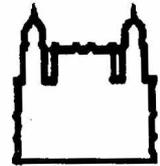




UFBA

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

ESTUDO PROTÉICO DASALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E O EFEITO DE SEUS EXTRATOS UTILIZANDO O MODELO DO BOLSÃO INFLAMATÓRIO

DEBORACI BRITO PRATES

Salvador - Bahia - Brasil
2005

431.6



001664

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO PROTÉICO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)
(DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E O EFEITO DE SEUS EXTRATOS UTILIZANDO
O MODELO DO BOLSÃO INFLAMATÓRIO**

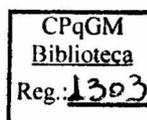
DEBORACI BRITO PRATES

Orientadora: Dra. Aldina Barral

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.

Salvador - Bahia – Brasil

2005



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Prates, Deboraci Brito
P912e Estudo protéico da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotominae) e o efeito de seus extratos utilizando o modelo do bolsão inflamatório [manuscrito] / por Deboraci Brito Prates. – 2005.

82 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina . Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientadora: Prof. Dra. Aldina Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. Saliva. 2. Eletroforese. 3. SDS-PAGE. I. Título.

CDU 595.7:599.431.6

02/12/05

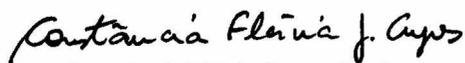
MFN1303
001654

595.7:599.431.6
P912e

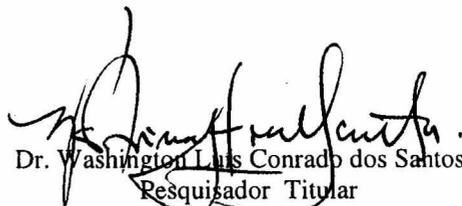
DEBORACI BRITO PRATES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Pesquisadora Adjunta
CPqAM-FIOCRUZ



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Aldina Maria Prado Barral
Pesquisadora Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Tudo na vida são desafios às resistências. A “lei da entropia” degrada a energia que tende à consumpção, para manter o equilíbrio térmico de todas as coisas. O envelhecimento e a morte são fenômenos inevitáveis no cosmo biológico e no universo. No progresso a evolução é inevitável. A felicidade é o ponto final.

(Joanna de Ângelis)

**Aos meus pais
Antonio Carlos R. Prates e
Lucidalva M^a Brito Prates
e aos meus irmãos Danuza e Lucas,
com muito amor.**

AGRADECIMENTOS

Difícil é a tarefa de agradecer, quando sabemos que palavras não são suficientes para expressar a gratidão que estamos sentindo...

À Prof^ª. **Aldina Barral** agradeço especialmente o acompanhamento e a orientação, a colaboração durante minhas experiências científicas e por ter incentivado meu êxito.

A **José Carlos Miranda**, pelo apoio que tem me dado desde a iniciação científica, acreditando sempre em minha capacidade.

A Dr. **Manoel Barral-Netto**, **Camila Indiani** e **Cláudia Brodskyn** pelas sugestões e apoio no laboratório.

Ao Dr. **Mario S. Palma**, chefe do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ - UNESP) e sua equipe, especialmente **Lucilene Delazari**, **Keity Santos** e **Daniel**, que gentilmente colaboraram para a realização dos experimentos no LBEZ, agradeço pelo conhecimento e apoio durante minha estadia em Rio Claro.

À **Clarissa R. Teixeira**, pela colaboração, apoio e dedicação durante a execução das técnicas aplicadas no presente trabalho.

À **Ana Paula Souza**, amiga e colega, por estar sempre presente, pela amizade, companheirismo e apoio. Você também faz parte deste trabalho.

À **Edvaldo Passos** e **Aline Soares**, pelo zelo e dedicação na manutenção da colônia de flebotomíneos, essencial para a realização desse trabalho.

À **Lucélia** e **Joíza**, pela ajuda na paciente tarefa de dissecação das glândulas salivares dos flebotomíneos.

Aos colegas do LIP e LIMI, por serem companheiros e por tornarem tão agradável o ambiente de trabalho, especialmente no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), local aonde venho conquistando meu amadurecimento na carreira científica.

À **Tati, Vi, Juli, Tai, Manelis...** colegas do curso de Pós-graduação do CPqGM/UFBA pelo companheirismo e cumplicidade durante mais uma jornada em nossas vidas.

Aos colegas e professores do curso de Pós-graduação do CPqGM/UFBA, por também contribuírem para meu alicerce educacional.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), pela vivência científica.

À **Ana Maria Fiscina** e profissionais da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ (BA).

Aos meus pais e familiares que sempre me ensinaram a buscar meus ideais sem nunca esquecer valores como honestidade, dignidade, responsabilidade e amor.

À **Adriana, Núria, Nanda, Kika, Lice, Deni, Lander.** A amizade, sem dúvida, sempre esteve presente nos momentos em que não podíamos estar juntos. Por compreenderem meus momentos de ausência... muito obrigada.

CAPES, CNPq e INSTITUTO DO MILÊNIO (Instituto de Investigação em Imunologia).

Aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

O desenvolvimento desta dissertação somente foi possível com o apoio de todos vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos gerais dos flebotomíneos.....	15
1.2 Aspectos gerais da leishmaniose	18
1.3 A competência vetorial dos flebotomíneos	20
1.4 A hematofagia dos artrópodes.....	22
1.5 A saliva dos flebotomíneos.....	23
1.6 Papel de substâncias da saliva dos flebotomíneos	27
1.7 O modelo do bolsão de ar e a saliva de flebotomíneos na inflamação.....	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Obtenção de flebotomíneos e criação	36
4.2 Animais de experimentação	37
4.3 Obtenção e sonicação da glândula salivar	37

4.4	<i>Dosagem de proteínas</i>	38
4.5	<i>SDS – PAGE (eletroforese em gel poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio)</i>	38
4.6	<i>Diálise do SGS e secagem das amostras</i>	39
4.7	<i>Eletroforese bidimensional</i>	39
4.8	<i>Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)</i>	40
4.9	<i>Bolsão inflamatório</i>	41
4.10	<i>Análise estatística</i>	42
5	RESULTADOS	43
5.1	<i>Conteúdo protéico da saliva de <i>Lu. longipalpis</i></i>	43
5.2	<i>Perfil eletroforético das proteínas da saliva de <i>Lu. longipalpis</i> com diferentes idades e estado nutricional</i>	46
5.3	<i>Perfil das proteínas da saliva de <i>Lu. longipalpis</i> pela eletroforese bidimensional</i>	48
5.4	<i>Efeito da saliva no recrutamento de leucócitos <i>in vivo</i></i>	51
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDC	Centro de Controle de Doenças (<i>Center of Disease Control</i>)
CDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardia (<i>Delayed-type hypersensitivity</i>)
eos	Eosinófilo
ext	Extrato do SGS
H&E	Hematoxilina & eosina
IEF	Focalização Isoelétrica (<i>Isoelectric Focusing</i>)
IPG	Gradiente de pH imobilizado (<i>Immobilized pH gradients</i>)
KDa	Quilodáltons
Linf	Linfócito
LPS	Lipopolissacarídeo
mØ	Macrófago
PBS	Tampão de salina Fosfatada (pH 7.4) (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pmn	Polimorfonuclear/ Neutrófilos

