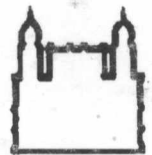




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PHLEBOTOMINAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA
EM CAMUNDONGOS BALB/c**

FRACINALDO S. SILVA

Salvador - Bahia - Brasil
2002



001750

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

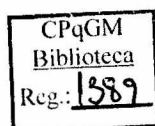
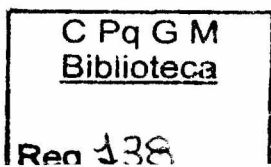
**EFEITO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PHLEBOTOMINAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

FRANCINALDO S. SILVA

Orientador: Aldina Barral

Dissertação apresentada
para obtenção de grau de
Mestre em Patologia
Experimental

**Salvador - Bahia
2002**



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

Silva, Francinaldo S.
S586e Efeito da saliva de *Lutzomyia longipalpis*
(Diptera: Phlebotominae) sobre a resposta inflama-tória
em camundongos BALB/c. / Francinaldo S. Silva. -
Salvador : Faculdade de Medicina da Universidade
Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz -
FIOCRUZ, 2002.
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimen-tal)-
Universidade Federal da Bahia / 2002.

1. *Lutzomyia longipalpis*. 2. Saliva. 3. Infla-mação.
4. Picada de inseto. I. Título.

CDU 595.77:591.131.3

212.581

595.77:591.131.3
S586e

FIOCRUZ
000000

EFEITO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) SOBRE
A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS BALB/C

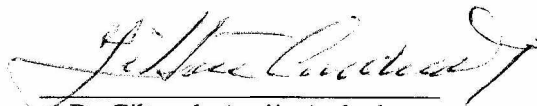
FRANCINALDO S. SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

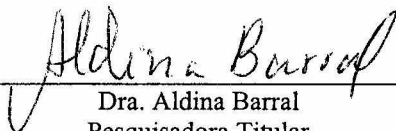
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Neuza Maria Alcântara Neves
Professora Adjunta
ICS - UFBA



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Aldina Barral
Pesquisadora Titular
CPqGM - FIOCRUZ

*“A boa madeira não cresce
com sossego; quanto mais forte
o vento, mais fortes as árvores”.*

J. Willard Marriott

Aos meus pais,

Raimundo Nonato Lemos da Silva (*In Memoriam*)

e

Maria Delfina da Paixão Soares Silva

AGRADECIMENTOS

☞ Ao professor e amigo **José Manuel Macário Rebêlo**, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, por ter me ensinado a verdadeira essência da pesquisa científica.

☞ À professora **Aldina Barral**, pela orientação e oportunidade de realizar o presente trabalho.

☞ Aos amigos **Jackson Maurício Lopes Costa**, **Arlene de Jesus Mendes Caldas**, **Dorlene Cardoso de Aquino** e **Fabiana Érica Vila-Nova**, do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, pelo incentivo dado a mim durante a execução desta pesquisa.

☞ Ao biólogo e amigo **Joilson Ramos de Jesus**, pelo apoio técnico e incentivo nas práticas laboratoriais.

☞ À **Mônica Andréa Rocha**, pelo carinho, incentivo e companheirismo proporcionados nos momentos mais difíceis.

☞ Aos amigos **Maria Jânia Teixeira**, **Régis B.B. Gomes** e **Clarissa R. Teixeira**, pelo apoio e cooperação durante a execução das técnicas aplicadas no presente trabalho.

☞ A **José Carlos Miranda**, pela obtenção dos insetos no campo para o suprimento da colônia, importante para a execução desta dissertação.

☞ Ao técnico e amigo **Edvaldo Passos**, pela manutenção da colônia de flebótomos e convivência no insetário, quando do manuseio com os camundongos.

Às meninas do insetário, **Natali Alexandrino, Ana Bahia e Deboraci Prates**, pelo fornecimento das glândulas dos flebótomos.

Aos colegas e funcionários dos laboratórios do CPqGM, pelo ambiente saudável no qual vivi durante a minha estada em Salvador.

Às profissionais da biblioteca do CPqGM, **Fiscina, Edite, Zinha, Vânia e Christina** pelo apoio e consideração prestados.

A todos os professores que contribuíram para a formação de meu alicerce educacional.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Aspectos gerais</i>	14
1.2 <i>Mecanismo hematofágico dos flebótomos</i>	16
1.3 <i>A saliva dos insetos hematófagos</i>	17
1.4 <i>A importância da saliva de insetos vetores na patogênese das doenças parasitárias</i>	19
1.5 <i>A ação imunogênica da saliva</i>	21
1.6 <i>Reações a picadas de insetos hematófagos</i>	25
1.7 <i>O papel das células inflamatórias nos animais sensibilizados com picadas de insetos hematófagos</i>	28
1.8 <i>Bolsão inflamatório como modelo experimental para estudos de recrutamento celular</i>	31
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 <i>Geral</i>	32
2.2 <i>Específicos</i>	32
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35

4.1 Criação e obtenção dos flebotomíneos.....	35
4.2 Animais de experimentação.....	36
4.3 Obtenção do sonicado de glândula salivar.....	37
4.4 Sensibilização e desafio dos camundongos.....	37
4.5 Dosagem de imunoglobulinas.....	38
4.6 Histopatologia.....	39
4.7 Bolsão inflamatório.....	39
4.8 Análises estatísticas.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Fêmeas alimentadas.....	41
5.2 Anticorpos antisaliva.....	42
5.3 Histopatologia.....	43
5.4 Bolsão inflamatório.....	50
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	60
8 REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

1X: uma sensibilização

5X: cinco sensibilizações

ABST - 2-2'-azino-di-[3-ethylbenz-thiazoline sulfonato]

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)

CDC - Center of Disease Control

DO - Densidade óptica

DTH - Hipersensibilidade do tipo tardia

ELISA - Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Eos - Eosinófilo

HBC - Hipersensibilidade basofílica cutânea

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL-4 - Interleucina 4

LPS - Lipopolissacarídeo

M ϕ - Macrófago

Mast - Mastócito

Mo/M ϕ - Monócito/macrófago

Neut - Neutrófilo

NS - Não sensibilizado

PBS - Tampão de Salina Fosfatada (pH 7,4) (Phosphate Buffered Saline)

PBS-T - PBS contendo Tween 20

PMN - Polimorfonucleares neutrófilos

PNP-FOSFATO - Paranitrofenil fosfato

SGS - Sonicado de glândula salivar

Th - Linfócito T auxiliador (T helper)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Número de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em camundongos BALB/c em cada exposição.....41
- Figura 2 - Níveis de anticorpos antialérgico, IgG e subclasses, do flebótomo *L. longipalpis* no soro de camundongos BALB/c de acordo com o grau de exposição.....43
- Figura 3 - Células presentes na derme auricular de camundongos BALB/c expostos e não expostos a picadas de *L. longipalpis* e desafiados com salina e SGS.....46
- Figura 4 - Histologia da orelha de camundongos BALB/c não sensibilizados e desafiados com SGS.....47
- Figura 5 - Histologia da orelha de camundongos BALB/c com 5 sensibilizações 2h após o desafio com SGS.....48
- Figura 6 - Histologia da orelha de camundongos BALB/c com 5 sensibilizações 48h após o desafio com SGS.....49

Figura 7 - Percentual de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c sensibilizados com picadas de *L. longipalpis* e tratados com salina e SGS.....52

Figura 8 - Número de células acumuladas no exsudato do bolsão inflamatório após 12h do estímulo com SGS de *L. longipalpis* e salina.....53

RESUMO

EFEITO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS BALB/c. **Francinaldo S. Silva.** Os indivíduos que são continuamente expostos às picadas de insetos exibem uma seqüência regular de sensibilidade, iniciando com uma fase ausente de reação, seguida de uma resposta do tipo tardia, depois tardia e imediata, somente imediata e culminando com a ausência completa de reação às picadas, onde os indivíduos voltam à situação inicial, atingindo um nível de dessensibilização. Evidencia-se a formação de uma resposta específica contra os componentes salivares e que estes elementos poderão constituir-se em alvos para possíveis vacinas contra as doenças transmitidas por insetos. Sensibilizar camundongos BALB/c com picadas de *Lutzomyia longipalpis* e desafiá-los com 0,2 par de glândula salivar, no intuito de investigar a cinética das células inflamatórias e a resposta imune à saliva. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com picadas de fêmeas do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* com intervalos de 10 dias. Ao final das sensibilizações, coletou-se o soro para a dosagem de anticorpos antisaliva. Após 10 dias da última exposição, inoculou-se 10 µl de salina com ou sem 0.2 par de saliva na orelha dos camundongos e a seguir fragmentos de tecidos auricular foram retirados e fixados em formol a 10% para as análises histológicas. O bolsão inflamatório foi construído pela injeção de LPS ou saliva e as células coletadas 12 horas depois. Após cinco exposições, os camundongos apresentaram altos níveis de anticorpos IgG total e de anticorpos IgG1. O infiltrado inflamatório na orelha dos camundongos cinco vezes expostos mostrou-se mais intenso do que nos demais grupos de camundongos. Houve um aumento do número de neutrófilos, macrófagos e mastócitos ao longo das sensibilizações. Nos animais com 5 exposições após 2h do desafio com SGS foi observado hemorragia e o edema foi mais intenso. Nas orelhas após 48h do desafio com SGS foi observado necrose e células de aspecto apoptótico. Os neutrófilos foram as células que predominaram no exsudato inflamatório dos três grupos de camundongos. O número de Mo/Mφ foi maior no exsudato do bolsão inflamatório dos animais controle injetados com SGS, com marcada redução nas exposições subseqüentes. A saliva de *L. longipalpis* induz uma resposta inflamatória com características indicativas de uma resposta mista, combinando elementos do tipo Th2 de aspectos de uma reação tardia do tipo DTH. Ademais, a saliva apresenta uma potente capacidade de recrutar macrófagos, a qual é progressivamente modulada após as exposições, o que pode ser relevante na infecção por *Leishmania*, um parasita predominantemente intramacrofágico.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*. Saliva. Inflamação. Picada de insetos.

ABSTRACT

EFFECT OF *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) SALIVA ON THE INFLAMMATORY RESPONSE IN BALB/c MICE. **Francinaldo S. Silva.** Individuals continuously exposed to insect bites show a regular sequence of sensitivity, beginning with a non-reactive phase, followed by a delayed response, and then delayed together with immediate, only immediate and culminating with the complete absence of reactions to the insect bites, where the individuals come back to the initial phase, reaching a desensitization situation. It is shown that individuals mount a specific response against salivary compounds and that such elements may be effective targets for insect-borne disease vaccines. To sensitize BALB/c mice with *Lutzomyia longipalpis* bites and challenge them with 0.2 pair of salivary gland aiming at evaluating the inflammatory cells kinetics and the immune response to sandfly saliva. BALB/c mice were sensitized with *Lutzomyia longipalpis* bites with a 10-day interval. At the end of the sensitizations, mice sera were collected for measuring the antisaliva antibodies levels. On the tenth day after the last exposition 10 μ l of saline with or not with 0.2 pair of salivary gland were injected into the mice ears and the sections extracted and fixed in formaline 10% for the histological analyses. The inflammatory air-pouch was formed by the injection of LPS or saliva into mice dorsum and the cells were collected 12 hours afterwards. After the five expositions mice showed high titles of IgG and IgG1 antibodies. The inflammatory infiltrate in the five-time exposed mice ears was more intense than the other groups of mice. Along the expositions the number of neutrophils, macrophages and mast cells were higher. The ears of the five-time exposed mice after the 2h-challenge injections with saliva showed hemorrhage and a more intense edema. In the 48-saliva challenged ears, necrosis focus and apoptotic cells were observed. The neutrophils were the most predominant cells in the inflammatory site in the three groups of mice. The number of Mo/M ϕ was higher in the inflammatory air-pouch exsudate of the non-sensitized mice, with markedly reduction from that point on. *L. longipalpis* saliva induces an inflammatory response with indicative characteristics of a mixed response, showing Th2 type elements and aspects of a DTH delayed type response. Furthermore, *L. longipalpis* saliva presents a potent capability of recruiting macrophages to which it is progressively modulated after expositions, being very important in infection by *Leishmania*, an intramacrophagic parasite.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*. Saliva. Inflammation. Insect bite.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Dentre os artrópodes hematófagos dois grupos bem distintos podem ser encontrados, conforme a relação com os hospedeiros vertebrados: o grupo dos ectoparasitas permanentes, representados pelos artrópodos que passam toda a sua vida em contato com o corpo do animal hospedeiro e o grupo dos ectoparasitas temporários, representados por aqueles que procuram os hospedeiros somente para exercer o hematofagismo. No primeiro grupo, estão os artrópodos pertencentes à classe Arachnida, representada pelas famílias de carrapatos Ixodidae e Argasidae e à classe Insecta, representada pelas ordens dos piolhos sugadores (ordem Anoplura) e dos dípteros Hipobocídeos (ordem Cyclohrapha). Os artrópodos hematófagos não ectoparasitas temporários pertencem a três ordens de insetos: Hemiptera (barbeiros), Siphonaptera (pulgas) e Diptera (mosquitos e moscas) (CARRERA, 1991; REY, 1992).

