeiros vertebrados, mantêm elevados os níveis de anticorpos anti-saliva. Apesar de galinhas serem consideradas sentinelas ideais por não se infectarem por *Leishmania* estas também são consideradas como fator de risco em áreas de transmissão de leishmanioses, visto que são responsáveis pela manutenção da população de vetores e atração de animais que são reservatórios para o ambiente do peridomicílio (ALEXANDER *et al.*, 2002).

Para avaliar a especificidade da resposta humoral anti-saliva nestas mesmas aves, foram realizados testes de *western blot* utilizando a saliva total de *L. intermedia* e *L. whitmani*. Apesar da diversidade das proteínas salivares, nossos resultados indicaram que apenas duas proteínas possuem reconhecimento específico por soros das galinhas naturalmente expostas às picadas de cada vetor. O experimento mostrou que a imunização por meio do uso de um adjuvante de *Freund*, promoveu o reconhecimento por uma quantidade maior de proteínas salivares sendo reconhecidas como as proteínas mais imunogênicas. Em 2013, Soares e colaboradores mostraram que galinhas naturalmente expostas às picadas de *L. longipalpis* foram capazes de produzir anticorpos que reconheciam oito proteínas salivares do vetor, dentre elas uma proteína de 45 kDa, uma de 35 kDa e uma de 61,5 kDa. Os achados do nosso trabalho demonstram pela primeira vez a produção de anticorpos anti-saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani* em galinhas expostas em área endêmica de LTA.

Após testar a resposta imune de galinhas contra componentes totais da saliva dos flebótomos *L. intermedia* e *L. whitmani* para predizer exposição em área endêmica para LTA, analisamos a reatividade cruzada em soro de galinhas expostas a picadas de outros insetos hematófagos vetores de doenças. Em nosso estudo, verificamos que antígenos totais da saliva de *L. longipalpis* podem ser reconhecidos por aves experimentalmente imunizadas com saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani* e aves naturalmente expostas à esses vetores, sendo a proteína mais fortemente reconhecida de aproximadamente 45 kDa. Para avaliar a existência de reação cruzada entre o reconhecimento dos componentes salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani*, analisamos se galinhas que haviam sido expostas às picadas de triatomíneos, culicídeos e ao próprio *L. longipalpis* reconheceriam proteínas salivares desses flebótomos vetores da LTA. Observamos que em nenhum dos casos analisados houve reconhecimento protéico de qualquer componente salivar de ambos os vetores. De acordo com NASCIMENTO e colaboradores (2001) e BARBOSA e colaboradores (2004) alguns antígenos salivares de insetos vetores são compartilhados e podem ser reconhecidos entre diferentes espécies hospedeiras, como a proteína de 79 kDa precursora da apirase, membro da família 5'-nucleotidase e inibidora da agregação plaquetária que é reconhecida por coelhos, cobaias e humanos expostos a outras espécies vetores. De Moura e colaboradores (2013), mostrou que as proteínas da família yellow também estão presentes na saliva de *L. intermedia*, além do próprio *L. longipalpis*. Em estudos anteriores Teixeira e colaboradores em 2010 e SOUZA e colaboradores (2010) testaram as proteínas recombinantes LJM11 e LJM17, da família yellow da saliva de *L. longipalpis*, para verificar reatividade cruzada em soros de indivíduos residentes em área de LTA. Concluindo-se que indivíduos expostos em uma área endêmica de LTA não são capazes de reconhecer antígenos salivares do vetor da LV. Supreendentemente, os nossos dados revelaram que galinhas imunizadas com SGS de *L. intermedia* e *L. whitmani* foram capazes de reconhecer alguns componentes salivares de *L. longipalpis*, sendo a mais evidente a proteína de aproximadamente 45 kDa. Esse reconhecimento possivelmente deve ter ocorrido devido ao fato de alguns componentes salivares de *L. longipalpis* apresentarem-se mais imunogênicos e/ou em maiores quantidades que os encontrados na saliva de *L. intermedia* e *L. whitmani*, culminando em um notório reconhecimento protéico da saliva de *L.*

*longipalpis* por essas aves. Para avaliar a existência de reatividade cruzada entre os componentes salivares de *L. intermedia* e *L. whitmani*, devido à proximidade filogenética, já que ambos pertencem ao subgênero *Nyssomyia* e coexistem, resolvemos testar se as galinhas experimentalmente imunizadas com SGS de *L. intermedia* eram capazes de reconhecer antígenos salivares e *L. whitmani* e, se galinhas imunizadas com SGS de *L. whitmani* reconheciam antígenos salivares de *L. intermedia*. Os resultados descritos neste trabalho mostraram que algumas poucas proteínas foram reconhecidas em ambos os casos, sendo mais uma vez a proteína similar à família yellow a mais fortemente reconhecida.