- RP-HPLC Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (*Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography*)
- SBF Soro Bovino Fetal
- SDS-PAGE Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida (*Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- SGS Sonicado de glândula salivar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida digenético da *Leishmania*..... p 19.
- Figura 2.** Aspecto esquemático de um flebotomíneo e seu aparelho digestivo. A glândula salivar está representada em azul. Detalhes da sua estrutura estão representados separadamente.....p 25.
- Figura 3.** Glândula salivar de uma fêmea adulta de *Lu. longipalpis* da colônia (Cavunge) do CPqGM..... p 43.
- Figura 4.** Conteúdo protéico da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis*....p 45.
- Figura 5.** Perfil eletroforético de proteínas da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum e alimentadas.....p47.
- Figura 6.** Gel de eletroforese bidimensional das proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis*. Os pontos escuros circulados representam o perfil protéico da saliva após a eletroforese..... p 49.
- Figura 7.** Número total de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c.....p 52.
- Figura 8.** Quantificação das células inflamatórias presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c tratados com salina (100 µl/animal),

LPS (20 µg/animal), intestino de flebotomíneo (intest) (1/animal), SGS (0,5 pares/animal) e extratos 1, 5, 7, 9, 10 e 11 da saliva - ext 1, ext 5, ext 7, ext 9, ext 10, ext 11(0,5 µg/animal cada)..... p 53.

Figura 9. Percentual relativo de neutrófilos e macrófagos recrutados pelos diferentes estímulos utilizados, comparados com o número dessas células recrutadas pelo SGS..... p 54.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Substâncias presentes na saliva de algumas espécies de flebotomíneos com suas respectivas funções..... p 29.

RESUMO

ESTUDO PROTÉICO DA SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E O EFEITO DE SEUS EXTRATOS UTILIZANDO O MODELO DO BOLSÃO INFLAMATÓRIO. **DEBORACI BRITO PRATES**. O conteúdo protéico da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) foi estudado. Este flebotomíneo é o principal vetor da Leishmaniose Visceral Americana em várias regiões do Brasil. A saliva de vetores desempenha um importante papel na obtenção do alimento sanguíneo, na lubrificação das peças bucais e na transmissão dos parasitos. O conteúdo e o perfil protéico da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum sanguíneo e alimentadas com sangue foram analisados em diferentes momentos. O conteúdo protéico da glândula salivar de fêmeas em jejum aumentou de 1,955 µg/mL no primeiro dia após emergência do inseto adulto para 7,457 µg/mL no terceiro dia, não variando muito até o sétimo dia. Um dia após a alimentação sanguínea, o conteúdo protéico diminuiu para 5,046 µg/mL, porém essa concentração aumentou nos dias subsequentes, atingindo 8,172 µg/mL no sétimo dia. O conteúdo de proteínas em machos foi menor que em fêmeas. O perfil eletroforético das proteínas da saliva de fêmeas foi analisado por SDS-PAGE. Bandas correspondentes a 45 KDa foram mais intensas. A maioria dos polipeptídeos presente na saliva das fêmeas em jejum estava também presente em fêmeas alimentadas. Contudo, em fêmeas com um dia após a emergência não foi possível observar as bandas de 6, 24, 27 e 130 KDa e em fêmeas com um dia após a alimentação sanguínea, não foi possível observar as bandas de 6, 16, 27, 32, 37, 49, 61 e 130 KDa. O perfil eletroforético bidimensional (2D) de proteínas da saliva de fêmeas com 3, 5 e 7 dias após a emergência revelou um predomínio de peptídeos entre 14 e 45 KDa. O gel 2D de proteínas da saliva de fêmeas com 3 dias revelou 82 spots, o gel de 5 dias revelou 30 spots e o gel de 7 dias, 48 spots; todos os spots foram correspondentes. Além disso, o efeito da saliva e de 6 frações suas, obtidas por HPLC, no recrutamento de leucócitos foi estudado utilizando o modelo do bolsão de ar inflamatório em camundongos BALB/c. Os neutrófilos foram as células predominantes no exsudato. Porém, o recrutamento de macrófagos foi diferencial entre os grupos. O SGS induziu maior recrutamento de macrófagos e os extratos 5, 9 e 10 tiveram uma capacidade de recrutamento de macrófagos acima de 50% com relação ao SGS. Eosinófilos também estiveram presentes no exsudato inflamatório, principalmente quando utilizado o SGS e os extratos 5 e 9 como estímulos.

PALAVRAS CHAVE: *Lutzomyia longipalpis*, saliva, SDS-PAGE, eletroforese bidimensional, bolsão inflamatório.

ABSTRACT

STUDY OF *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) SALIVA PROTEIN AND THE EFFECT OF ITS EXTRACTS USING THE INFLAMMATORY AIR POUCH MODEL. **DEBORACI BRITO PRATES.** The amount of salivary gland protein in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) was studied. This phlebotomine is the main vector of the American Visceral Leishmaniasis in many Brazilian areas. The saliva of vector plays an important role in the taking of blood meal, in the lubrication of the mouthparts and in the parasite transmission. The salivary gland protein content and profile from unfed and blood fed female of *Lu. longipalpis* were analyzed at different times. The amount of salivary gland protein from sugar-fed female increased from 1.955 $\mu\text{g/mL}$ in the first day after adult emergence to 7.457 $\mu\text{g/mL}$ in the third day, without change until the seventh day. One day after blood feeding, the protein content decreased to 5.046 $\mu\text{g/mL}$, however this concentration increased at following days to reach 8.172 $\mu\text{g/mL}$. The male protein content was lower than female protein content. The electrophoretic profile of the saliva proteins from female insects was analyzed by SDS-PAGE. Bands correspondents to 45 KDa were more intense. The most of polypeptides present in the saliva of sugar fed female also were present in the saliva of blood fed females. However, in female with one day after emergence was not possible to observe the bands 6, 24, 27 and 130 KDa and in female with one day after blood feeding was not possible to observe the bands 6, 16, 27, 32, 37, 49, 61 and 130 KDa. The bidimensional electrophoretic (2D) profile of the saliva proteins from female with 3, 5 and 7 days after emergence revealed a predominance of peptides between 14 and 45 KDa. The saliva protein 2D gel from female with 3 days revealed 82 spots, the 2D gel from 5 days revealed 30 spots and the 2D gel from 7 days revealed 48 spots; all spots were correspondent. Moreover, the effect of the saliva and six of its fractions, obtained by HPLC, in the leukocyte recruitment was studied using the inflammatory air pouch model in BALB/c mice. The neutrophils were the predominant cells in the exsudate. But, the macrophage recruitment was different between groups. The SGS induced major macrophage recruitment and the extracts 5, 9 e 10 had a capacity of macrophage recruitment above 50% regarding the SGS. Eosinophils were also present in the inflammatory exsudate, mainly when the SGS and the extracts 5 and 9 were used as stimuli.