Os flebotomíneos são invertebrados pertencentes à classe Insecta, ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Esta subfamília possui cinco gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* encontrados no Velho Mundo; *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (LEWIS, 1971, 1974). O gênero *Chinius*, o mais recente, é encontrado somente na China (LENG, 1987). Mais de 500 espécies de flebotomíneos já são conhecidas e cerca de dois terços delas ocorrem nas Américas. No Novo Mundo o gênero *Lutzomyia* é o mais importante, representado por centenas de espécies das quais muitas delas

respondem pela transmissão das leishmanioses (LEWIS, 1971, 1974; FORATTINI, 1973; KILLICK-KENDRICK, 1990). A caracterização das espécies desta subfamília se dá pelo estudo dos 96 caracteres morfológicos internos e externos distribuídos por todo o corpo destes insetos (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos apresentam holometabolia, ou seja, o seu ciclo de vida possui quatro fases evolutivas: ovo, larva (estágios I, II, III e IV), pupa e adulto (FORATTINI, 1973). O desenvolvimento completo ocorre entre 30 e 60 dias, a depender das condições ambientais. As larvas dos flebotomíneos são terrestres e se desenvolvem em ambiente úmido, se alimentando da matéria orgânica em decomposição encontrada neste tipo de ambiente. Os adultos são encontrados em vários locais de descanso, como frestas de árvores e de rochas, tocas de animais, a serrapilheira, etc. Os adultos se alimentam de várias substâncias doces de natureza vegetal, tais como seiva, néctar, frutas maduras etc. Além do açúcar encontrado nos vegetais, as fêmeas necessitam exercer a hematofagia afim de que seus ovos amadureçam. Este hábito, na maioria das vezes, está restrito ao período noturno, sendo que algumas espécies o faz durante o dia (LEWIS, 1971; FORATTINI, 1973).

Os flebotomíneos ocorrem nos neotrópicos, onde a sua maioria é encontrada nas regiões quentes e úmidas do planeta e somente poucas espécies alcançam as regiões além dos trópicos (MARTINS; MORALES-FARIAS, 1972). Estes insetos geralmente permanecem sem contato com o homem, mas em dadas áreas este contato ocorre em razão das alterações ambientais como construção de estradas, desenvolvimento agrícola, assentamentos, entre outros.

Atualmente, muitas espécies estão bem adaptadas às condições antrópicas e se encontram constantemente em íntimo contato com os animais domésticos e o homem, exercendo mudanças na ecologia das leishmanioses (REBÊLO et al., 2000). Uma das espécies mais adaptadas ao convívio humano é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, sendo encontrado em alta densidade em algumas regiões do Brasil tanto dentro quanto fora dos domicílios (SHERLOCK, 1996).

1.2 Mecanismo hematofágico dos flebotomíneos

Na obtenção de sangue, os insetos exibem dois mecanismos básicos: a solenofagia, representados pelos insetos que retiram sangue diretamente dos vasos, e a telmofagia, representados por aqueles que, no local da picada, dilaceram os pequenos vasos criando uma pequena hemorragia, dela alimentando-se (GOLDMAN et al., 1952). Os flebotomíneos são insetos telmófagos e, durante a sua alimentação, injetam saliva antes do ato hematofágico que auxilia no encontro de um local adequado para o repasto sangüíneo e de conter os mecanismos hemostáticos. Estes insetos possuem um par de glândulas salivares situado na região ventral protorácica, constituído de um duto comum curto e um duto individual longo que vai até o aparato bucal. A forma da glândula salivar é variável entre as espécies de flebotomíneos. Em algumas espécies, estas glândulas são arredondadas e em outras são alongadas, chegando a alcançar a região abdominal. O tamanho também é diferente e parece estar relacionado com o hábito hematofágico (LEWIS, 1965; FORATTINI, 1973). O volume da saliva que é excretado é particular de cada espécie e está de acordo com o tamanho da glândula e é composto de várias substâncias com poder antihemostático.

1.3 A saliva dos insetos hematófagos

O processo da hemostasia, que é mais evidente nos vasos de pequeno calibre, visa o bloqueio da perda de sangue através da cascata de coagulação. Os mesmos eventos hemostáticos, representados pela coagulação, agregação plaquetária e vasoconstricção, ocorrem quando um inseto introduz seu aparato bucal pungitivo no tecido do hospedeiro, em busca de um local apropriado à sua alimentação. Para inibir os processos hemostáticos do hospedeiro, a saliva dos insetos hematófagos possui moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes e antiplaquetárias, que permitem uma sucedida alimentação sanguínea (RIBEIRO et al., 1994; RIBEIRO, 1995).

A reação primária que ocorre no hospedeiro quando há uma lesão vascular, por exemplo a picada de um inseto hematófago, é a vasoconstricção. Durante este processo, ocorre a liberação de tromboxane A₂ e serotonina pelas plaquetas, favorecendo um contato mais íntimo entre os vasos lesados e o tampão formado pela agregação das plaquetas. A superação deste obstáculo só acontece porque o conteúdo das glândulas salivares possui substâncias com atividade vasodilatadora a qual propicia um maior fluxo sanguíneo para o local da picada. Estas substâncias podem atuar ao nível da musculatura lisa, como o maxadilan ou ao nível do endotélio vascular, no caso do óxido nítrico (RIBEIRO, 1995; LERNER; SHOEMAKER, 1992). O maxadilan, um peptídeo de aproximadamente 7 kDa, é um potente vasodilatador encontrado na saliva de *L. longipalpis*, vetor da *Leishmania chagasi*, agente etiológico do calazar. Esta molécula é responsável pelo eritema provocado pela picada do inseto durante a

procura de um local favorável para exercer a hematofagia (LERNER; SHOEMAKER, 1992; YIN et al., 2000).

Um outro passo importante para uma eficiente alimentação sangüínea pelos insetos hematófagos é o bloqueio da cascata de coagulação. Este bloqueio se dá por uma série de substâncias anticoagulantes presentes na saliva destes insetos que podem operar inibindo os fatores de coagulação. A base do fenômeno de coagulação é a passagem da protrombina (uma alfa-2-globulina presente no plasma) para trombina, que por sua vez age sobre o fibrinogênio que se polimerisa e forma uma rede de fibrina, impedindo assim a perda de sangue. Muitos insetos hematófagos possuem agentes antitrombínicos nas suas glândulas salivares (ZALOVA et al., 2002).

A agregação de plaquetas é mais um empecilho que os insetos hematófagos devem superar. Quando os tecidos dos hospedeiros são lesados, ocorre a liberação de ATP e ADP que são potentes agregadores plaquetários. Para superar este processo fisiológico, os insetos hematófagos adquiriram um componente salivar capaz de bloquear a agregação das plaquetas. Este componente é uma enzima denominada apirase, e parece estar presente em todos os insetos que se alimentam de sangue (RIBEIRO, 1995; BASANOVA et al., 2002).

1.4 A importância da saliva de insetos vetores na patogênese das doenças parasitárias

As características principais das glândulas salivares dos insetos

hematófagos são (1) as propriedades, que facilitam a alimentação e (2) o fato de que a saliva constituir-se na principal via de transmissão de vários parasitas aos animais, inclusive o homem. Esta última questão faz com que os componentes da saliva adquiram grande relevância no estudo da patogênese das doenças transmitidas por artrópodos. A saliva certamente constitui o elo que liga os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasita e o hospedeiro. O conteúdo salivar é importante na determinação da capacidade vetorial, visto que a presença ou até a quantidade de algumas moléculas são necessárias para que um vetor consiga ter sucesso em realizar o repasto sangüíneo sobre um hospedeiro vertebrado e assim efetuar a transmissão (RIBEIRO et al., 1998; RIBEIRO, 2000).

A picada de insetos hematófagos corresponde a uma etapa de extrema importância para o estabelecimento de uma infecção. As reações que se seguem após o repasto de sangue têm grande influência na introdução e desenvolvimento dos parasitas transmitidos. O conteúdo da glândula salivar dos flebotomíneos apresenta grande relevância parasitológica através das propriedades imunomoduladoras, que propiciam um ambiente adequado à sobrevivência e multiplicação dos microorganismos transmitidos durante a hematofagia, constituindo assim um importante fator de competência vetorial. A saliva, quando inoculada experimentalmente com os parasitas do gênero *Leishmania* pode promover uma infecção mais grave em comparação com o inóculo somente de parasitas (TITUS; RIBEIRO, 1988; LIMA; TITUS, 1996; BELKAID et al., 1998; DONNELLY et al., 1998; BEZERRA; TEIXEIRA, 2000). Este efeito exacerbador da saliva na infecção pode ser ainda observado quando os antígenos salivares

são inoculados quatro dias antes da inoculação dos parasitas (THEODOS e TITUS, 1993). Vários estudos demonstraram o papel imunomodulador da saliva dos flebotomíneos sobre as células efectoras do sistema imune. A ação imunomoduladora favorece a infecção e multiplicação dos microorganismos intracelulares transmitidos. Esta ação se dá pela regulação das atividades microbidas das células fagocíticas, principalmente macrófagos. Estas células, em contato com a saliva, têm a sua produção de óxido nítrico e peróxidos, fatores microbidas, reduzida, criando assim um ambiente favorável à multiplicação dos microorganismos endocitados (TITUS; RIBEIRO, 1988; JAMES; ROSSIGNOL, 1991; THEODOS; TITUS, 1993; HALL; TITUS, 1995; WAITUBI; WARBURG, 1998; CHARLAB et al., 1999; GILLESPIE et al., 2000).

1.5 A ação imunogênica da saliva

Alguns trabalhos com modelos murinos expostos às picadas de mosquitos, têm demonstrado que os camundongos sensibilizados apresentam altos níveis de anticorpos IgE e IgG1 (CHEN et al., 1998; OHTSUKA et al., 2001). Os anticorpos IgE e IgG1 estão associados com os processos alérgicos e com o grau de exposição dos animais aos insetos e fazem parte do grupo das imunoglobulinas Th2. PALOSUO e cols. (1997) estudaram um grupo de 14 indivíduos de uma mesma área e que foram naturalmente expostos às picadas de mosquitos locais. Os soros destes indivíduos foram coletados antes e depois da estação de proliferação dos insetos, época do ano em que as pessoas estiveram mais expostas. Por análises de “immunoblot”, avaliaram dois antígenos salivares (22 e 36kD) e demonstraram a existência de uma relação sazonal entre as picadas dos

mosquitos e a produção de anticorpos antialérgicos IgE, IgG1 e principalmente IgG4, nos indivíduos expostos, revelada pelo aumento significativo na intensidade das bandas correspondentes à proteínas reconhecidas por anticorpos antialérgicos presentes nos soros dos indivíduos coletados após a estação de proliferação dos mosquitos.

PENG e cols. (1998), estudando 10 espécies de mosquitos de diferentes regiões geográficas mostraram que na saliva destes insetos havia entre 3 e 16 proteínas alérgicas capazes de suscitar a produção de altos níveis de anticorpos da classe IgE nos soros dos indivíduos fortemente alérgicos aos produtos salivares destes insetos (PENG et al., 1998).

Em uma abordagem experimental, VOLF e ROHOUSOVA (2001), através de “dot-blot” e “immunoblot”, verificaram que camundongos, hamsters e coelhos repetidamente expostos às picadas de três espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, e de diferentes subgêneros, produziram anticorpos que reconheciam antígenos específicos de cada espécie. Em estudos experimentais, BRUMMER-KORVENKONTIO e cols. (1996) expuseram camundongos às picadas de duas espécies de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. aegypti* e *A. communis*) e uma de *Anopheles* (*A. stephensi*), e constataram que várias proteínas foram capazes de gerar imunogenicidade nos camundongos e que tais proteínas poderiam estar envolvidas nas alergias em humanos.