Para verificar a exposição natural à saliva de insetos vetores, a grande maioria dos trabalhos científicos são realizados com sorologias em humanos, porém, a utilização de sorologias humanas em área de transmissão deve ser realizada para verificação de incidência de uma doença. Estudos desta natureza possuem limitações quanto ao uso dos dados e tendem a possíveis vieses, como por exemplo, a dificuldade em determinar o real local da infecção devido a facilidade em se locomover por longas distâncias em um curto período de tempo (KWAN *et al.*, 2010). Assim para monitoramento de áreas de transmissão de LTA a utilização de galinhas como sentinela não traz problemas éticos tão pouco risco a população local, pois estas são incapazes de se infectar por *Leishmania*, podendo indicar os “verdadeiros territórios criadouros de vetores”, tendo em vista que galinhas não alcançam longas distâncias do local de criação. Portanto, estudos epidemiológicos com o modelo de ave sentinela são inovadores em substituição ao modelo humano podendo ser útil para implementação de programas de controle de vigilância epidemiológica (KWAN *et al.*, 2010). A avaliação da densidade vetorial também configura-se uma das ferramentas mais amplamente utilizada pelo Ministério de Saúde, como método de detecção do vetor na área. Entretanto, trata-se de um método muito laborioso e que demanda tempo, equipamentos adequados e profissionais treinados para realizar as diversas tarefas que compõe esse método: como a coleta realizada por meio de armadilhas especialmente projetadas para captura de dípteros; a triagem; o processo de clarificação para visualização de estruturas taxonomicamente importantes; montagem das espécimes em lâminas próprias para a microscopia; e identificação da espécie por meio das características morfológicas específicas (YOUNG e DUNCAN, 1994). Dessa forma, a galinha surge

como uma excelente ferramenta de detecção da presença do vetor na área pela avaliação da produção de anticorpos contra a saliva do flebótomo.

Conforme já foi mencionado, a saliva de flebótomos, assim como de outros insetos hematófagos, contém um repertório de moléculas capazes de interferir com as respostas hemostática, inflamatória e imune do hospedeiro vertebrado (revisado em TITUS & RIBEIRO, 1990). Em modelos experimentais da leishmaniose, observou-se que moléculas da saliva de flebótomos exacerbam a infecção causada por *L. major* por facilitar o estabelecimento do parasita (TITUS & RIBEIRO, 1988; KAMHAWI *et al.*, 2000). Por outro lado, a pré-exposição de camundongos a flebótomos não infectados confere proteção à infecção por *L. major* (BELKAID *et al.*, 1998). Essa proteção foi associada ao desenvolvimento de uma resposta do tipo DTH no sítio da inoculação do parasita (KAMHAWI *et al.*, 2000). A imunização com moléculas presentes na saliva como maxadilan (MORRIS *et al.*, 2001) ou PpSP15 (VALENZUELA *et al.*, 2001, OLIVEIRA *et al.*, 2008) também induz proteção contra LC causada por *L. major*. Diversos estudos demonstraram experimentalmente a capacidade protetora das proteínas salivares contra a infecção por algumas espécies de *Leishmania*, incluindo a forma fatal da doença, a leishmaniose visceral (GOMES *et al.*, 2008). A demonstração de que proteínas salivares de flebótomos induzem uma resposta imune protetora específica em hospedeiros vertebrados, trouxe a possibilidade de utilizá-las como um novo componente na busca de uma vacina contra as leishmanioses (GOMES e OLIVEIRA, 2012). Estudos utilizando a *L. braziliensis*, causadora da LC nas Américas e a saliva de *L. intermedia*, seu principal transmissor, foram feitos com o objetivo de avaliar este possível efeito protetor neste cenário encontrado no novo mundo. Interessantemente, a imunização de camundongos BALB/c com as proteínas salivares de *L. intermedia* não foram capazes de proteger contra a infecção por *L. braziliensis* (DE MOURA *et al.*, 2007). No presente estudo, nós demonstramos que camundongos imunizados com a saliva de *L. whitmani*, vetor da *L. braziliensis*, apresentam uma resposta imune específica contra a saliva do flebótomo e essa resposta foi capaz de proteger contra a infecção por *L. braziliensis*. Concluímos que as proteínas presentes na saliva geram resposta imune duradoura, a qual está relacionada com a resistência à infecção por *L. braziliensis*.