KEY WORDS: *Lutzomyia longipalpis*, saliva, SDS-PAGE, bidimensional electrophoresis, inflammatory air pouch.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A subfamília Phlebotominae possui cinco gêneros: no Velho Mundo estão incluídos os gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* e no Novo Mundo, os gêneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* (LEWIS, 1971, 1974). Esses insetos têm distribuição mundial e cerca de 700 espécies de flebotomíneos já foram descritas (FORATTINI, 1973; FELLICIANGELI et al., 1994). Nenhuma nação no mundo tem tantas espécies de flebotomíneos como o Brasil. De 400 espécies e subespécies descritas de *Lutzomyia*, 229 encontram-se distribuídas neste país (KILLICK-KENDRICK, 2003). No Brasil, os flebotomíneos são popularmente conhecidos como “asa branca”, “cangalhinha”, “mosquito palha”, “tatuquira”, “pula-pula” ou “frebóti” (FORATTINI, 1973; WILLIAMS, 2000; MARCONDES, 2001). Em inglês são chamados de “sandflies” ou “sand flies”. Essas diversas denominações estão relacionadas aos aspectos físicos destes insetos que são pequenos (2 a 4 mm de comprimento), corcundas, com o corpo completamente piloso e asas com formato lanceolado. Possuindo um vôo saltitante e silencioso, os flebotomíneos estão bem adaptados a locais úmidos e escuros, estando associados a cavernas, galinheiros, interior de currais, cavidade entre as pedras e copa de árvores (MARCONDES, 2001).

Os flebotomíneos são holometábolos, passando por quatro fases durante seu desenvolvimento: ovo, larva (estádios I, II, III e IV), pupa e adulto. Todo o ciclo dura em torno de 30 a 60 dias, dependendo das condições climáticas, da espécie e do tipo de alimentação disponível no ambiente. As formas imaturas têm o habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais úmidos e ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. As formas adultas podem ser encontradas em tocas de animais, frestas de árvores e de rochas. Os machos são fitófagos e as fêmeas também ingerem substâncias doces de natureza vegetal como seiva, sumo de frutas maduras, etc. Os carboidratos ingeridos servem como fonte de energia para os flebotomíneos exercerem as suas atividades de vôo, acasalamento e postura, além de garantir a sobrevivência do inseto. A ingestão de açúcar pelas fêmeas tem importância para o desenvolvimento e multiplicação da *Leishmania* no tubo digestivo do inseto. Somente as fêmeas realizam a hematofagia. Em geral, o repasto sanguíneo ocorre no crepúsculo ou em período noturno. O sangue representa uma fonte importante de aminoácidos para a maturação dos seus ovos (FORATTINI, 1973; WILLIAMS, 2000; MARCONDES, 2001).

Os flebotomíneos apresentam importância médica por transmitirem ao homem diversas doenças como as leishmanioses, as bartoneloses (verruca peruana) e arboviroses (por exemplo, febre dos três dias), tendo como agentes etiológicos protozoários, bactérias e arbovírus, respectivamente. Os vetores das leishmanioses pertencem aos gêneros: *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, vetores nas Américas (WILLIAMS, 2000). Além de serem vetores de doenças, os flebotomíneos

causam incômodos às pessoas através de suas picadas dolorosas e, na maioria das vezes, causadoras de reações alérgicas.

Os flebotomíneos estão amplamente distribuídos sob as diversas condições climáticas e de altitude. A maioria vive em ambientes silvestres, em áreas florestais e rochosas. Porém algumas espécies habitam áreas urbanas, podendo também invadir domicílios e anexos, tendo uma íntima associação com o homem e seus animais domésticos (SHERLOCK et al., 1996; WILLIAMS, 2000; MARCONDES, 2001). As alterações ambientais antrópicas favorecem essa mudança de habitat dos flebotomíneos, levando a adaptação de espécies silvestres ao convívio com o homem. Isso reflete profundamente na epidemiologia da transmissão das leishmanioses.

O gênero *Lutzomyia* inclui o maior número de espécies da fauna flebotomínica americana, tendo ampla distribuição neste continente. Esse gênero, como já mencionado, encerra representantes de grande interesse em saúde pública. A leishmaniose visceral, por exemplo, tem como principal vetor nas Américas a *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) (FORATTINI, 1973). Esta espécie, dentro do grupo dos flebotomíneos, é a mais estudada (Revisado por SOARES & TURCO, 2003) e apresenta uma ampla distribuição geográfica, representando um complexo de pelo menos três espécies com diferenças genéticas (LANZARO et al., 1993 e 1999).

1.2 Aspectos gerais da leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que têm como agente etiológico os protozoários do gênero *Leishmania*. É uma doença endêmica em 88 países em 4 continentes: 22 países no Novo Mundo e 66 nações no Velho Mundo. As leishmanioses possuem diferentes manifestações clínicas: (1) Leishmaniose Visceral, forma mais grave que pode ser fatal se não for devidamente tratada; (2) Leishmaniose Tegumentar, a forma mais comum que causa lesões na pele; (3) Leishmaniose Cutâneo-mucosa, que se inicia com úlceras na pele atingindo as mucosas oral e nasal; (4) Leishmaniose Cutâneo-difusa, que produz lesões disseminadas e crônicas na pele, cujo tratamento é difícil. Os sintomas mais comuns são febre, indisposição, perda de peso, anemia e inchaço no baço, fígado, pulmão e linfonodos na forma visceral (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm> , acesso em 29/12/2004).