Os estudos de BELKAID e cols. (1998) com camundongos BALB/c, susceptíveis, e C57BL/6, resistentes à infecção por *Leishmania major*, mostraram

que anticorpos contra componentes salivares podem neutralizar o efeito exacerbador da saliva, observado por TITUS e RIBEIRO (1988). Os camundongos foram sensibilizados na orelha com sonicado de glândula salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* e desafiados com promastigotas de *L. major*, com ou sem SGS e demonstraram que nos animais sem prévia sensibilização, o SGS exacerbou a infecção nas duas linhagens de camundongos, como já relatado em trabalhos anteriores (TITUS; RIBEIRO, 1988; LIMA; TITUS, 1996; BEZERRA; TEIXEIRA, 2000). No entanto, nos animais sensibilizados, os anticorpos gerados nas sensibilizações foram capazes de neutralizar os efeitos exacerbadores do SGS, visto que quando o soro dos animais sensibilizados foi incubado com o SGS, as lesões foram menores que as encontradas nos animais cujo inóculo foi constituído de parasitas e SGS incubado com soro de camundongos normais (BELKAID et al., 1998).

A contínua exposição dos hospedeiros aos insetos hematófagos pode afetar as funções biológicas dos vetores e conseqüentemente o mecanismo de transmissão de patógenos, através da produção de anticorpos contra antígenos dos insetos. Neste contexto, ALGER e CABRERA (1972) verificaram um aumento nas taxas de morte de *Anopheles stephensi* quando alimentados em coelhos sensibilizados com antígenos do mosquito. Estes autores sensibilizaram os coelhos com três tipos de antígenos preparados a partir de extratos dos mosquitos: sobrenadante da fração total do extrato; sedimento do extrato e antígenos do estômago do mosquito. As taxas de morte dos mosquitos foram maiores naqueles alimentados em coelhos injetados com antígenos do estômago. O mecanismo proposto pelos autores para explicar tais fenômenos aborda a ação

dos anticorpos no interior do mosquito que podem (1) afetar as células digestivas do vetor, (2) inibir proteases ou outras enzimas gástricas, (3) bloquear mecanicamente os microvilos com a conseqüente diminuição da superfície de absorção e (4) causar a morte da fauna bacteriana do intestino do inseto.

GHOSH e MUKHOPADHYAY (1998) estudaram a ação dos anticorpos antialérgicos de flebotomíneos, demonstrando haver participação destes anticorpos nas taxas de morte de *Phlebotomus argentipes* quando alimentado em hamster pré-expostos aos flebotomíneos ou artificialmente em membranas contendo soro de hamster previamente sensibilizado. Após a décima primeira exposição, o número de fêmeas que se alimentaram nos hamsters foi significativamente menor com relação à primeira. As taxas de morte dos flebotomíneos ao longo das exposições aumentaram, sendo estatisticamente significativa a diferença entre a primeira e a décima primeira exposição. Na alimentação artificial, as taxas de morte das fêmeas de *P. argentipes* foram maiores no grupo alimentado com o soro de hamster previamente exposto do que no grupo controle, demonstrando o papel dos anticorpos na sobrevivência das fêmeas após o repasto de sangue. Contrariamente, VOLF e ROHOUSOVÁ (2000) expuseram camundongos, hamsters e coelhos por um período de dois meses às picadas de três espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (*P. papatasi*, *P. perniciosus* e *P. halepensis*) e, apesar dos altos níveis de anticorpos antialérgicos produzidos em cada hospedeiro, estes autores não observaram aumento das taxas de morte dos flebotomíneos ao longo das exposições.

Em áreas endêmicas, as exposições de indivíduos aos vetores induzem a formação de anticorpos contra elementos presentes no conteúdo salivar. BARRAL

e cols. (2000) detectaram anticorpos IgG antialiva do flebotômíneo *L. longipalpis* no soro de crianças residentes em área endêmica para leishmaniose visceral, transmitida por este flebotômíneo.

1.6 Reações às picadas de insetos hematófagos

A reação resultante de picadas de insetos pode ser variada, havendo a participação dos componentes tanto de uma resposta imediata, que surge logo após a picada e dura alguns minutos, quanto de uma resposta tardia, aparecendo depois de algumas horas ou dias (GORDON; CREEW, 1948; McKIEL, 1959; CRIEP, 1976).

A resposta de hipersensibilidade do tipo I é uma reação imunológica que se desenvolve rapidamente, ocorrendo minutos depois da combinação do antígeno com anticorpos IgE ligados a mastócitos e basófilos, principais células neste tipo de hipersensibilidade, em indivíduos previamente expostos às picadas de insetos. A ativação de mastócitos mediada por IgE, libera histamina, leucotrienos e citocinas pró-inflamatórias que atraem células inflamatórias nos locais de deposição do antígeno. Esses eventos são regulados por indução de linfócitos, que promovem a síntese de IgE e o acúmulo de células, principalmente eosinófilos (ABBAS et al., 1998). Os achados clínicos resultam da liberação de mediadores inflamatórios dos mastócitos assim como o acúmulo de um exsudato inflamatório rico em eosinófilos. A hipersensibilidade imediata pode ser transferida através do soro de animais sensibilizados para animais não sensibilizados (ALLEN, 1966), demonstrando a participação dos componentes séricos na

formação deste tipo de hipersensibilidade.

Uma resposta muito mais comum que acontece devido às picadas de insetos é a resposta tardia da hipersensibilidade do tipo I. A resposta tardia, em geral, é muito menos severa do que a resposta imediata, podendo ocorrer edema e prurido intensos (AREÁN; FOX, 1955; McKIEL; WEST, 1961; ALLEN, 1966). A reação tardia parece não ter relação com picadas prévias, no entanto, a reação imediata acomete geralmente indivíduos com prévio contato aos insetos (GORDON; CREEW, 1948; MCKIEL, 1959). Esta reação tardia é caracterizada pela presença de eosinófilos e por células T auxiliadoras tipo II, em contraste à resposta tardia da hipersensibilidade do tipo IV, representada pela presença de macrófagos e das células T auxiliadoras tipo I. Esta última também pode ocorrer devido às investidas dos insetos (SANSON et al., 1992; THEODOR, 1935; GORDON; CREWE, 1948).

Os indivíduos picados por insetos desenvolvem diferentes padrões de resposta cutânea, onde alguns não reagem às picadas enquanto outros exibem reações variadas. Em geral, as picadas dos insetos podem levar a um estado de sensibilização, caracterizado pela presença de uma resposta imediata. Com a contínua exposição, tais indivíduos podem reverter este estado voltando à situação inicial e atingindo um nível de desensibilização.

THEODOR (1935) estudou experimentalmente as reações às picadas de *P. papatasi* em voluntários. As picadas deste inseto causaram reações cutâneas tardias, aparecendo dias após as exposições. No início, somente um pequeno

ponto hemorrágico acompanhado por irritação local foi relatado pelos voluntários após as picadas. Entre 4 e 14 dias, a depender da sensibilidade do voluntário, uma pápula de 1 a 2 milímetros de diâmetro e acompanhada de intensa irritação foi detectada no local das picadas. À medida que as exposições iam acontecendo, o período entre as primeiras picadas e o aparecimento das reações assim como a intensidade da reação cutânea local diminuía, tornando-se semelhantes ao observado durante as primeiras exposições.

Os estudos de MELLANBY (1946 *apud* McKIEL; WEST, 1961) mostraram que indivíduos que são continuamente expostos às picadas de mosquitos exibem fases de sensibilidade distintas e que estas fases seguem uma seqüência regular. Na primeira fase o indivíduo não mostra ser sensível à picada. Na segunda fase surge uma reação do tipo tardio. Na terceira ocorre uma mistura de reações, representada tanto pela resposta imediata quanto pela tardia. A quarta fase é representada somente pela reação imediata e, finalmente, a quinta fase se caracteriza pela ausência de reação. Este padrão de resposta, que parte de uma reação tardia e termina com uma reação imediata ou ausência completa de reação (MCKIEL; WEST, 1961; CRIEP, 1976).

BENJAMIN e cols. (1961) expuseram cobaias às picadas de pulgas e descreveram as mesmas mudanças das reações cutâneas observadas por THEODOR (1935) e por MELLANBY (1946 *apud* McKIEL; WEST, 1961) em humanos. (BENJAMIN et al., 1961). Os resultados de BENJAMINI e cols. (1961) estão esquematizados no quadro abaixo.

Quadro 1. Fases do desenvolvimento das reações cutâneas provocadas por picadas repetidas de pulgas em cobaios.

Estágios imunológicos	Reação imediata	Reação tardia
Fase I	-	-
Fase II	-	+
Fase III	+	+
Fase IV	+	-
Fase V	-	-

Segundo BENJAMIN e cols. (1961)

Mais recentemente, RATZLAFF e WIKEL (1990), trabalhando com piolhos, obtiveram resultados semelhantes.

1.7 O papel das células inflamatórias nos animais sensibilizados com picadas de insetos hematófagos

As mudanças na resposta imune do hospedeiro devido às contínuas exposições às picadas dos insetos hematófagos são também refletidas no padrão do infiltrado celular em animais já sensibilizados com a saliva destes animais.

Muitos trabalhos demonstraram que as células inflamatórias exercem papel importante contra ectoparasitas permanentes. ASKENASE (1977) observou que o predomínio de basófilos (até 80% do exsudato) no local das picadas de ectoparasitas em cobaios, conhecido como hipersensibilidade basofílica cutânea (HBC), confere resistência ao ectoparasitismo, visto que quando cobaios

apresentam HBC, um menor número de artrópodos é observado picando estes animais.

NELSON e cols. (1979) estudaram duas linhagens de camundongos, uma que desenvolveu resistência (CFW) e outra que não desenvolveu resistência (C57BL/6) à infestação pelo piolho *P. serrata*, e mostraram que a ausência de resistência na linhagem C57BL/6 foi devido à falta de fatores quimiotáticos para neutrófilos, visto que estas células estavam ausentes nesta linhagem no início do processo inflamatório, cerca de duas semanas após a infestação.

Estudando a cinética das células basofílicas e eosinofílicas no sangue de cobaias expostas às picadas de *L. longipalpis*, BROWN e ROSALSKY (1984) mostraram um aumento de basófilos e eosinófilos no sangue dos cobaias expostos quando comparados aos não expostos e que isto poderia se refletir no influxo destas células no local de entrada de parasitas transmitidos por este vetor, modificando consideravelmente o progresso da infecção.

As reações histológicas nos sistemas envolvendo piolhos e camundongos mostram que as alterações cutâneas são os fatores principais responsáveis pelo aparecimento de resistência ao ectoparasitismo. Estas mudanças são representadas por um aumento no influxo de células inflamatórias para o local da picada dos piolhos. NELSON e cols. (1972) realizaram um estudo abordando os aspectos histológicos da pele de camundongos infestados por *P. serrata*. Através de injeção de extrato contendo partes do inseto, estes autores constataram que os animais estavam sensibilizados e que esta sensibilização conferia resistência

dos camundongos à presença dos piolhos. Na primeira fase do estudo, que durou 4 semanas, houve um aumento do influxo de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos e na segunda fase, as oito semanas restantes do estudo, ocorreu um aumento no número de linfócitos, monócitos e de fibroblastos.

A sensibilização dos cobaios a picadas de pulgas nos experimentos de BEINJAMIN e cols. (1961) foram posteriormente analisadas do ponto de vista histológico por LARRIVEE e cols. (1964) que demonstraram um padrão distinto de infiltração celular nas diferentes fases da sensibilização. A primeira fase se caracteriza pelo surgimento de um discreto infiltrado celular após 24 horas da picada. Na segunda fase, no início, não há reatividade imediata. Nas biópsias de 24 horas, um intenso infiltrado dérmico de monócitos e linfócitos, acompanhado por uma invasão mononuclear na epiderme, característico de uma resposta do tipo tardia, foi observado. Na terceira fase, ocorreu um infiltrado celular representado por eosinófilos e monócitos resultante da picada desafio. No início surge um intenso infiltrado eosinofílico e depois de 24 horas o infiltrado celular predominante é de linfócitos e monócitos e os eosinófilos estão escassamente presentes. Um infiltrado eosinofílico representa o início da fase quatro com uma resposta discreta de monócitos após 24 horas. Na última fase, as biópsias revelaram a ausência de resposta celular e uma histologia similar às biópsias dos animais não sensibilizados. Esta seqüência de eventos ocorridas na pele dos animais mostra a relação entre a resposta tardia e monócitos e resposta imediata e eosinófilos.