*Lutzomyia whitmani* é também incriminado como vetor da *L. braziliensis* e capturado em grande quantidade nas áreas de transmissão de LC humana na Bahia (MIRANDA *et al.*, 2002). Até o momento, somente um trabalho científico foi realizado demonstrando a capacidade exacerbadora da saliva de *L. whitmani* após ser inoculada juntamente com *L. braziliensis* na pata de camundongos. A sua capacidade em induzir uma resposta imune nestes animais e posteriormente um efeito protetor não foi investigado nesta publicação por Bezerra e Teixeira (2001). Portanto, no presente trabalho o objetivo proposto foi o de avaliar a capacidade da saliva de *L. whitmani* em induzir uma resposta imune em camundongos BALB/c, e se esta resposta imune seria capaz de proteger contra um desafio composto da saliva do próprio vetor juntamente com *L. braziliensis*.

Com essa finalidade, inicialmente, foi avaliado um modelo experimental de LC murino através da co-inoculação de SGS de *L. whitmani* juntamente com *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c. Nós empregamos o mesmo modelo de imunização previamente utilizado para a análise das propriedades imunogênicas da saliva de *L. intermedia* (DE MOURA, *et al.*, 2007). Trabalhos anteriores demonstraram que variações na exposição às picadas de flebótomos podem conduzir a diferentes resultados no curso da infecção (ROHOUSOVÁ, 2011). Nossos resultados demonstraram que a inoculação intradérmica do parasita juntamente com a saliva de *L. whitmani*, não exacerba a lesão no tecido e não aumenta a carga parasitária como descrito no modelo de co-inoculação subcutânea com SGS de *L. whitmani* e *L. braziliensis* proposto por Bezerra e Teixeira (2001). O modelo murino de LC estabelecido via inoculação intradérmica, é o que melhor mimetiza o que ocorre na natureza por ser a via de transmissão natural, e pelo fato do tecido da derme ser um tecido mais vascularizado e também um sítio inicial da resposta imune nos vertebrados. Além disto, a imunização com componentes salivares do vetor trouxe um avanço ao modelo experimental principalmente quando se propõe avaliações de candidatos a vacinas baseadas na saliva das mais diferentes espécies de flebótomos (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014; KAMHAWI; ASLAN; VALENZUELA, 2014). Apesar do modelo experimental murino utilizando *L. braziliensis* mais a saliva de *L. whitmani* ter sido estabelecido através da inoculação subcutânea, o modelo de inoculação intradérmica é o que melhor se adequa aos

estudos de avaliação da capacidade protetora da saliva de *L. whitmani* observados neste trabalho.