O gênero *Leishmania* engloba parasitos digenéticos que são encontrados na forma promastigota (flagelada) no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (flebotomíneos vetores) e na forma amastigota (parasita intracelular sem flagelo) nos hospedeiros vertebrados. Esses parasitos pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, (MICHALICK et al., 2000). Quando a fêmea do flebótomo pica um hospedeiro vertebrado infectado pela *Leishmania* para exercer a hematofagia, ela ingere

macrófagos parasitados por amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo os macrófagos se rompem e as formas amastigotas livres sofrem divisões, multiplicam-se e se transformam em promastigotas ainda no sangue ingerido, envolto pela matriz peritrófica. Após a digestão, a matriz se rompe e as promastigotas colonizam o piloro ou íleo (no caso do subgênero *Viannia*) ou multiplicam-se e se aderem à parede do estômago (subgênero *Leishmania*) (GENARO et al., 2000). Prosseguindo a metaciclogênese, em ambos os casos, as promastigotas migram para as regiões anteriores do intestino e, no segundo repasto sanguíneo, quando o flebotomo infectado ingere o sangue, ele ejeta as formas promastigotas metacíclicas pelo mesmo canal (SCHLEIN, 1993).

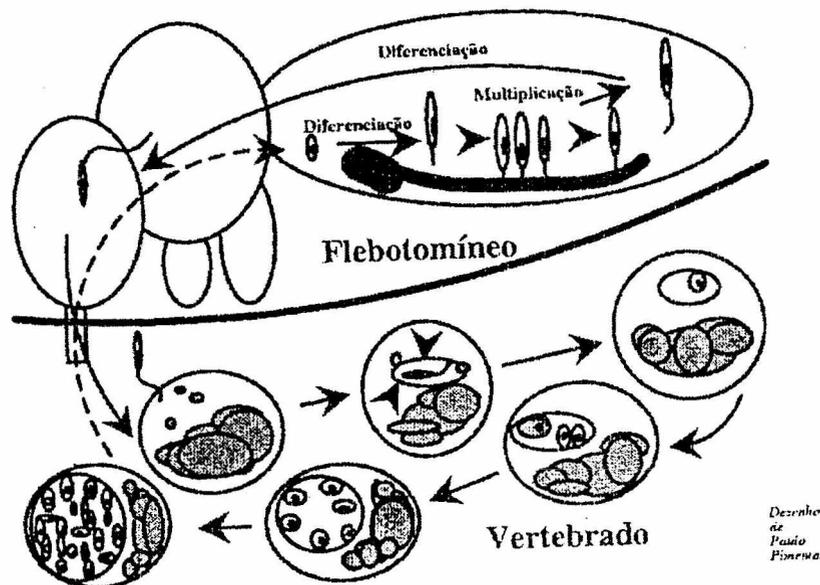


Figura 1. Ciclo de vida digenético da *Leishmania*. Fonte: PIMENTA, 2003 - Flebotomíneos do Brasil, Editora Fiocruz.

Segundo a Organização Mundial de Saúde a prevalência da leishmaniose é de 12 milhões de pessoas e a população de risco é de 350 milhões. A incidência anual é estimada em 1 a 1.5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmanioses visceral. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Existem duas principais entidades epidemiológicas na transmissão das leishmanioses: a zoonótica, onde hospedeiros animais são reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, e a antropoonótica, onde o homem é o único reservatório e fonte de infecção para o vetor. O grande número de casos está estreitamente relacionado com fatores que afetam as interações naturais *Leishmania* – vetor – reservatório. O desenvolvimento econômico e mudanças ambientais e comportamentais (intrusão em florestas primárias, desmatamentos, urbanização não planejada, mudanças climáticas, etc) podem levar ao maior contato do vetor com o homem (SHERLOCK et al., 1996; RISPAIL et al., 2002; TRAVI et al., 2002; World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm> , acesso em 29/12/2004).

1.3 A competência vetorial dos flebotomíneos

A habilidade de um flebotomíneo transmitir a *Leishmania* depende de diversos fatores que caracterizam a sua capacidade vetorial. A competência vetorial de um flebotomíneo é determinada pela sua aptidão em se infectar com uma espécie de *Leishmania*, transformando-se em vetor da mesma. Contudo, o desenvolvimento

desses protozoários no trato digestivo de uma determinada espécie de flebotomíneo depende de alguns aspectos que irão caracterizar a sua susceptibilidade ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania*: (1) os parasitos devem ser capazes de resistir à ação de enzimas digestivas presentes no intestino médio do inseto; (2) devem ser capazes de escapar da membrana peritrófica que envolve o bolo alimentar no intestino médio do inseto; (3) devem aderir ao epitélio intestinal evitando a expulsão no momento da excreção dos resíduos alimentares; (4) completar seu ciclo de vida, diferenciando-se em formas infectantes – metacíclicas – dentro do vetor e (5) serem inoculados no hospedeiro vertebrado (SACKS & PERKINS, 1985; PIMENTA et al., 1992, 1994, 1997).

Nem todas as espécies de flebotomíneos são comprovadamente vetoras das leishmanioses. A especificidade de espécies de *Leishmania* para determinadas espécies de flebotomíneos tem sido bem documentada na literatura. Acredita-se que existiu uma co-evolução entre *Leishmania* spp. com seus flebotomíneos vetores, de modo que essa específica associação é responsável pela competência vetorial do flebotomíneo (revisado por SACKS, 2001). *Lutzomyia longipalpis* é o vetor comprovado da *Leishmania chagasi* na natureza (LAINSON et al., 1977) além de ser uma espécie altamente permissiva a outras espécies de *Leishmania* em estudos experimentais.

1.4 *A hematofagia dos artrópodes*

“A hematofagia de vários artrópodes lhes permitiu a exploração de um novo e importante nicho ecológico e apresenta uma série de características, cujo conhecimento é importante para a compreensão da epidemiologia das doenças por eles transmitidas” (MARCONDES, 2001). Três grupos de artrópodes hematófagos podem ser distinguidos com base em seu hábito hematofágico: (a) os que apenas as larvas se alimentam de sangue (mais raros, ex.: algumas espécies de larvas de moscas da família Calliphoridae); (b) os que se alimentam de sangue durante todo o seu ciclo de desenvolvimento (ex.: triatomíneos) e (c) os que apenas os adultos se alimentam de sangue (ex.: mosquitos, simulídeos, flebotomíneos). Neste último grupo existem subgrupos em que (a) ambos os sexos são obrigatoriamente hematófagos; (b) ambos os sexos são hematófagos opcionais; e (c) apenas as fêmeas se alimentam de sangue (como os flebotomíneos e culicídeos) (MARCONDES, 2001; WELLS, 2002).