1.8 Bolsão inflamatório como modelo experimental para estudos de recrutamento celular

SEDWICK e col. (1983) demonstraram que a injeção de ar juntamente com um irritante na superfície dorsal de ratos iniciou uma resposta inflamatória útil para estudar a ação de drogas anti-inflamatórias. A inflamação no bolsão de ar é um modelo que tem a vantagem de criar um espaço particular para a indução de uma resposta inflamatória e estudar a inflamação aguda, na qual a extravasão de fluidos, a migração celular e vários parâmetros bioquímicos no exsudato envolvidos na resposta inflamatória podem ser medidos rapidamente. MATTE e OLIVIER (2002), através desta técnica, investigaram se espécies de *Leishmania* poderiam induzir respostas inflamatórias distintas *in vivo*, fazendo a correlação com o desenvolvimento da patogênese de cada espécie estudada.

2 OBJETIVOS

Hipótese: a saliva de *Lutzomyia longipalpis* é capaz de induzir uma resposta inflamatória que se intensifica à medida que as exposições ocorrem.

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta inflamatória do hospedeiro à saliva de *L. longipalpis* e avaliar como esta resposta afeta a capacidade hematofágica do inseto.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade inflamatória da saliva de *L. longipalpis* investigando a resposta histológica da orelha de camundongos sensibilizados pela picada do inseto e desafiados com sonicado de glândula salivar.
- ✓ Avaliar os níveis de anticorpos antisaliva, da classe IgG e suas sub-classes em camundongos expostos à picada de *L. longipalpis*.
- ✓ Avaliar como a resposta inflamatória do hospedeiro afeta a capacidade de obtenção do alimento sanguíneo por *L. longipalpis*.
- ✓ Avaliar o efeito da saliva de *L. longipalpis* no recrutamento celular através da técnica do bolsão inflamatório.

3 JUSTIFICATIVA

Os indivíduos que são continuamente expostos à picadas de mosquitos exibem uma seqüência regular de sensibilidade, iniciando com uma fase ausente de reação, seguida de uma resposta do tipo tardia, depois tardia e imediata, somente imediata e culminando com a ausência completa de reação a picadas. (MELLANBY, 1946 *apud* McKIEL; WEST, 1961). Isto também se observa frente a picadas de outros insetos.

Dada a importância da saliva no que concerne à imunização do hospedeiro e seu papel nas infecções, conjectura-se a produção de vacinas utilizando os componentes salivares como matéria-prima. O maxadilan, encontrado na saliva de *L. longipalpis*, além de exercer um papel importante no bloqueio da hemostasia, pode atuar também como substância exacerbadora e imunomoduladora da infecção por *Leishmania* (QUERESHI et al., 1996; MORRIS et al., 2001). Este peptídeo, injetado juntamente com *L. major* em camundongos CBA foi capaz de exacerbar a infecção, tal qual o extrato salivar (TITUS; RIBEIRO, 1988). Os experimentos de MORRIS e cols. (2001) demonstraram que as lesões e a carga parasitária são menores em camundongos imunizados com o maxadilan (MORRIS et al., 2001). Outro peptídeo encontrado na saliva de *P. papatasi*, a proteína salivar SP15, apresentou proteção similar ao maxadilan. A imunização de camundongos C57BL/6 com este peptídeo, afetou significativamente a manifestação da infecção com *L. major*, quando injetado juntamente com a saliva, avaliada pelo menor tamanho da lesão e baixa carga parasitária em comparação aos camundongos imunizados com o peptídeo e

desafiados com o parasita sem a participação da saliva (VALENZUELA et al., 2001).

A presença de anticorpos antisaliva de insetos produzidos pelo hospedeiro e o papel imunizador da saliva demonstrando experimentalmente sugerem que as moléculas responsáveis por esta imunogenicidade podem ser fortes candidatos à produção de uma vacina.

Além dos anticorpos específicos contra a saliva dos insetos hematófagos, o aumento do infiltrado celular na área exposta à picadas freqüentes pode refletir na sobrevivência de parasitas por eles transmitidos, modificando consideravelmente o progresso infeccioso. Para tal, torna-se importante o estudo da resposta do hospedeiro, tanto humoral quanto celular, frente à contínua exposição da saliva dos insetos hematófagos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação e obtenção dos flebotomíneos

Os insetos utilizados foram provenientes da colônia de *Lutzomyia longipalpis* do laboratório de imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ). Para a manutenção da colônia, os flebotomíneos foram coletados na localidade de Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia. Na captura utilizou-se armadilha luminosa do tipo CDC montadas no crepúsculo vespertino e retiradas no crepúsculo matutino. Após a retirada, os saíotes das armadilhas contendo os insetos capturados foram devidamente acondicionadas e levadas à sede do projeto, localizada em Cavunge e posteriormente para o CPqGM/FIOCRUZ. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram utilizados como fonte alimentar da fase adulta dos insetos. Os hamsters foram anestesiados com ketamina (0,5mg/g) e colocados em gaiolas contendo flebotomíneos adultos e deixados por um período aproximado de 1 hora para repasto sanguíneo. As gaiolas foram postas em estufa incubadora (B.O.D) a 26°C. Foi adicionada ao sistema solução açucarada (v/v) para a alimentação dos machos, que não são hematófagos, e também para as fêmeas que porventura não se alimentaram de sangue. Após a alimentação sangüínea, as fêmeas foram transferidas para os potes de ovipostura. Os potes foram acondicionados em caixas de plástico com umidade controlada. As caixas plásticas foram postas em uma estufa incubadora, a uma temperatura constante de 26°C. Uma vez nos recipientes de oviposição, os adultos foram alimentados com água açucarada como descrito acima. As fêmeas mortas após a ovipostura foram retiradas e

montadas em bálsamo para posterior identificação da espécie. As larvas, após a eclosão, foram alimentadas com ração à base de fezes de coelho. Para combater os fungos, adicionou-se um pouco de areia previamente autoclavada nos recipientes seguida de uma leve agitação. Os adultos recém emergidos foram transferidos dos recipientes para uma gaiola e deixados à base de alimentação açucarada até o momento de exposição aos animais experimentais.

4.2 Animais de experimentação

Um total de 10-15 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* foi utilizado em cada camundongo na etapa de sensibilização dos animais. Estes insetos foram colocados em um alimentador artificial construído no laboratório a partir de um tubo de 50ml adaptado para expor somente a orelha a ser oferecida aos flebotomíneos. A exposição ocorreu em um período de 30 minutos.

Foram utilizados 76 camundongos BALB/c, 18-20g, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Os animais foram anestesiados com Ketamina (0,2mg/g) a cada exposição.

4.3 Obtenção do sonicado de glândula salivar (SGS)

As glândulas salivares foram retiradas de *Lutzomyia longipalpis* adultos com idade entre 5 e 7 dias após emergência. As glândulas extraídas foram colocadas em tubos de 1,5 ml, contendo salina fosfatada pH 7,4 (PBS) e estocadas a -70°C até o momento do uso. Os tubos com as glândulas foram

postos em um recipiente com gelo para evitar a desnaturação das proteínas glandulares. As glândulas foram sonicadas por 40 segundos, sendo 20 de cada lado do tubo para garantir a quebra total das glândulas, a uma frequência de 1Hertz e potência de 90 Watts (Branson Sonifier®, Danbury, CT, USA). Em seguida, o sonicado foi centrifugado (8161g/2min) com a finalidade de separar a saliva dos tecidos glandulares. A saliva foi diluída em salina, aliqotada e criopreservada a -70°C até a sua utilização.

4.4 Sensibilização e desafio dos camundongos

No esquema de sensibilização foram estabelecidos três grupos de animais: grupo (I) animais sem exposição a picadas; grupo (II): animais submetidos a uma única exposição; grupo (III): animais expostos cinco vezes, com intervalos de 10 dias, a picadas dos insetos. Todos os grupos foram desafiados com injeção de 0,2 par de glândulas salivares em 10 μl de SGS na orelha exposta (direita). Os grupos II e III foram desafiados após 10 dias da última exposição. Cada grupo foi composto de 12 animais.

4.5 Dosagem de imunoglobulinas

Os soros dos camundongos estudados, utilizados para a dosagem de anticorpos antialiva foram coletados através de punção retro-orbital 10 dias após o último desafio nos animais estudados. Aproximadamente 300 μl do sangue obtido foram colocados em tubo Eppendorf e, após retenção do coágulo, foram centrifugados a 2040g/6min. O soro recolhido foi estocado a -20°C até o uso.

Para a dosagem de IgG total, placas de 96 poços (Limbro/Titertek) foram sensibilizadas com 5 pares de sonicação de glândulas salivares de *L. longipalpis*/ml em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO₃ 0,45 M, Na₂CO₃ 0,02 M, pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4°C. Após três lavagens das placas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T 0,05%), fez-se o bloqueio com PBS-T 0,5% contendo albumina bovina sérica (BSA) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente (T.A.). Os soros foram diluídos a 1:10 em PBS-T 0,005% e incubados *overnight* a 4°C. Após três lavagens, os poços foram incubados com IgG anti-mouse conjugada à fosfatase alcalina, diluída a 1:1000, durante uma hora a 37°C. Depois de três lavagens, aplicou-se o substrato PNP-fosfato (paranitrofenil fosfato) 1mg/ml por 15 minutos a T.A. Interrompeu-se a reação com NaOH 3M. A leitura foi realizada com filtro de 405nm (Molecular Devices - eMax microplate reader, San Diego, CA). Para a dosagem das subclasses de IgG, placas de 96 poços (Immuno™ Plate Maxisorp™, Surface Flat Botton, Nunc, Naperville, USA) foram sensibilizadas como descrito acima. O bloqueio foi feito com PBS-T 0,5% por 2h à T.A. Em seguida adicionou-se os soros diluídos 1:50 em PBS-T 0,05% e incubou-se por 45 minutos à T.A. Após três lavagens, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com anti-IgG1, IgG2a e IgG2b de camundongos conjugados à peroxidase diluídos a 1:1000 em PBS-T 0,05%. Após três lavagens, aplicou-se o substrato (ExtrAvidin®, Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, USA) diluído a 1:400. Depois de quatro lavagens, foi usado como revelador o ABTS (2-2'-azino-di-[3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid] Sigma, St. Louis, USA)) na concentração de 0,5mg/ml (uma pastilha de ABTS de 10mg dissolvido em 20ml de perborato de sódio) e H₂O₂ (5µl/ml). Após cerca de 15 minutos, realizou-se a

leitura com filtro de 405nm (Molecular Devices - eMax microplate reader, San Diego, CA).

4.6 Histopatologia

As seções das orelhas correspondentes ao local desafiado (marcados com tinta Nankin) foram retiradas 2h e 48h após o desafio e fixadas em formol a 10%. Após serem processadas e hidratadas, as seções foram embebidas em parafina, cortadas na espessura de 5 micrômetros e coradas pela hematoxilina e eosina e, para a identificação dos mastócitos, pelo azul de toluidina. A quantificação das células inflamatórias foi realizada com objetiva de imersão 100x e ocular de 10x (Zeiss Axioskop-2). Foram contadas todas as células inflamatórias do sítio de inoculação com salina ou SGS nos 3 grupos de animais.

4.7 Bolsão inflamatório

Foi realizado a técnica do bolsão inflamatório de acordo com MATTE e OLIVIER (2002) nos três grupos de camundongos (I, II e III), na região subcutânea do dorso de camundongos BALB/c expostos e não expostos a picadas de *L. longipalpis*, sendo cada grupo subdividido em três subgrupos de quatro animais. Subgrupo 1 - injetados com LPS na concentração de 10µg/ml, diluído em 0,5 ml de salina estéril + 2ml de ar estéril. Subgrupo 2 - injetados com 0,5 par de glândula ssalivares em 0,5 ml de salina estéril + 2ml de ar estéril. Subgrupo 3 - considerados controles, injetados com 0,5 ml de salina estéril + 2ml de ar estéril. As células do exsudato inflamatório foram coletadas após 12 horas

da aplicação do estímulo. Para a coleta, realizou-se a lavagem do bolsão com o inóculo de 5 ml de salina estéril no interior do mesmo. Em seguida, as células do exsudato foram centrifugadas, resuspensas em 1 ml de salina, contadas em hemocítmetro, ajustadas para 10^4 células/ml, imobilizadas em lâminas por citocentrifugação (52,23g/5min) e coradas pelo Diff-Quick (Baxter, Miami, IL, USA). Foram contadas 200 células com objetiva de imersão, observando-se os diferentes tipos de células inflamatórias.