A seguir, foi investigado as propriedades imunogênicas da saliva de *L. whitmani*. Nós observamos que camundongos imunizados com o SGS de *L. whitmani* desenvolvem uma resposta imune humoral específica como apresentado por ELISA e *Western blot*. Anticorpos anti-saliva de flebótomos tem sido induzidos pelas as mais variadas espécies e, apesar de serem comprovadamente marcadores específicos de exposição, não estão relacionados à proteção contra o parasita (GOMES *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2010; VALENZUELA *et al.*, 2001). Por sua vez, a resposta imune celular induzida por proteínas salivares e composta de células T CD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$ , tem sido considerada efetora contra a infecção por *Leishmania* (GOMES *et al.*, 2012; VALENZUELA *et al.*, 2001). Nossos resultados demonstraram que camundongos imunizados com SGS de *L. whitmani* desenvolveram anticorpos anti-saliva, mas também um intenso infiltrado inflamatório no local da imunização, acompanhado de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nos linfonodos drenantes dos mesmos animais. O fato de termos detectado em baixa quantidade a citocina IL-4 e, ao contrário, IL-10 em grande quantidade, nos leva a sugerir um papel regulador da IL-10 já que foi observado um intenso infiltrado celular. A capacidade de induzir um infiltrado celular composto basicamente por células mononucleares (CD4<sup>+</sup>, NK e macrófagos) induzidos pela saliva flebótomos foi demonstrado previamente em estudos experimentais (CARREGARO *et al.*, 2013, MONTEIRO *et al.*, 2007). A participação desta resposta celular contra a saliva do vetor parece ser essencial para a proteção contra a *Leishmania* nos modelos animais avaliados.

De Moura e colaboradores (2007) demonstraram em camundongos imunizados com a saliva de *L. intermedia*, o principal vetor da LC no Brasil, a presença de células polimorfonucleares nos cortes histológicos e a produção da citocina IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>, além da produção de IL-10 e IL-4. Este mesmo perfil de citocinas foi demonstrado no presente trabalho. Nas leishmanioses, o papel destas citocinas tem sido exaustivamente discutida. IFN- $\gamma$  está associada ao controle das infecções por *Leishmania*, induzindo uma resposta imune celular com o perfil Th1 (KIMA; SOONG, 2013). Estudos anteriores mostraram que camundongos

infectados com *L. braziliensis* e posteriormente depletados de IFN- $\gamma$ , desenvolvem lesões crônicas graves, perdendo a capacidade de controlá-las (DE SOUZA-NETO, *et al.*, 2004). A produção de IFN- $\gamma$  induzida pelo desafio com *Leishmania* mais saliva sugere a existência de uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) que cria um ambiente inóspito para a sobrevivência do parasita (KAMHAWI, *et al.*, 2000; GOMES, *et al.*, 2008; OLIVEIRA, *et al.*, 2008). A citocina IL-10, conforme mencionado anteriormente, apresenta um efeito regulador sendo considerada uma citocina anti-inflamatória, enquanto a IL-4 é considerada uma citocina mais relacionada com um perfil Th2, responsável pelo fenótipo de susceptibilidade, principalmente em camundongos BALB/c. Em especial, os estudos avaliando a resposta imune celular após a imunização com SGS de flebótomos, tem demonstrado que a resposta imune inicial específica contra a saliva do vetor, com produção principalmente de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>, é essencial para a contenção do parasita.

A imunização com os componentes salivares de *L. whitmani* foi capaz de promover proteção após o desafio com a *L. braziliensis* mais o SGS de *L. whitmani*. O mesmo tem sido observado em animais imunizados com a saliva de outros flebótomos e desafiados com outras espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2011). Por outro lado, o evento oposto foi observado no estudo realizado por De Moura e colaboradores (2007) com a saliva de *L. intermedia*, que demonstrou que a mesma não foi capaz de proteger após o desafio com a *L. brasiliensis* em camundongos BALB/c. Este efeito não protetor deve-se provavelmente aos diferentes componentes proteicos existentes na saliva total de *L. intermedia* que induzem perfis distintos de resposta imune contra a saliva. Por outro lado, a proteína salivar Linb-11, selecionada da saliva total de *L. intermedia*, foi capaz de proteger contra o desafio de *L. braziliensis* mais o SGS de *L. intermedia*, demonstrando a necessidade de se avaliar separadamente as proteínas salivares que compõe o extrato total, já que elas comprovadamente podem induzir respostas imunes diferenciadas (DE MOURA *et al.*, 2013). Embora *L. whitmani* e *L. intermedia* possam ser encontrados nas mesmas áreas endêmicas para LT nós não podemos afirmar se existe uma resposta imune protetora cruzada contra a saliva dessas duas espécies de flebótomos. Trabalhos anteriores mostraram que a imunização com a saliva de espécies de flebótomos filogeneticamente relacionadas pode resultar em

proteção cruzada. Lestínová e colaboradores (2015) mostrou que a imunização com saliva de *P. papatasi* resultou em proteção contra a infecção quando *L. major* foi inoculada junto com a saliva de *P. papatasi* ou *P. duboscqi*. Todavia, em outro estudo, a resposta imune protetora contra a infecção por *L. amazonensis* na presença da saliva de *L. longipalpis* foi apenas observada quando os camundongos foram imunizados com a saliva de *L. longipalpis*, porém o mesmo não aconteceu quando os camundongos foram imunizados com a saliva de *P. papatasi* ou *P. sergenti*. Eles sugeriram que a proteção pode ser espécie-específica, especialmente entre espécies filogeneticamente relacionadas (THIAKAKI, 2005)