Após a extinção dos dinossauros os mamíferos tornaram-se a principal fonte de alimentação sanguínea para os artrópodes hematófagos; porém os mecanismos coagulantes dos mamíferos são mais eficientes que o dos répteis e das aves. Os artrópodes que possuíam componentes farmacológicos na saliva para lidar com este problema de alimentação foram selecionados (RIBEIRO, 1995). Neste cenário evolutivo, outras importantes adaptações foram desenvolvidas pelos artrópodes

hematófagos possibilitando o sucesso do seu repasto sanguíneo. Dentre elas podem ser citadas o contato íntimo com os hospedeiros vertebrados e a modificação das peças bucais que se tornaram adequadas ou para a telmofagia (quando o sangue é sugado através de “um lago sanguíneo” formado sob a pele do hospedeiro) ou para a solenofagia (quando a sucção é feita diretamente de um capilar). Além disso, têm-se mecanismos de digestão e excreção do sangue e o uso de componentes do sangue digerido para o metabolismo oxidativo e para a síntese de proteínas do ovo (MARCONDES, 2001; BLACK IV & KONDRATIEFF, 2002).

Os flebotomíneos são insetos telmófagos e no momento da picada realizam movimentos que podem ser comparados a uma sondagem, a fim de selecionar um local mais adequado no tecido do hospedeiro. Suas peças bucais dilaceram os pequenos vasos presentes no local da picada, criando uma pequena hemorragia na qual o sangue será sugado. Esse tipo de alimentação provavelmente representa a estratégia mais primitiva, sendo a solenofagia uma estratégia mais derivada na obtenção de sangue (BLACK IV & KONDRATIEFF, 2002).

1.5 *A saliva dos flebotomíneos*

Dentre os padrões gerais na evolução da hematofagia dos artrópodes, a saliva merece destaque na medida em que ela inibe os eventos hemostáticos e inflamatórios do hospedeiro para uma melhor e mais efetiva aquisição de sangue.

Seria ideal para um animal hematófago, se o sangue do hospedeiro não coagulasse, que o seu fluxo fosse intenso e que o hospedeiro não reagisse a sua picada devido à dor causada pela mesma. Contudo, os hospedeiros vertebrados possuem três sistemas eficientes que dificultam a hematofagia: a hemostasia, a inflamação e a imunidade (complexos sistemas fisiológicos interagem um com um outro em diferentes vias). Adaptações bioquímicas na saliva dos artrópodes ocorreram de modo a inibir esses eventos. Para a inibição dos eventos hemostáticos (coagulação e vasoconstrição) por exemplo, a saliva de artrópodes hematófagos possui moléculas anticoagulantes e vasodilatadoras que permitem o sucesso da alimentação sanguínea. Já foi descrito que a maioria dos artrópodes hematófagos possui em sua saliva pelo menos um anticoagulante e um vasodilatador. Contudo, a diversidade molecular da natureza de tais compostos é grande (revisado em RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

A maioria dos insetos possui um par de glândulas salivares associadas com o lábio. Cada lóbulo desse par de glândulas contém um ducto anterior e um ducto comum unindo-os e que se abrem na cavidade pré-oral entre o lábio e a hipofaringe (peças bucais dos insetos) (ROSS, 1965). Os flebotomíneos possuem um par de glândulas salivares situados na região ventral protorácica (figura 2).

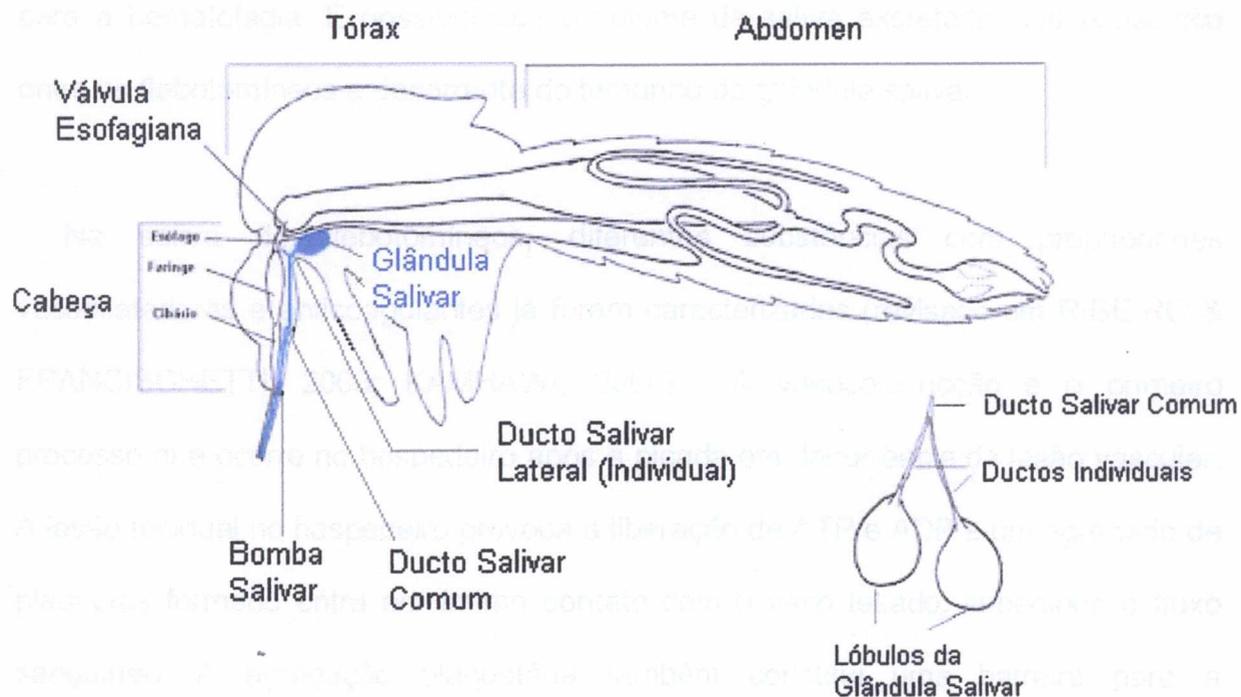


Figura 2. Aspecto esquemático de um flebotômio e seu aparelho digestivo. A glândula salivar está representada em azul. Detalhes da sua estrutura estão representados separadamente. Fonte: adaptado de Forattini, Entomologia Médica, 1973, Universidade de São Paulo.

Após a emergência do inseto adulto, as glândulas salivares passam por um rápido período de síntese de proteínas antes da primeira alimentação sanguínea do inseto. Constituídas de dois dutos individuais curtos e um duto salivar comum longo, que vai até o aparato bucal, essas glândulas constituem um reservatório de forma e tamanho variável entre as espécies de flebotômios (LEWIS, 1965; FORATTINI, 1973). Durante a alimentação, os flebotômios injetam o conteúdo da glândula (a saliva) no hospedeiro, tornando o local da picada um ambiente favorável e adequado

para a hematofagia. É possível que o volume da saliva excretado seja específico entre os flebotomíneos e decorrente do tamanho da glândula salivar.