4.8 Análises estatísticas

A análise estatística foi utilizada com o uso do programa GraphPad-Prism 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA-USA). O teste *T* pareado foi aplicado para estabelecer o nível de significância entre os grupos de camundongos. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,005$.

5 RESULTADOS

5.1 Fêmeas alimentadas

Em média, $39,4 \pm 2,1\%$ das fêmeas alimentaram-se nos camundongos em cada exposição. Na quarta exposição, o número de fêmeas alimentadas foi estatisticamente maior em comparação com a primeira ($p=0.002$). Quando se compara a primeira exposição com a última, não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0.173$) (Figura 1).

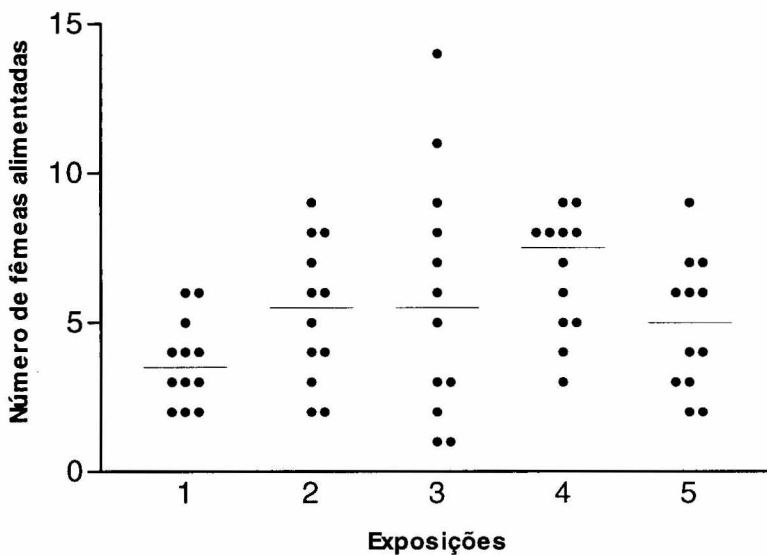


Figura 1. Número de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em camundongos BALB/c em cada exposição. Os camundongos foram expostos a 10-15 fêmeas do flebotomíneo por cerca de 30 minutos. As fêmeas foram contidas em um alimentador artificial preso à orelha direita dos camundongos. As fêmeas engorgitadas foram contadas ao final de cada exposição.

5.2 Anticorpos antialiva

Os camundongos expostos cinco vezes a picadas de *L. longipalpis* apresentaram níveis de anticorpos IgG antialiva ($DO=0,213 \pm 0,014$) mais altos em comparação aos animais não expostos ($DO=0,004 \pm 0,001$) e aqueles expostos

somente uma vez ($DO=0,005 \pm 0,001$) (Figura 2). Os níveis de anticorpos IgG1 também foram mais altos nestes animais ($DO=0.120 \pm 0.020$) quando comparados aos animais não expostos ($DO=0.008 \pm 0.002$) e aqueles expostos uma vez ($DO=0.005 \pm 0.001$). Não houve significância estatística quando se compara os níveis de anticorpos IgG2a e IgG2b dos animais 5 vezes sensibilizados ($DO=0.009 \pm 0.002$; 0.011 ± 0.002 , respectivamente) com os animais não sensibilizados ($DO=0.007 \pm 0.002$; 0.008 ± 0.001 , respectivamente) e aqueles com uma sensibilização ($DO=0.006 \pm 0.001$; 0.013 ± 0.001 , respectivamente) (figura 2).

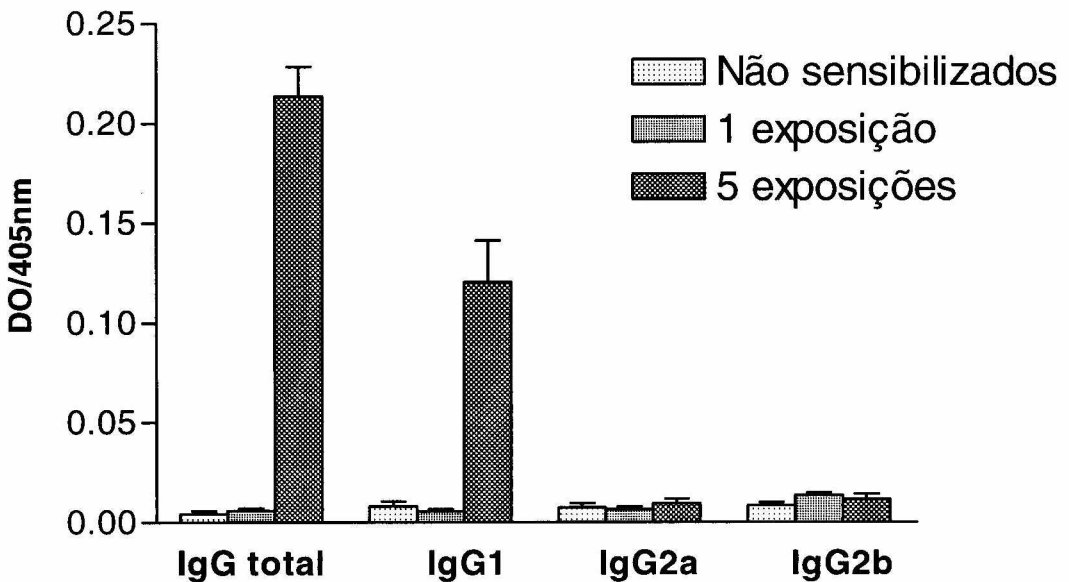


Figura 2. Níveis de anticorpos da classe, IgG e subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b antialérgica de *L. longipalpis* no soro de camundongos BALB/c de acordo com o grau de exposição a saliva do inseto. Três grupos de camundongos foram expostos a sensibilização por picada de *L. longipalpis* por 5x (grupo 1), 1x (grupo 2) ou não expostos (grupo 3). Os soros dos animais foram coletados 10 dias após a última exposição. O intervalo entre cada exposição foi de 10 dias. Os níveis de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b antialérgica foram determinados através do teste ELISA e a leitura foi realizada com filtro de 405nm.

5.3 Histopatologia

O infiltrado inflamatório na orelha dos camundongos cinco vezes expostos a picadas de *L. longipalpis* mostrou-se mais intenso (salina=122,6; SGS=446,8) do que nos animais não sensibilizados (salina=26,2; SGS= 31,6) e nos animais com uma exposição (salina=79,5; SGS=96,1). Houve um aumento do número de neutrófilos, macrófagos e mastócitos ao longo das sensibilizações (tabela 1). Os eosinófilos foram encontrados na derme auricular a partir da primeira exposição após 2h do desafio com SGS e foram mais representativos na orelha dos animais com cinco exposições, tanto 2h ($18\pm 6,1$) quanto 48h ($88\pm 2,7$) após o desafio com SGS (tabela 1 e figura 3).

Nos animais não sensibilizados não houve diferença no número diferencial de células quanto ao desafio, exceto quanto ao número de neutrófilos entre 2h e 48h (salina = 2h: $10,4\pm 4,4$; 48h: $1,3\pm 2,8$). Nos animais expostos uma vez, foi observado uma presença mais consistente de neutrófilos, mastócitos e eosinófilos 2h após o desafio com SGS ($31,6\pm 6,0$; 10 ± 2 ; $2\pm 1,7$, respectivamente), em comparação aos animais não sensibilizados desafiados com SGS ($12,8\pm 4,0$; 7 ± 2 ; $0,0$, respectivamente). Com 5 exposições as diferenças entre os desafios com salina e SGS se conservaram em relação aos neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. O número de macrófagos foi diferente entre 2h e 48h após o desafio com salina ($17,4\pm 4,3$; $29,3\pm 9,7$, respectivamente) e com SGS ($41,7\pm 12,4$; $60,9\pm 8,7$, respectivamente).

Os animais com 5 exposições após 2h do desafio com salina observou-se um edema moderado enquanto nos desafiados com SGS foi observado hemorragia e o edema foi mais intenso. O quadro histopatológico após 48h do desafio com salina o edema se mostrou discreto, e nos animais desafiados com SGS foi observado focos de necrose e células de aspecto apoptótico.

Tabela 1. Quantificação de células inflamatórias encontradas no local do desafio com sonicado de glândula salivar em orelhas de camundongos BALB/c com diferentes exposições a picadas de *L. longipalpis*.

		2h				48h			
		Neut	Mφ	Eos	Mast	Neut	Mφ	Eos	Mast
NS	Salina	10,4±4,4	6,5±2,5	0	4±1	1,3±2,8	0	0	4±1
	SGS	12,8±4,0	5,8±4,7	0	7±2	0	0	0	6±1
1x	Salina	19,7±4,8	15,1±4,6	0	6±1	14,4±3,3	19,3±4,4	0	5±1
	SGS	31,6±6,0	17,6±4,3	2±1,7	10±2	12,7±2,9	14,2±5,8	0	8±3
5x	Salina	27,1±7,5	17,4±4,3	0	10±2	26,8±10,3	29,3±9,7	0	12±3
	SGS	143,5±8,8	41,7±12,4	18±6	14±2	66,9±10,2	60,9±8,7	8±2,7	13±3

As seções das orelhas correspondentes ao local desafiado foram retiradas após 2 e 48 horas do desafio e fixadas em formol a 10% e coradas com hematoxilina e eosina. A quantificação das células inflamatórias foi realizada com objetiva de imersão 100x e ocular de 10x. Utilizou-se a contagem de todas as células inflamatórias do sítio de inoculação com salina ou SGS nos 3 grupos de animais.

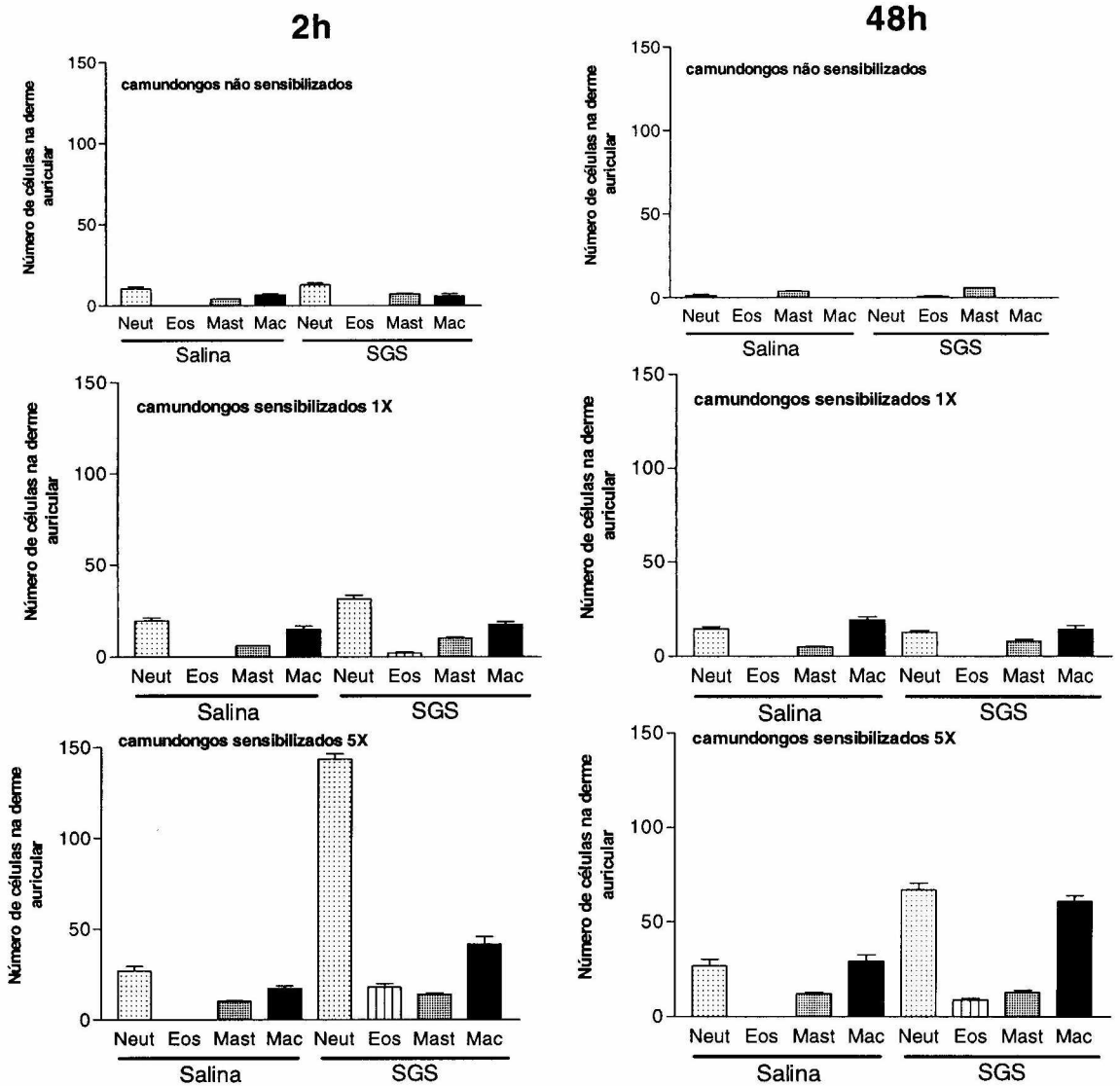


Figura 3. Células presentes na derme auricular de camundongos BALB/c expostos e não expostos a picadas de *L. longipalpis* e desafiados com salina ou SGS. As seções das orelhas foram retiradas após 2 e 48 horas do desafio, fixadas e coradas pela hematoxilina e eosina. Utilizou-se a contagem de todas as células inflamatórias do sítio de inoculação com salina ou SGS nos 3 grupos de animais.