Os resultados apresentados neste trabalho ainda mostraram que a saliva de *L. whitmani* confere proteção contra a infecção por *L. braziliensis* mesmo após 3 meses da última imunização. O fenômeno de dessensibilização aos antígenos salivares de flebotomos vem sendo relatados em exposições de longo prazo a flebotomos em áreas endêmicas. Em 2011, Rohousova e colaboradores mostraram que camundongos expostos às picadas de *Phlebotomus duboscqi* perdiam a proteção contra a infecção após algumas semanas de contato com os componentes salivares do vetor. De fato, como mencionado anteriormente, a busca por proteínas salivares de flebotomos como candidatos a uma vacina que possa conferir proteção duradoura contra as leishmanioses tem sido alvo de incessantes pesquisas em diversas partes do mundo. Além do fato de *L. whitmani* e *L. intermedia* coabitarem na mesma área de transmissão de LC, e o fato de ambas as espécies serem comprovadamente incriminados vetores da *L. braziliensis*, torna o estudo das proteínas salivares destes vetores ainda mais interessantes (MIRANDA *et al.*, 2002). No entanto, ainda existe extensa necessidade de futuros estudos a fim de esclarecer mais precisamente quais proteínas possuem capacidade de conferir proteção e qual a relação de resposta imunológica existe entre ambos os vetores coexistentes nas áreas endêmicas. Além disto, o estabelecimento de um modelo de transmissão natural utilizando *L. whitmani* infectado com *L. braziliensis* seria desejável para avaliar a real capacidade protetora destas proteínas salivares.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho, sugerem a importância da utilização de proteínas salivares de flebotomos em induzir uma resposta imune e a sua possível utilização como componente em uma vacina contra a *Leishmania*,

assim como ressalta a necessidade de ampliar as pesquisas em direção de um mais profundo conhecimento acerca das diversas espécies de vetores co-existentes nas áreas endêmicas.

## 6 CONCLUSÃO

---

O desenvolvimento deste trabalho permitiu estudar a possibilidade de uso dos componentes salivares de flebótomos de uma área endêmica para LTA como marcadores de exposição aos vetores em galinhas. Também foi possível analisar pela primeira vez as propriedades antigênicas da saliva de *L. whitmani*, observando que a pré-exposição à saliva desse vetor apresenta um importante papel na proteção contra a infecção por *L. braziliensis*.

## 7 REFERÊNCIAS

---

ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infect. Genet. Evol.**, 2014

AFONSO, M. M. S.; et al. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **J. Trop. Med.**, p. 1-5, 2012.

ALESSI, C. A. C.; et al. American cutaneous leishmaniasis in the Pontal of Paranapanema - SP, Brazil: ecological and entomological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, p. 277-282, 2009.

ALEXANDER, B.; et al. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 8, p. 1480-1485, 2002.

ALEXANDER, B.; USMA, M. C. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 5, p. 543-549, 1994.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **Hist. Cienc. Saúde -Manguinhos**, v. 10, n. 3, p.853-882, 2003.

ANDRADE, B. B.; et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An. Acad. Bras. Ciên.**, v. 77, p. 665-693, 2005.

ANDRADE, B. B.; et al. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, p. 122-127, 2007.

ANDRADE-FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Geographical Distribution and Epidemiological Importance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 481-487, 2007.

AZEVEDO, A. C. R.; et al. Natural infection of *L. (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 251, 1990

BARRAL, A.; et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 587-592, 1992.

BARRAL, A.; et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n.3, p. 256-259, 1995.