Na saliva de flebotomíneos, diferentes substâncias com propriedades vasodilatadoras e anticoagulantes já foram caracterizadas (revisado em RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003; KAMHAWI, 2000). A vasoconstrição é o primeiro processo que ocorre no hospedeiro após a picada em decorrência da lesão vascular. A lesão tecidual no hospedeiro provoca a liberação de ATP e ADP e um agregado de plaquetas formado entra em íntimo contato com o vaso lesado, impedindo o fluxo sanguíneo. A agregação plaquetária também constitui uma barreira para a alimentação dos flebotomíneos. Um dos peptídeos da glândula salivar de *Lu. longipalpis* mais estudados é o maxadilan, um potente vasodilatador que possui propriedades imunossupressoras (LERNER et al, 1991; BOZZA et al, 1998). Diferenças na composição da saliva de *Lu. longipalpis* de diferentes populações têm sido descritas por WARBURG et al. (1994). Neste trabalho os autores encontraram diferenças entre a seqüência de nucleotídeos no gene do maxadilan e na quantidade deste peptídeo na saliva de *Lu. longipalpis* provenientes do Brasil, Costa Rica e Colômbia. A saliva dessas populações também diferiu na influência sobre o desenvolvimento de infecções pela *Leishmania donovani chagasi* em modelo experimental murino, sugerindo diferentes capacidades de modular a patologia da doença que esses vetores transmitem. LANZARO et al. (1999) também descreveram diferenças no gene do maxadilan e sugeriram que o polimorfismo observado poderia modificar a antigenicidade da molécula, mas não sua função.

1.6 Papel de substâncias da saliva dos flebotomíneos

A exposição contínua dos hospedeiros às picadas de insetos hematófagos pode afetar as funções biológicas dos vetores. MILLERON e colaboradores (2004) mostraram que fêmeas de *Lu. longipalpis* que se alimentaram em camundongos sensibilizados por picadas de insetos dessa mesma espécie tiveram sua alimentação prejudicada. Eles observaram uma diminuição na quantidade de sangue ingerida e também uma diminuição na produção de ovos. Além de atuar no fluxo sanguíneo no local da picada do flebotomíneo, a glândula salivar também contém moléculas que possuem efeitos imunomodulatórios. Já foi descrito que células imunes efetoras, como macrófagos e células T, são moduladas pela saliva de flebotomíneos e que atividades como modulação de citocinas, são desempenhadas pela saliva dos mesmos (GILLESPIE et al., 2000). ROGERS e TITUS (2003) mostraram que produtos da saliva de flebotomíneos exerciam efeitos imunomodulatórios em células humanas *in vitro*. Estes produtos foram capazes de diminuir a secreção de citocinas como IFN- γ e IL-12 em culturas de células mononucleares do sangue periférico e de aumentar a secreção de IL-6 em culturas de monócitos. Além disso, a produção de anticorpos contra saliva dos artrópodes tem sido indicada como responsável pelo desenvolvimento da imunidade do hospedeiro (WIKEL, 1982).

Diversos trabalhos têm demonstrado o importante papel da saliva no curso da infecção do hospedeiro por *Leishmania* spp. O primeiro trabalho que evidenciou a

influência da saliva de flebotomíneos na infecção leishmaniótica foi o artigo de TITUS e RIBEIRO (1988). Eles demonstraram que o lisado da glândula salivar de *Lu. longipalpis* determinava o aumento da infectividade da *Leishmania major* em camundongos. Depois desse trabalho, outros também demonstraram que a saliva de flebotomíneos, quando inoculada com diferentes espécies de *Leishmania* em modelos experimentais, promovia uma exarcebação da infecção quando comparado à aplicação de um inóculo de parasitas apenas (SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; WARBURG et al., 1994; LIMA & TITUS, 1996; BELKAID et al., 1998; BEZERRA & TEIXEIRA, 2001). Antígenos da saliva inoculados pelo flebotomíneo podem sensibilizar o hospedeiro e levar a uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) formada no local da picada e iniciada por uma resposta celular a esses antígenos (BELKAID et al., 2000). KAMHAWI e colaboradores (2000) demonstraram que uma pré-exposição de camundongos à picada de *Phlebotomus papatasi* não infectados confere uma proteção contra *L. major*, sendo esse fato correlacionado a uma forte reação do tipo DTH. Diferenças na composição da saliva de *Lu. longipalpis* de diferentes populações também têm sido descritas e associadas a diferentes perfis moduladores da patologia das doenças transmitidas por essa espécie (LANZARO et al., 1999; WARBURG et al., 1994). A exarcebação da transmissão da *Leishmania* pelos produtos da saliva do flebotomíneo foi apontada como um dos fatores que também determinam a competência vetorial do flebotomíneo, juntamente com a sua habilidade de gerar estágios infectivos da *Leishmania* no seu trato digestivo (TITUS & RIBEIRO, 1988).

No quadro 1 estão enumeradas as substâncias da saliva de flebotomíneos atualmente descritas (LERNER et al., 1991; THEODOS et al., 1991; SOARES et al., 1998; CHARLAB et al., 1999 e 2000; HASKO et al., 2000; KATZ et al., 2000; RIBEIRO et al., 2000a-c; RIBEIRO & MODI, 2001; VALENZUELA et al., 2001a; VALENZUELA et al., 2002; ČERNÁ et al., 2002; revisão em RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

Quadro 1. Substâncias presentes na saliva de algumas espécies de flebotomíneos e suas respectivas funções.

Substâncias (KDa)	Propriedades	Ocorrência
Apirase (35,07)	enzima que hidrolisa ADP e ATP a AMP e ortofosfato, tendo ação anti -agregação plaquetária e anti-inflamatória	<i>Lu.longipalpis</i> <i>Phlebotomus papatasi</i> (Scopoli)
5' nucleotidase (60,62)	pertencente a família das apirases, essa enzima degrada AMP a adenosina, uma proteína com atividade vasodilatadora, anti-agregante plaquetária e imunossupressora	<i>Lu. longipalpis</i>
Adenosina Desaminase (52)	enzima que hidrolisa a adenosina em inosina, que possui efeitos antiinflamatórios	<i>Lu. longipalpis</i>
Adenosina AMP	envolvida na vasodilatação e anti-agregação plaquetária, essa substância inibe a síntese de Óxido Nítrico e a função de linfócitos	<i>Phlebotomus argentipes</i> <i>Ph. papatasi</i>