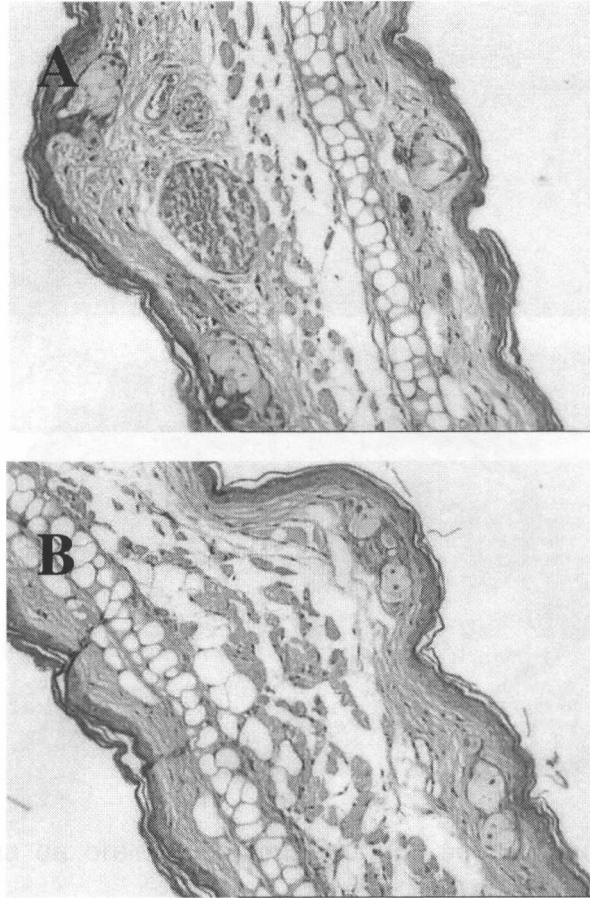


Figura 4. Histologia da orelha de camundongos não sensibilizados após 2h e 48h do desafio com SGS. A seta mostra em **A** área de edema e congestão vascular. As lâminas foram coradas pela hematoxilina & eosina (200X).

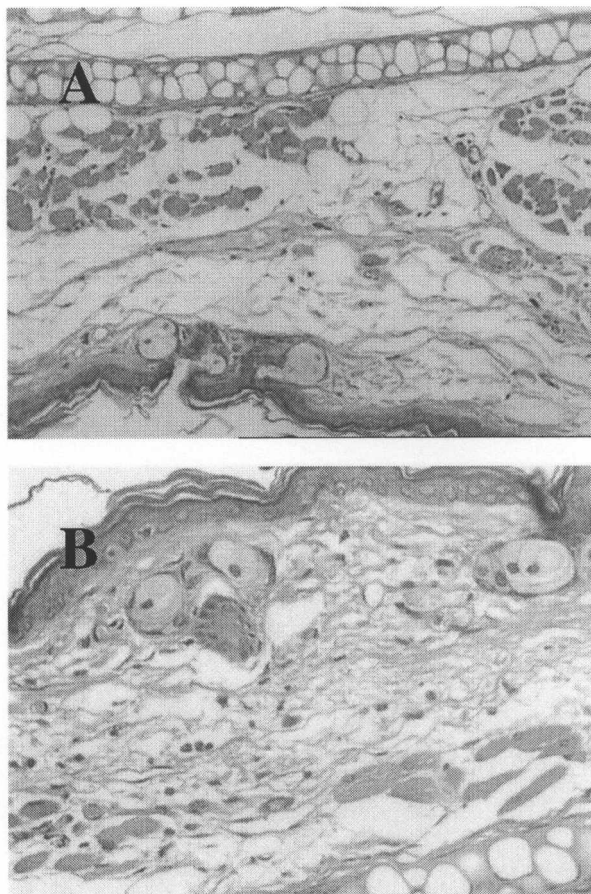


Figura 5. Histologia da orelha de camundongos sensibilizados 5X após 2h do desafio com salina e SGS. A seta mostra em **B** um edema mais intenso e com infiltrado inflamatório representado por neutrófilos e eosinófilos. As lâminas foram coradas pela hematoxilina & eosina (200X).

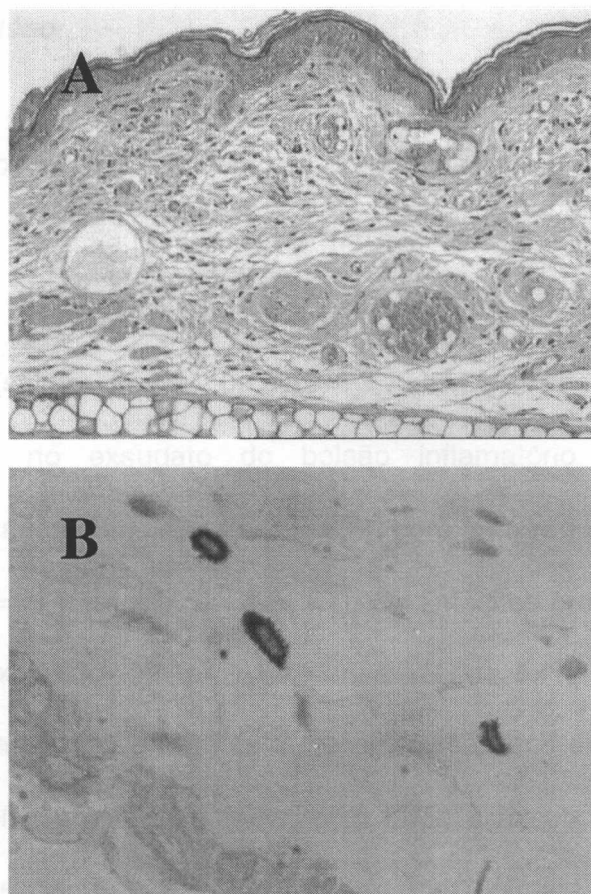


Figura 6. Histologia da orelha de camundongos não sensibilizados após 48h do desafio com SGS. A seta mostra em **A** um infiltrado intenso de macrófagos e neutrófilos, corados pela hematoxilina & eosina (200X) e em **B** mastócitos corados pelo azul de toluidina (1000X).

5.4 Bolsão inflamatório

Os neutrófilos foram as células que predominaram no exsudato inflamatório nos três grupos de camundongos: não sensibilizados (salina= $67,6 \pm 0,8$; SGS= $51,25 \pm 11,6$), sensibilizados 1x (salina= $65,5 \pm 4,9$; SGS= $63,2 \pm 0,2$) e sensibilizados 5x (salina= $65,25 \pm 1,0$; SGS= $73,75 \pm 3,8$) (Tabela 2). O número de Mo/M ϕ foi maior no exsudato do bolsão inflamatório dos animais não sensibilizados injetados com SGS ($33,25 \pm 8,8$), com uma redução nas exposições subseqüentes (1X= $16,15 \pm 4,4$ e 5X= $4,2 \pm 1,7$). Os linfócitos mostram-se levemente aumentados no exsudato dos animais sensibilizados 5x e tratados com SGS (salina= $15,5 \pm 3,5$) em relação à primeira sensibilização nos animais tratados com SGS ($5,25 \pm 1,7$). Nos animais injetados com LPS, o exsudato foi representado predominantemente por neutrófilos, quer seja nos animais não sensibilizados, quer seja nos animais sensibilizados 1 e 5 vezes.

Tabela 2. Número percentual de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c sensibilizados com picadas de *L. longipalpis* e tratados com salina e SGS.

Exposição	Desafio	Neutrófilo (%)	Macrófago (%)	Eosinófilo (%)	Linfócito(%)
Ns	Salina	67,6 ±0,8	18,25±2,4	5,1±1,2	9,0±2,8
	SGS	51,25±11,6	33,25±8,8	10,25±1,0	5,25±1,7
1x	Salina	65,5±4,9	21,5±2,1	10,25±1,0	3,0±1,4
	SGS	63,2±0,2	16,15±4,4	6,3±1,4	11,5±2,1
5x	Salina	65,25±1,0	14,25±1,7	2,2±0,3	8,5±1,4
	SGS	73,75±3,8	4,2±1,7	6,5±2,1	15,5±3,5

O bolsão inflamatório foi feito com a injeção de 2ml de ar estéril juntamente com extrato de glândula salivar e salina na região subcutânea do dorso dos camundongos. As células do exsudato foram coletadas após 12h. Em seguida foram centrifugadas, resuspensas, contadas em câmara de Neubauer e em lâminas coradas pelo Diff-Quick para a contagem diferencial.

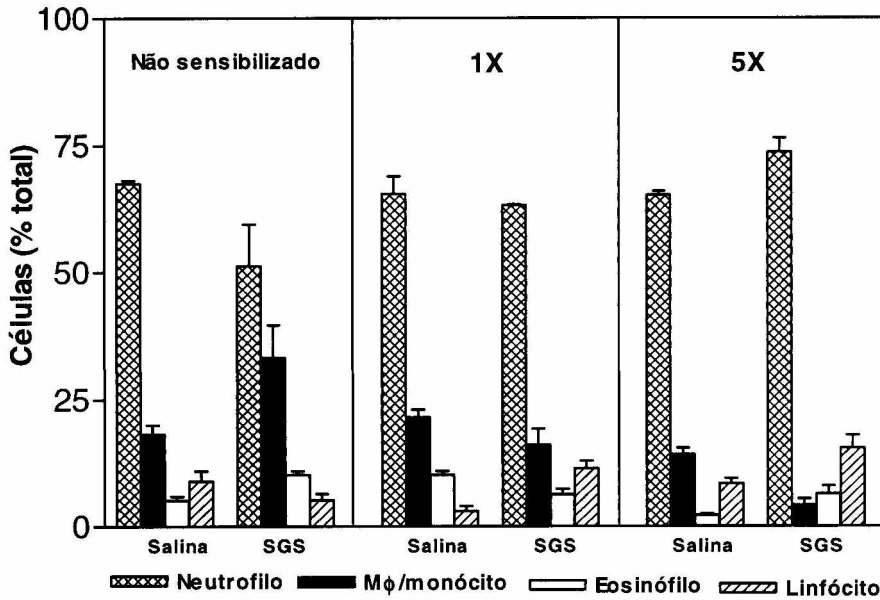


Figura 7. Número percentual de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c sensibilizados com picadas de *L. longipalpis* e tratados com salina e SGS. O bolsão inflamatório foi feito com a injeção de 2ml de ar estéril juntamente com extrato de glândula salivar e salina na região subcutânea do dorso dos camundongos. As células do exsudato foram coletadas após 12h do inóculo dos estímulos no bolsão. Em seguida foram centrifugadas, resuspensas, contadas em câmara de Neubauer e em lâminas coradas pelo Diff-Quick para a contagem diferencial.