BARRAL, A.; et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, n. 6, p.740-745, 2000.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, n. 3, p. 35-39, 2009

BARRAL- NETTO, M.; et al. Recent Advances in Physiopathology and Treatment of Human Cutaneous Leishmaniasis. **Curr. Opin. Dermatol.**, v. 4, p. 51-58, 1997.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BASANOVA, A. V.; BASKOVA, I. P.; ZAVALOVA, L. L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry**, v. 67, p. 143-50, 2002.

BELKAID, Y.; et al. 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.**, v. 188, n. 10, p. 1941-1953, 1998.

BEZERRA, H. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 349-351, 2001.

BITTENCOURT, A. L. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) – Histological and ultrastructural aspects. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, n.3, p. 45-51, 2009.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. Protozoários. In: **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BOWMAN, A. S.; et al. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, n. 3, p. 85-277, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação**: Bahia. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, p.35, 2011.

BRAVO, F. G.; MOHANNA, S. A. Parasitology. In: HALL, J. C; HALL, B, J (Org.). **Skin Infect. Diagn. and Treatment**. New York: Cambridge University Press, 2009, p. 117- 134.

CAMPOS, D.; et al. Diversidade de espécies de flebotomíneos (díptera: psychodidae: phlebotominae) encontradas no zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá-MT. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 65., 2013, Recife.

CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n.7, p. 979-984, 2005.

CARDOSO, P. G.; et al. Flebotomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, p. 146-150, 2009.

CARREGARO, V.; et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiol.**, v. 13, n. 102, p. 1-11, 2013.

CARFAN A. C.; et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: o caso do conjunto residencial Inocente Vilanova Júnior no município de Maringá, Estado do Paraná, 2001-2004. **Acta Scient. Health Sci.**, v. 26, n.2, p. 341-344, 2004.

CARVALHO, A. M.; et al. Individuals naturally exposed to *Lutzomyia intermedia* sand flies develop an IL-10-dominant immune response and are increased risk of developing Cutaneous Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, 2015.

CARVALHO, L. P.; PASSOS S. T.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, p. 57-65, 2005.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 301-309, 2012.

CHAMPAGNE, D. E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 430-433, 1994.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol. Haemost. Thromb**, Georgia, v. 34, n. 4-5, p. 7-221, 2005.

CHARLAB, R.; et al. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 15155-15160, 1999.

CHEVALIER, V.; et al. Climate change and vector-borne disease. **Climate Change Agriculture Worldwide**. 2016. p. 97-108,

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J Investig Dermatol Symp Proc.**, v. 6, n. 3 p. 175-182, 2001.

CORNELIE, S.; et al. Insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. **Malar. J.**, v. 6, p. 75, 2007.

COSTA, J. M. L.; et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 79, n. 3, p. 70-83, 2009.

DA COSTA, S. M.; et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 149-153, 2007.

DA SILVA, L. M. R.; CUNHA, P. R. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 6, p. 515-519, 2007.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **J. Bacteriol. Parasitol.**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2013.

DE MOURA, T. R.; et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DE MOURA, T. R.; et al. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. **PLOS Neglect. Trop. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2007.

DE MOURA, T. R.; et al. Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. **PLOS Neglect. Trop. Dis.**, v. 7, n. 5, p. e2242, 2013.

DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n.1, p. 35-45, 2005.

DE QUEIROZ, R. G.; et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in baturite municipality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 6, p. 693-698, 1994.

DE SOUZA-NETO, S. M.; et al. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 99, n.3, p.289-294, 2004.

DONNELLY, R. P.; FREEMAN, S. L.; HAYES, M. P. Inhibition of IL-10 expression by INF-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. **J. Immunol.**, n. 155, p. 1420-1427, 1995.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose.** São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1973. v.4. 658p.

GALATI, E. A. B; et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Pychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 2, 1996.

GOMES, R.; et al. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J Infect Dis**, v.186, n.10, Nov 15, p.1530-4. 2002.

GOMES, R.; et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 22, p.7845-7850, 2008.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 110, p.1-8, 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.

GUIMARÃES, L. H.; et al. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, p. 66-74, 2005.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 4, p. 433-444, 2004.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38 n. 11 p.4219-4221. 2000.

KAMHAWI, S.; et al. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290 n. 5495, p. 1351–1354, 2000.