Maxadilan (6,5)	potente peptídeo vasodilatador e imunossupressor	<i>Lu. longipalpis</i>
Hialuronidase (42,28)	enzima que auxilia na difusão de agentes farmacológicos da própria saliva na pele	várias espécies dos gêneros <i>Phlebotomus</i> e <i>Lutzomyia</i>
Alfa-amilase (54,02)	enzima responsável pela digestão de carboidratos	<i>Lu. longipalpis</i>
Família D-7 (15,5 a 36,3)	família de proteínas que, apesar de serem expressas em grande quantidade na saliva de flebotomíneos, ainda permanecem com função desconhecida	
Família Antígeno-5 (28,88)	grupo de proteínas que também permanecem com função desconhecida	<i>Lu. longipalpis</i>
<i>Yellow</i> (45,15)	proteína que parece ter função na oxidação de norepinefrina	<i>Lu. longipalpis</i>

1.7 O modelo do bolsão de ar e a saliva de flebotomíneos na inflamação

A inflamação é uma resposta a um dano tecidual provocado por um agente agressor. Ela é caracterizada por uma série de alterações que tende a limitar os efeitos da agressão. Na inflamação ocorre o acúmulo de líquido no tecido extravascular e recrutamento de células circulantes, tais como neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas, também para este local (COTRAN et al, 1996). Eventos da inflamação podem ser estudados através do modelo do bolsão de

ar em animais de experimentação, o qual induz uma resposta inflamatória com extravasamento de líquido e de leucócitos. A injeção de ar mais um agente irritante no dorso de ratos produziu uma resposta inflamatória que possibilitou o estudo de drogas antiinflamatórias por SEDGWICK e colaboradores (1983). MATTE e OLIVIER (2002) utilizaram o modelo do bolsão de ar em camundongos BALB/c para investigar a resposta inflamatória induzida por diferentes espécies de *Leishmania*. Esses autores, através das distintas respostas inflamatórias iniciais induzidas, fizeram uma correlação com o desenvolvimento da patogênese de cada espécie de *Leishmania* estudada.

SILVA e colaboradores (2005) demonstraram que a saliva de *Lu. longipalpis* induz um infiltrado inflamatório intenso e difuso, caracterizado por neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, na orelha de camundongos BALB/c pré-expostos a repetidas picadas deste inseto. Essa resposta foi observada após o desafio desses animais com o sonicado da glândula salivar. Uma imunidade contra infecção pela *L. major* conferida pela pré-exposição de camundongos à picadas de *Ph. papatasi* foi descrita por KAMHAWI e colaboradores (2000). Essa resposta protetora foi associada a uma forte resposta celular caracterizada por um infiltrado celular composto por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos no sítio de inoculação do parasito. VALENZUELA e colaboradores (2001b) observaram uma reação inflamatória caracterizada pela presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em camundongos imunizados com a proteína de 15 KDa (SP15) da saliva de *Ph. papatasi*.

2 OBJETIVOS

Hipótese:

Existe diferença na quantidade e qualidade de proteínas na saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* em relação à sua maturidade e seu estado nutricional e diferença no recrutamento celular induzido pela mesma e seus extratos.

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o conteúdo protéico total da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e avaliar o efeito de seus extratos no recrutamento celular.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o conteúdo protéico total presente na saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum com 1, 3, 5 e 7 dias após a emergência e com 1, 3, 5 e 7 dias após uma alimentação sanguínea.
- ✓ Determinar o conteúdo protéico total presente na saliva de machos de *Lu. longipalpis* com 7 dias após a emergência.
- ✓ Analisar o perfil de proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* com 1, 3, 5 e 7 dias após a emergência e com 1, 3, 5 e 7 dias após uma alimentação sanguínea, através da eletroforese em gel de poliacrilamida.
- ✓ Analisar o perfil de proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* com 3, 5 e 7 dias após a emergência, através da eletroforese bidimensional.

- ✓ Avaliar o efeito do SGS de fêmeas de *Lu. longipalpis* e de seus extratos no recrutamento celular utilizando o modelo do bolsão inflamatório em camundongos BALB/c.

3 JUSTIFICATIVA

As glândulas salivares de artrópodes hematófagos exibem duas características que as tornam importantes objetos de estudo. Primeiramente, elas possuem propriedades que facilitam o processo da alimentação e em segundo lugar, a saliva constitui a principal via de transmissão de vários organismos patogênicos que os vetores artrópodes hospedam (JAMES & ROSSIGNOL, 1991). Além disso, a saliva desses artrópodes contém um variado repertório de moléculas que modulam a resposta inflamatória, hemostática e imune do hospedeiro.

Os estudos realizados utilizando o sonicação da glândula salivar de diferentes espécies de flebotomíneos têm demonstrado que a saliva potencializa a infecção por *Leishmania* spp., além de conferir uma proteção em animais que tenham sido expostos à mesma. Com relação a este aspecto, a saliva de flebotomíneos passa a adquirir relevância no estudo da patogênese da doença transmitida por esses vetores, na medida em que ela constitui um elo entre o vetor, o parasito e o hospedeiro dentro da cadeia epidemiológica da leishmaniose. Ainda não há uma vacina eficaz disponível contra essa doença e o tratamento continua sendo problemático devido à toxicidade das drogas (GASSER et al., 1994). A infecção pode ser prevenida pela utilização de repelentes ou inseticidas que evitem as picadas dos flebotomíneos. Controle destes vetores e reservatórios são estratégias muito caras, que requer uma boa infra-estrutura e manutenção, e que dão resultados de curta

duração (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm> , acesso em 29/12/2004). Como as leishmanioses constituem um complexo de doenças, é impossível controlar através de uma única ferramenta, sendo que uma vacina pode ser uma exceção com relação ao custo-efetividade, principalmente com relação a vacinas baseadas em produtos da saliva do vetor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de flebotomíneos e criação

Os insetos foram coletados no distrito de Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia, utilizando-se armadilhas luminosas do tipo CDC. Após a captura, os exemplares de *Lu. longipalpis* foram levados ao insetário do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – FIOCRUZ/BA. Para a criação desses insetos, as fêmeas foram alimentadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) provenientes do biotério do CPqGM – FIOCRUZ/BA. Esse procedimento de alimentação já é rotineiramente utilizado pelo insetário para criação de flebotomíneos. Neste, hamsters previamente anestesiados com uma associação de Xilasina 10mg/Kg + Ketamina 200mg/Kg (misturadas na mesma seringa), por via intra peritoneal, foram colocados em gaiolas contendo cerca de 150-200 flebotomos durante 40-60 minutos. Apenas um hamster é colocado em cada gaiola. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram colocadas em potes para oviposição e mantidas com solução açucarada (sacarose/ água destilada) (v/v) em uma estufa incubadora (B.O.D) a 24° C. Após a eclosão das larvas, as mesmas foram mantidas com ração até completar o seu ciclo de vida, chegando à fase de inseto adulto. As condições de temperatura e umidade relativa do insetário são 24° C - 26° C e 80 %, respectivamente. Os insetos adultos obtidos a partir da colonização foram utilizados para a extração da glândula salivar.