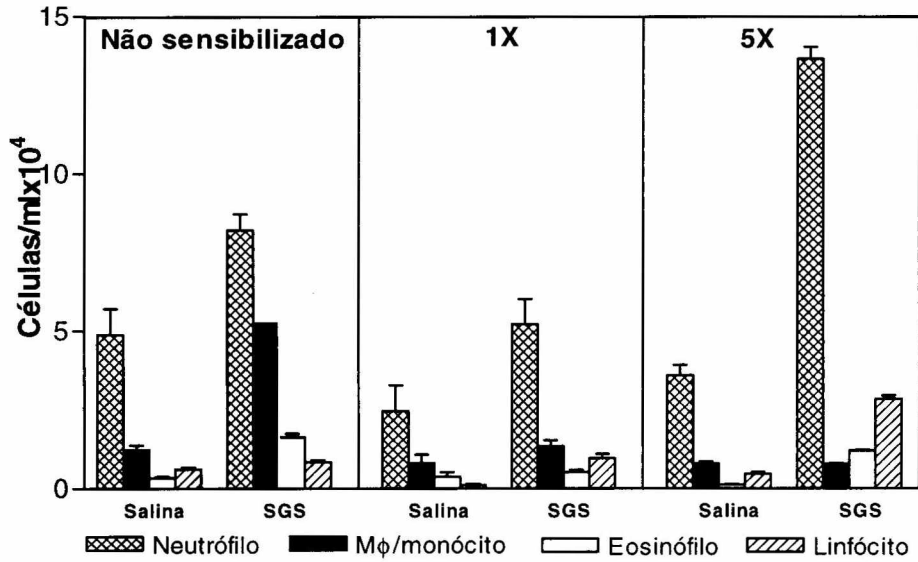


Figura 8. Número de células acumuladas no exsudato do bolsão inflamatório após 12h do estímulo com SGS de *L. longipalpis* e salina. O bolsão inflamatório foi feito com a injeção de 2ml de ar estéril juntamente com extrato de glândula salivar e salina na região subcutânea do dorso dos camundongos. As células do exsudato foram coletadas após 12h do inóculo dos estímulos no bolsão. Em seguida foram centrifugadas, resuspensas, contadas em câmara de Neubauer e em lâminas coradas pelo Diff-Quick para a contagem diferencial.

6 DISCUSSÃO

Em média, $39,4 \pm 2,1\%$ das fêmeas alimentaram-se nos camundongos em cada exposição. O número de fêmeas alimentadas está relacionado com o grau de preferência alimentar de cada espécie de inseto. *Phlebotomus papatasi* alimenta-se bem em camundongos, no entanto *L. longipalpis*, que se alimenta bem em humanos, coelhos e em hamsters, alimenta-se com dificuldades em camundongos, tal qual *P. perniciosus* e *P. halepensis*, como observado por VOLF e ROHOUSOVÁ (2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que a contínua exposição de animais de experimentação a ectoparasitas permanentes resulta em diminuição do grau de infestação destes nos hospedeiros, através de uma resistência adquirida desenvolvida ao longo do contato entre ectoparasita e hospedeiro (TRAGER, 1939; RATZLAFF; WIKEL, 1990; MACALUSO; WIKEL, 2001). A existência ou não desta resistência depende tanto da espécie do ectoparasita quanto do hospedeiro (SCHOELER; WIKEL, 2001). Neste contexto, os estudos com insetos ectoparasitas temporários são escassos (ALGER; CABRERA, 1972; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 1998; VOLF; ROHOUSOVÁ, 2000). GHOSH e MUKHOPADHYAY (1998) verificaram uma diminuição entre a primeira e a décima - primeira exposição do número de fêmeas do flebotomíneo *P. argentipes* alimentadas semanalmente em hamsters. No presente estudo, não foi evidenciada redução do número de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas nos camundongos ao longo das cinco exposições, mostrando que no sistema camundongo/*L. longipalpis* esta relação talvez não exista ou o número de

exposições aqui trabalhadas não foi suficiente para se detectar uma diminuição significativa do processo hematofágico.

Os camundongos BALB/c expostos cinco vezes (5X) a picadas de *L. longipalpis* produziram anticorpos IgG antialiva em maior quantidade que os animais não sensibilizados ou sensibilizados apenas uma vez. Anticorpos antialiva de flebotomíneos têm sido detectados em hamsters repetidamente expostos às picadas de *P. argentipes* (GHOSH; MUKHOPADHYAY, 1998), em hamsters, coelhos e camundongos picados por *P. papatasi*, *P. perniciosus* e *P. halepensis* (VOLF; ROHOUSOVÁ, 2000) e em camundongos inoculados por lisado de glândula salivar de *P. papatasi* (BELKAID et al., 1998). Isto sugere que a saliva destes insetos não tenha algum efeito imunossupressor sobre as células produtoras de imunoglobulinas, como acontece com a saliva do simuliídeo *Simulium vittatum* e do reduviídeo *Rhodnius prolixus*, (CROSS et al., 1993; KALVACHOVA et al., 1999).

Os camundongos sensibilizados 5X apresentaram maiores níveis de anticorpos IgG1 que os camundongos não sensibilizados ou sensibilizados apenas uma vez, como já verificado em trabalhos anteriores com modelos murinos expostos a picadas de mosquitos (CHEN et al., 1998; OHTSUKA et al., 2001). Não houve alteração dos níveis de IgG2a ao longo das exposições, como demonstrado por CHEN e cols. (1998), WANG e cols. (1999) e OHTSUKA e cols. (2001). Os anticorpos da subclasse IgG1 estão associados com processos alérgicos e com o grau de exposição dos animais a insetos, sendo regulados pelas citocinas Th2, como a IL-4 (CHEN et al., 1998), enquanto isto, os anticorpos

da subclasse IgG2a regulados pelas citocinas Th1, como o IFN- γ (SNAPPER et al., 1988). Os resultados aqui apresentados mostram que os camundongos sensibilizados com picadas de *L. longipalpis* desenvolveram uma resposta predominantemente do tipo Th2.

Nas orelhas dos animais expostos 5X a picadas de *L. longipalpis*, um infiltrado mais pronunciado foi formado em relação aos grupos de camundongos expostos 1X ou não expostos. Em animais de laboratório, quando continuamente expostos às picadas de ectoparasitas permanentes, o infiltrado inflamatório se intensifica no decorrer das infestações. Este infiltrado intenso está relacionado com a diminuição do ectoparasitismo nos hospedeiros (MOORHOUSE; TATCHELL, 1969; NELSON et al., 1972, 1979; WALKER; FLETCHER, 1986). Nos estudos de RATZLAFF e WIKEL (1990) com o piolho *Polyplax serrata*, as alterações cutâneas resultantes das infestações foram associadas com a resistência dos camundongos aos piolhos. O número aumentado das células inflamatórias é importante na transmissão de patógenos por artrópodes, visto que nos animais sensibilizados pela saliva de insetos as lesões são muito menos severas e há também uma diminuição inicial da carga parasitária (KAMHAWI et al., 2000).

O infiltrado nas orelhas dos animais sensibilizados 5X sugere a formação de uma resposta tardia mista, com a participação de elementos tanto de uma resposta tardia da hipersensibilidade tipo I, representada pelos eosinófilos, quanto de uma resposta de hipersensibilidade tipo IV, representada pelos macrófagos. Isto difere da resposta tardia clássica representada predominantemente pelos

macrófagos e linfócitos. Esta resposta mista pode conferir eficiência na eliminação de parasitas intracelulares transmitidos por insetos vetores a hospedeiros já sensibilizados, como verificado por ANDRADE e cols. (1984) estudando a imunopatologia da leishmaniose cutânea experimental.

Os neutrófilos tiveram seu número aumentado ao longo das exposições, bem evidenciado nos animais com 5 sensibilizações e desafiados com saliva. Estas células são importantes na redução da carga parasitária no início de uma infecção por parasitas transmitidos aos animais sensibilizados. NELSON e cols. (1979) verificaram que neutrófilos, juntamente com mastócitos, estavam presentes na linhagem de camundongo (CFW) que desenvolveu resistência inicial a infestação pelo piolho *Poliplax serrata* e ausentes na linhagem de camundongo (C57BL/6) que não apresentou tal resistência. BELKAID e cols. (1998) encontraram um predomínio de neutrófilos na derme auricular dos camundongos BALB/c previamente sensibilizados com SGS de *P. papatasi* e que este predomínio poderia estar relacionado com a diminuição da susceptibilidade dos camundongos BALB/c à infecção por *L. major*.

Na histologia do pavilhão auditivo, os macrófagos foram mais encontrados nos animais 5 vezes sensibilizados, principalmente nos animais desafiados com saliva. Desta forma, os macrófagos são as células que, juntamente com os neutrófilos, estariam envolvidas na eliminação parasitária no início de uma infecção. Entretanto, utilizando a técnica do bolsão inflamatório, os monócitos/macrófagos foram mais encontrados no exsudato dos animais não sensibilizados tratados com SGS. Dados semelhantes foram relatados por ANJILI

e cols. (1995), estudando a quimiotaxia da saliva do flebotomíneo *P. duboscqi* sobre macrófagos murinos em lâminas de agarose e por ZER e cols. (2001), com a saliva dos flebotomíneos *L. longipalpis* e *P. papatasi*, através de estudos em câmaras de quimiotaxia. A capacidade quimiotática da saliva é de grande importância para os parasitas intracelulares que precisam ingressar nas células fagocíticas e escapar das ações eliminatórias do meio extracelular. No exsudato do bolsão inflamatório dos animais com 5 exposições, o número de monócitos/macrófagos foi menor. Isto se deve, provavelmente, à participação dos anticorpos antialiva de *L. longipalpis* que estariam exercendo um papel bloqueador da ação quimiotática da saliva.

O número de mastócitos na orelha dos camundongos sensibilizados 5 vezes foi maior que os animais não sensibilizados ou expostos uma vez. Os mastócitos são células muito importantes nas reações de hipersensibilidade imediata, através do processo de degranulação e liberação de mediadores vasoativos no local da inflamação. Estas células, assim como os basófilos, são também muito importantes na aquisição de resistência ao ectoparasitismo (ASKENASE, 1977; BROWN; ASKENASE, 1981; 1983; 1982; MATSUDA et al., 1990). As substâncias vasoativas presentes nos grânulos mastocitários são importantes na indução de uma resposta celular tardia (GERSHON et al., 1975), sendo responsável pelo acúmulo das células participantes na formação da DTH, como os macrófagos.

Os eosinófilos são células comuns nas infecções parasitárias, reações alérgicas e naquelas induzidas por picadas de insetos hematófagos (CAPRON,

1992; GLEICH et al., 1993). Estas células estavam ausentes nas orelhas dos animais não sensibilizados, no entanto já eram observados após a primeira exposição. BROWN e ROSALSKY (1984) detectaram um aumento de eosinófilos sanguíneos 7 dias após as picadas de fêmeas de *L. longipalpis* em cobaios e PARANHOS e cols. (1993) observaram eosinofilia em cães quando foram inoculados via intradérmica com uma mistura de promastigotas de *L. chagasi* e lisado de glândula salivar de *L. longipalpis*.

Os anticorpos antialérgicos presentes nos indivíduos regularmente expostos a picadas de insetos hematófagos (REUNALA et al., 1994; PALOUSHO et al., 1997; PENG et al., 1998; BARRAL et al., 2000) podem neutralizar o efeito exacerbador dos componentes salivares e influenciar na susceptibilidade às infecções transmitidas por insetos vetores, como demonstrado experimentalmente por BELKAID e cols. (1998). Os flebotomíneos são insetos que permanecem por curto contato com a sua fonte alimentar e, por conseguinte, durante o repasto de sangue, não sofrem as conseqüências de uma resposta exacerbada verificada nos animais sensibilizados. No entanto, as modificações cutâneas, tais como descamação e espessamento, nos animais continuamente expostos podem impedir os insetos de exercerem a hematofagia (NASH et al., 1965). Ao contrário dos insetos, os parasitas por eles transmitidos encontram um ambiente modificado e resistente à permanência e sobrevivência destes patógenos no local da picada.