KAMHAWI, S.; ASLAN, H.; VALENZUELA, J. G. Vector saliva in vaccines for visceral leishmaniasis: a brief encounter of high consequence? **Front. Publ. Health.**, v. 2, n. 99, p. 1-6, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 4, n. 156, p. 1-5, 2013.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LANE, R. S.; et al. Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 850–859, 1999.

LERNER, E. A.; et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 17, p. 11234-11236, 1991.

LESSA, M. M.; et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LESTINOVA, T.; et al. *Phlebotomus papatasi* exposure cross-protects mice against *Leishmania major* co-inoculated with *Phlebotomus duboscqi* salivary gland. **Acta Trop.**, v. 144, p. 9-18, 2015.

LLANOS-CUENTAS, E. A.; et al. Human Mucocutaneous Leishmaniasis in Três Braços, Bahia – Brazil, an Area of *Leishmania braziliensis braziliensis* Transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 17, p.169-177, 1984.

MARCONDES, C. B. Redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, p. 457-462, 1996.

MARCONDES, C. B., BORGES, P. S. S. Distinction of males of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) species complex by ratios between dimensions and by an artificial neural network (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 95, p. 685-688, 2000.

MARSDEN, P. D., JONES, T. C. Clinical Manifestations, diagnosis and treatment of Leishmaniasis. **Human Parasit. Dis.**, v. 1, p. 183-198, 1985.

MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. American Sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Acad. Bras. Ciências**, Rio de Janeiro, 195p. 1978.

MBOW, M. L.; et al. *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.** v. 161, n. 10, p. 5571-5577, 1998.

MENESES, C. R. V.; et al. Micro-geographical Variation Among Male Populations of Sandfly, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*, from an endemic area of American cutaneous Leishmaniasis in State of Rio de Janeiro, Brazil. **Med. Vet. Entomol.**, v. 19, n. 1, p. 38-47, 2005.

MENEZES, M. J.; et al. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BMC Immunol.**, v. 9, 2008.

MIRANDA, J. C.; et al. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 2 p. 185-188, 2002.

MODI, G. B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) in the laboratory. **J. Med. Entomol.**, v. 20, n. 5, p. 568-569, 1983.

MONTEIRO, M. C.; et al. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.76, n. 1, p. 88-94, 2007.

MORO, O.; LERNER, E. A. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 2, p. 70-966, 1997.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arq. Int. Otorrinol. (Impr.)**, v. 15, n. 3, 2011.

NEVES, D. P.; et al. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu. 2005. p. 524,

NORSWORTHY, N. B.; et al. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.

O’GARRA, A.; et al. IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup> Tregs: limiting collateral damage. **J. Clin. Invest.**, n. 114, p. 1372-1378, 2004.

OLIVEIRA, F.; LAWYER, P. G.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 4, p. 1-9, 2008.

OLIVEIRA, F.; et al. Delayed-Type Hypersensitivity to Sand Fly Saliva in Humans from a Leishmaniasis-Endemic Area of Mali Is a Th1-Mediated and Persists to Midlife. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, p. 452-459, 2013

OLIVEIRA, F.; CARVALHO, A. M. P.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-Fly Saliva-*Leishmania*-Man: The Trigger Trio. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 375-382, 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <[www.who.int/tdr/diseases/leish/.](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/)>. Acesso em: 20 jun 2015.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PETERS, N, C. et al. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 6, p. e1000484, 2009.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: Ecological Niche Models, Predicted Geographic Distributions and Climate Change effects. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 9, p. 919-931, 2003.

PIRES, A. M. S.; et al. Aspectos imunológicos e clínicos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão. **Rev. Cienc. Saude**, v. 14, n. 1, p. 30-39 2012.

PITA-PEREIRA, D.; et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, p. 905-913, 2005.

POINSIGNON, A. et al. Human/Vector relationships during Human African Trypanosomiasis: Initial Biomarker An.gambiae Exposure screening of immunogenic salivary proteins of Glossina species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 327–333, 2007.

QUEIROZ, R. G. et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 693-698, 1994.

RANGEL, E. F. et al. Studies on sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 39-45, 1990.