8 CONCLUSÃO

A saliva de *L. longipalpis* induz uma resposta inflamatória com características indicativas de uma resposta mista, com elementos de uma reação tipo Th2 e aspectos de uma reação tardia do tipo DTH, além de apresentar quimiotaxia para macrófagos, modulada com as exposições, demonstrada no modelo do bolsão inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 470p.
- ALGER, N.; CABRERA, E. An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. **J. Econ. Entomol.**, **65**:165-168, 1972.
- ALLEN, J.R. Passive transfer between experimental animals of hypersensitivity to *Aedes aegypti* bites. **Exp. Parasitol.**, **19**:132-137, 1966.
- ALLEN, J.R.; WEST, A.S. Some properties of oral secretions from *Aedes aegypti* (L.). **Exp. Parasitol.**, **19**:124-131, 1966.
- ANDRADE, Z.; REED, S.G; ROTERS, S.B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Parasitol.**, **114**:137-141, 1984.
- ANJILI, C.; MBATI, P.; MWANGI, R.; GITHURE, J.; OLOBO, J.; ROBERT, L.; KOECH, D. The chemostatic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, **60**: 97-100, 1995.
- AREAN, V.; FOX, I. Dermal alteration in severe reaction to the bite of the sandfly, *Culicoides furens*. **Am. J. Clin. Pathol.**, **25**:1359-1366, 1955.
- ASKENASE, P.W. Immune inflammatory response to parasites: the role of basophils, mast cells and vasoactive amines. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **26**:97-103, 1977.
- BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J.M. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **62**:740-745, 2000.
- BASANOVA A.V.; BASKOVA I.P.; ZAVALOVA LL. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry**, **67**:143-150, 2002.

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.; RIBEIRO, J. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly? **PNAS**, **97**: 6704-6709, 2000.

BENJAMINI, E.; FEINGOLD B.; KARTMAN, L. Skin reactivity in guinea pigs sensitized to flea bites: the sequence of reactions. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **108**: 700-702, 1961.

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

BROWN, S.; ROSALSKY, J. Blood leukocyte response in hosts parasitized by the hematophagous arthropods *Triatoma protracta* and *Lutzomyia longipalpis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **33**: 499-505, 1984.

BROWN, S.J.; ASKENASE, P.W. Blood eosinophil and basophil response in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **31**: 593-598, 1982.

BROWN, S.J.; ASKENASE, P.W. Cutaneous basophil response and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. **J. Immunol.**, **127**:2163-2167, 1981.

BROWN, S.J.; WORMS, M.J.; ASKENASE, P.W. Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). IV. Differences in blood basophil kinetics in hosts parasitized by Ixodid and Argasid ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**:897-902, 1983.

BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOUSHO, T.; FRANÇOIS, G.; REUNALA, T. Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **112**: 169-174, 1997.

CAPRON, M. Dual function of eosinophils in pathogens and protective immunity against parasites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**:83-89, 1992.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: UFPR, 1991. 228p.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **PNAS**, **96**: 15155-15160, 1999.

CHEN, Y.L.; SIMONS, F.E.R.; PENG, Z. A mouse model of mosquito allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation and IL-4 and IFN- γ production. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **116**: 269-277, 1998.

CRIEP, L. Allergy to arthropods. In: CRIEP, L. **Allergy and clinical immunology**. New York: Grune & Stratton, 1976. cap. 44, p.529-538.

CROSS, M.; CUPP, M.; CUPP, E.; GALLOWAY, A.; ENRIQUEZ, F. Modulation of immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). **J. Med. Entomol.**, **30**:928-935, 1993.

CROSS, M.; CUPP, M.; CUPP, E.; RAMBERG, F.; ENRIQUEZ, F. Antibody response of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). **J. Med. Entomol.**, **30**:725-734, 1993.

DONNELLY, K.B.; LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Histological characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania brasiliensis* in the presence or absence of sandfly salivary gland lysate. **J. Parasitol.**, **84**:97-103, 1998.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica. Psychodidae Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA / Universidade de São Paulo, 1973. v. 4. 657p.

GERSHON, R.K.; ASKENASE, P.W.; GERSHON, M.D. Requirement for vasoactive amines for production of delayed-type hypersensitivity skin reactions. **J. Exp. Med.**, **142**: 732-747, 1975.

GHOSH, K.; MUKHOPADHYAY, J. The effect of antisaliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Inter. J. Parasitol.**, **28**:275-281, 1998.

GILLESPIE, R.; MBOW, M.; TITUS, R. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite immunol.**, **22**:319-331, 2000.

GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R.; LEIFERMAN, K.M. The biology of the eosinophil leukocyte. **Ann. Rev. Med.**, **44**: 85-101, 1993.

GOLDMAN, L.; ROCKWELL, E.; RICHFIELD, D. III. Histopathological studies on cutaneous reactions to the bites of various arthropods. **Am. J. Trop. Med.**, **1**:514-525, 1952.

GORDON, R.; CREWE, W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **42**:335-356, 1948.

HALL, L.; TITUS, R. Sand fly saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J. Immunol.**, **155**:3501-3506, 1995.

JAMES, A.A.; ROSSIGNOL, P.A. Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. **Parasitol. Today**, **7**:267-60, 1991.

KALVACHOVA, P.; HRIBALOVÁ, V.; KODYM, P.; WOLF, P. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **J. Med. Entomol.**, **36**:341-344, 1999.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, **290**:1351-1354, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.**, **4**:1-24, 1990.

LARRIVE, D.H.; BENJAMINI, E.; FEINGOLD, B.F.; SHIMIZU, M. Histological studies of guinea pig skin: different stages of allergic reactivity to flea bites. **Exp. Parasitol.**, **15**: 491-602, 1964.

LENG, Y.J. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **81**:311-317, 1987.

LERNER, E.; SHOEMAKER, C. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **J. Biol. Chem.**, **267**:1062-1066, 1992.

LEWIS DJ. Internal structural features of some Central American phlebotomine sandflies. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **59**:375-385, 1965.

LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. **Bull. Wld. Hith. Org.**, **44**:535-551, 1971.

LEWIS, D.J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annu. Rev. Entomol.**, **19**:363-384, 1974.

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

MACALUSO, K.R.; WIKEL, S.K. *Dermacentor andersoni*: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production and adhesion-molecule expression by BALB/c mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **95**:413-427, 2001.

MARTINS A.V.; MORALES-FARIAS E.N. On the geographic distribution of American Phlebotomus species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Rev. Bras. Biol.**, **32**:361-371, 1972.

MATSUDA, H.; WATANABE, N.; KISO, Y.; HIROTA, S.; USHIO, H.; KANNAN, Y.; AZUMA, M.; KOYAMA, Y.; KITAMURA, Y. Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalia longicornis* ticks in mice. **J. Immunol.**, **144**:259-262, 1990.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J. Infect.**, **185**: 673-681, 2002.

McKIEL, J.A. Sensitization to mosquito bites. **Can. J. Zool.**, **37**:341-351, 1959.

McKIEL, J.A.; WEST, A.S. Effects of repeated exposures of hypersensitivity humans and laboratory rabbits to mosquito antigens. **Can. J. Zool.**, **39**:597-603, 1961.

MOORHOUSE, D.E; TATCHELL, R.J. Histological responses of cattle and other ruminants to the recent attachment of ixodid larvae. **J. Med. Ent.**, **6**:419-422, 1969.

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

NASH, T.A.M.; KERNAGHAN, R.J.; WRIGHT, A.I. A method for the prevention of skin reaction in goats used for feeding tsetse flies, *Glossina* spp. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **59**:88-94, 1965.

NELSON, W.A.; BELL, J.F.; STEWART, S.J. *Polyplax serrata*: cutaneous cytologic reactions in mice that do (CFW strain) and do not (C57BL strain) develop resistance. **Exp. Parasitol.**, **48**:259-264, 1979.

NELSON, W.A.; CLIFFORD, C.M.; BELL, J.F.; HESTEKIN, B. *Polyplax serrata*: histopathology of the skin of louse-infected mice. **Exp. Parasitol.**, **31**:194-202, 1972.

OHTSUKA, E.; KAWAI, S.; ICHIKAWA, T.; NOJIMA, H.; KITAGAWA, K.; SHIRAI, Y.; KAMIMURA, K.; KURAIISHI, Y. Roles of mast cells and histamine in mosquito bite-induced allergic itch-associated responses in mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, **86**: 97-105, 2001.

PALOSUO, K.; BROMMER-KORVENKONTIO, H.; MIKKOLA, J.; SAHI, T.; REUNALA, T. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquitoes bites. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **114**:367-372, 1997.

PENG, Z.; LI, H.; SIMONS, F.E.R. Immunological analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **101**:498-505, 1998.

QUERESHI, A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R.; LERNER, E. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **54**:665-671, 1996.

RATZLAFF, E.R.; WIKEL, K.S. Murine immune responses and immunization against *Polyplax serrata* (Anoplura: Polyplacidae). **J. Med. Entomol.**, **27**:1002-1007, 1990.

REBÊLO, J.M.M.; OLIVEIRA, S.T.; BARROS, V.L.L.; SILVA, F.S.; COSTA, J.M.L.; FERREIRA, L.A.; SILVA, A.R. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I- Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **33**: 11-19, 2000.

REUNALA, W.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOUSHO, T. Are we really allergic to mosquito bites? **Ann. Med.**, **26**:301-306, 1994.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 350p.

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

RIBEIRO, J. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med. Vet. Entomol.**, **14**:142-148, 2000.

RIBEIRO, J., NUSSENZVEIG, R.; TORTORELLA, G. Salivary vasodilators of *Aedes triseriatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, **31**:747-753, 1994.

RIBEIRO, J., SCHEIDER, M., ISAIAS, T., JUBERG, J., GALVÃO, C.; GUIMARÃES, J. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **J. Med. Entomol.**, **35**: 599-610, 1998.

SAMSOM, J.E.; REYNOLDS, N.J.; PEACHEY, R.D.G. Delayed reaction to bed bug bites. **Arch. Dermatol.**, **128**:272-273, 1992.

SCHOELER, B.G.; MANWEILER, A.S.; BERGMAN, K.D.; WIKEL, K.S. Influence of repeated infestations with pathogen-free *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) on in vitro lymphocyte proliferation responses of C3H/HeN mice. **J. Med. Entomol.**, **37**:885-892, 2000.

SCHOELER, G.B.; WIKEL, S.K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **95**:755-771, 2001.

SEDGWICK, A.D.; SIN, Y.M.; EDWARDS, J.C.W.; WILLOUGHBY, D.A., Increased Inflammatory Reactivity in Newly Formed Lining Tissue. **J. Pathol.**, **141**:483-487, 1983.

SHERLOCK, I. Ecological interaction of visceral leishmaniasis in Bahia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**:671-683, 1996.

SNAPPER, C.M.; PESCHEL, C; PAUL, W.E. IFN- γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, **140**: 2121-2127, 1998.

THEODOR, O. A study of the reaction to *Phlebotomus* bites with some remarks on "harara". **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **24**:273-284, 1935.

THEODOS, C.; TITUS, R. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. **Parasite Immunol.**, **15**:481-487, 1993.

TITUS, R.; RIBEIRO, J. Salivary glands lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, **239**:1306-1308, 1988.

TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **J. Parasitol.**, **25**:57-81, 1939.

VALENZUELA J.G; BELKAID Y.; GARFIELD M.K; MENDEZ S.; KAMHAWI S.; ROWTON E.D; SACKS D.L. RIBEIRO JM. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J. Exp. Med.**, **194**:331-342, 2001.

VOLF, P.; TESAROVA, P.; NOHYNKOVÁ, E. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. **Med. Vet. Entomol.**, **14**:251-256, 2000.

VOLF, P; ROHOUSOVÁ. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitology**, **122**:37-41, 2001.

WAITUMBI, J.; WARBURG, A. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. **Infect. Immun.**, **66**:1534-1537, 1998.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D. Histological study of the attachment sites of adult *Rhipicephalus appendiculatus* on rabbits and cattle. **Int. J. Parasitol.**, **16**: 399-413, 1986.

WANG, H.M.; SIMONS, F.E.R.; PENG, Z. Induction of IgE responses using a recombinant mosquito salivary allergen rAed a2 without adjuvant in mice. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **120**:135-140, 1999.

YIN, H.; NORRIS, H.; LANZARO, G. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. **Insect Mol. Biol.**, **9**:309-314, 2000.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies: Central and South America (Diptera, Psychodidae)**. Gainesville, Flórida. 1994. 881p.

ZAVALOVA L.L.; BASANOVA A.V.; BASKOVA I.P. Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. **Biochemistry**, **67**:135-142, 2002.

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