RANGEL, E. F. et al. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis vianna*, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 2, p. 235-238, 1992.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and Putative vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil : Aspects of their Biology and Vectorial Competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

REIS, A. B.; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. (Org.). **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 47-64.

REIS, L. C.; et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Patol. Trop.**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 2006.

RIBEIRO, J. M. C.; et al. A novel vasodilatory peptide from salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**, v. 243, p. 212–214, 1989;

RIBEIRO J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, v. 4, p. 143–152, 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; WALKER, F. A. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 2251–2257, 1994.

RIBEIRO, J. M. C.; MANS, B. J.; ANDARCA, B. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 767–784, 2010.

ROHOUSOVA, I.; et al., Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, v. 130, p. 493-499, 2005.

ROHOUSOVA, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitol.**, v. 53, p. 161–171, 2006.

ROHOUSOVA I.; et al. The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, p. 481–485, 2011.

ROMÃO, P. R. T.; et al. **Leishmaniose**: Resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. **Rev. Pesq. Ext. Saúde**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2007.

ROSA, M. E. A.; MACHADO, P. R. L. Disseminated Leishmaniasis: Clinical, Immunological, and Therapeutic Aspects. **Drug Develop. Res.**, v. 72, n. 6, p. 437-441, 2011.

RYAN, L.; et al. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sand fly vector. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 84, p. 786, 1990.

SACKS, D. L. Leishmania – Sand Fly Interactions Controlling Species-specific vector competence. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 189-196, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-458, 2010.

SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: Interaction in the life cycle and transmission. **Parasitol. Tod.**, v. 8, p. 255-258, 1993.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, n. 8, p. 71-755, 2001.

SCHWARZ, A.; et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, e532., 2009.

SCOTT, P. IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.147, n. 9, p. 3149-3155, 1991.

SHAZIA, S. M.; READY, P. D. No recent adaptive selection on the apyrase of Mediterranean *Phlebotomus*: implications for using salivary peptides to vaccinate against canine leishmaniasis. *Evolutionary Applications*. Department of Entomology, **Nat. Hist. Museum**, v. 5, n. 3, Article first published online: 26 DEC 2011.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVA, F.; et al. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72 , n. 1, p. 94-98, 2005.

SOARES, B. R.; et al. Seroconversion of sentinela chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. **Scient. Rep.**, n. 3, p. 1-6, 2013.

SOUZA, A. P.; et al. Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 2010.

SOUZA, M. A.; et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2 p. 137-141, 2005.

SOUZA, N. A.; et al. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Occurring Sympatrically in Area of Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 759-765, 2002.

TAVARES, N. M.; et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 1-11, 2011.

TEIXEIRA, C. R.; et al. Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, p. 18-23, 2005.

TEIXEIRA, C.; et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2010.

TEIXEIRA, C.; et al. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted

*Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 4, p. e2781, 2014.

TEODORO, U.; et al. Ecologia de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* em área urbana do município de Maringá, Paraná. **Rev. Saúde Públ.**, v. 37 n. 5, 2003.

TEODORO, U.; et al. Flebotomíneos em área de transmissão de Leishmaniose Tegumentar na região norte do Paraná – Brasil: Variação Sazonal e Atividade Noturna. **Rev Saúde Públ.**, v. 27, n. 3, p. 190-194, 1993.

TEODORO, U.; et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no norte do Paraná – Brasil. **Rev Saúde Públ.**, v. 25, p. 129-133, 1991.

THIAKAKI, M.; et al. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 4, p. 760-766, 2005.

TITUS, R. G.; et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 545-555, 1985.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, n. 4845, p. 1306-1308, 1988.

VALENZUELA, J. G.; et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 3, p. 331-342, 2001.

TURETZ, M. L.; et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1829-1834, 2002.

VEXENAT, J. A.; et al. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 293-301, 1986.

VINHAS, V.; et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 3111-3121, 2007.

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

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, 2010.

XU, X.; et al. Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 37, p. 32383-32393, 2011.

XUEQING, X. U.; et al. Structure and Function of a "Yellow" Protein from Saliva of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* That Confers Protective Immunity against *Leishmania major* Infection. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 37, p. 32383–32393, 2011.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Am. Entomol. Inst.**, v. 54, p. 881, 1994.