4.2 Animais de experimentação

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c utilizados neste trabalho foram provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ, Bahia). Os hamsters foram utilizados para a alimentação dos flebotomíneos e os camundongos de 8-12 semanas de idade foram utilizados no experimento do bolsão inflamatório. Todos os procedimentos experimentais com os animais assim como o sacrifício dos mesmos foram realizados segundo as normas do Comitê de Ética em Utilização de Animais do CPqGM/FIOCRUZ (parecer número 063/04).

4.3 Obtenção e sonicação da glândula salivar

Glândulas salivares das fêmeas de *Lu. longipalpis* foram extraídas sob uma lupa, com auxílio de pinça e estiletes entomológicos. Dois grupos de fêmeas foram utilizados. Grupo 1: fêmeas em jejum sanguíneo (com 1, 3, 5 e 7 dias após a emergência) mantidas apenas com solução açucarada; grupo 2: fêmeas alimentadas em hamsters sadios (com 1, 3, 5 e 7 dias após a alimentação sanguínea). As glândulas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo solução salina e armazenadas a -70° C até o momento do uso. Antes de sua utilização, as glândulas salivares foram sonicadas a uma frequência de 40 Hz com três seqüências de 20 pulsos (Branson Sonifier 450, Danbury, USA). As glândulas eram mantidas resfriadas durante o processo. Após a sonicação, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°

C por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Os sobrenadantes foram coletados para os experimentos, constituindo o sonicado de glândula salivar (SGS).

4.4 Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico das glândulas salivares das fêmeas de flebotomíneos em jejum sanguíneo e alimentadas com sangue foi determinado utilizando o MICRO BCA™ Protein Assay KIT 23235 (PIERCE), de acordo com as instruções do fabricante. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão. Para cada determinação, foram utilizados um “pool” de 3 pares de glândulas salivares, extraídos de 3 fêmeas. No total, foram realizadas 3 dosagens independentes em cada grupo experimental por experimento.

4.5 SDS – PAGE (eletroforese em gel poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio)

A eletroforese em gel poliacrilamida foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™ - Novex® Pre-Cost Gel). Foi utilizado o gel 16% (Tris-Glycine Gels) e o padrão See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard LC5925 (Invitrogen™). Cinco pares de glândulas salivares de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum sanguíneo com 1, 3, 5, e 7 dias após a emergência e de glândulas de fêmeas no 1º, 3º, 5º e 7º dia após uma alimentação sanguínea foram primeiramente sonicadas e centrifugadas como descrito anteriormente. Aos SGS foi adicionado o tampão Tris-Glycine SDS Sample Buffer LC 2676 (Invitrogen™) para dissolução das proteínas.

Em seguida, essas amostras (correspondentes a cinco pares de glândulas salivares de cada grupo) foram aplicadas no gel. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com comassie blue. Comparação entre a intensidade das bandas foi realizada com o auxílio do *software* Stratagene Eagle Sight.

4.6 *Diálise do SGS e secagem das amostras*

Para a eletroforese bidimensional e para a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), os SGS foram primeiramente dialisados contra água bidestilada. Após a diálise foi feita a dosagem de proteínas (KIT BIO-RAD PROTEIN ASSAY) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando BSA como padrão. Em seguida, as amostras foram secadas sob vácuo usando um “speed vac” (Heto Drywinner 3) e armazenadas a -20°C até o uso.

4.7 *Eletroforese bidimensional*

A eletroforese bidimensional foi realizada segundo o protocolo da Amershan Biosciences (*2-D Electrophoreses using immobilized pH gradients – Principles and Methods*). A primeira dimensão (focalização isoeétrica) foi realizada no *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System* utilizando-se fitas IPG 7 cm (*Immobilized pH Gradients*) Dry Strip com gradientes de pH na faixa de 3 a 10. Antes da focalização, as fitas foram rehidratadas, com solução de rehidratação misturadas com as amostras, durante 15 horas no *Immobiline Dry Strip Reswelling Tray*. As amostras foram o SGS de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum de 3, 5 e 7 dias, numa média de

450 pares de glândulas salivares em cada grupo experimental. Após a reidratação foi realizada a focalização isoeétrica. Em seguida foi realizado o equilíbrio das fitas IPG com o tampão de equilíbrio SDS (*SDS Equilibration Buffer*). Para a segunda dimensão, *SDS-PAGE* (eletroforese em gel poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio) foi utilizado o sistema *Ettan DALT six*. As fitas *IPG* já equilibradas foram colocadas em contato com o gel acrilamida 12,5% e foi aplicado um volume de 4µL/gel do padrão (PROTEIN MIXTURE LOT 209195 AMERSHAN BIOSCIENCES). A 2ª dimensão ocorreu a 10°C. Os géis foram revelados com prata (BIO-RAD SILVER STAIN PROTOCOL), digitalizados e analisados no *software* Image Master 2D.

4.8 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Diferentes frações da saliva de *Lu. longipalpis* foram obtidas a partir do SGS de 250 pares de glândulas salivares de fêmeas com 5 dias após a emergência (em jejum sangüíneo) através da cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC – *Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography*) (C18) HPLC SHIMADZU (Modelo LC-AD 10). A coluna de fase reversa foi NUCLEOSIL - C18 (4,6 x 250 nm), monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm/ 220nm/ 254nm/ 280nm e o fluxo foi de 2 mL/min. As amostras foram eluídas em gradientes de 95% do solvente acetonitrila 5% diluída em ácido trifluoracético. A outra solução solvente foi o ácido trifluoracético 0,05% diluído em água bidestilada. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a – 70° C até o uso.

4.9 *Bolsão inflamatório*

O bolsão de ar foi realizado em camundongos BALB/c de 8 –12 semanas. Foram utilizados 3 camundongos por grupo experimental em cada experimento. O bolsão foi realizado através da injeção de 3 ml de ar na região subcutânea do dorso dos camundongos. Em seguida, 100 μ L de SGS (0.5 pares/animal) + 900 μ L de ar, ou cada um dos seis extratos obtidos pela HPLC (0,5 μ g/animal) + 900 μ L de ar foram imediatamente injetados no bolsão. O SGS utilizado neste experimento foi proveniente de flebotomíneos com 5 dias de vida (em jejum sangüíneo). Os camundongos controles foram injetados com 100 μ L de salina estéril (controle negativo) ou com 100 μ L de lipopolissacarídeo (LPS) 20 μ g/ml (controle positivo). Além disso, foi realizado um grupo experimental utilizando-se o macerado de 1 intestino de um flebotomíneo em presença de salina estéril. Após 12 horas os camundongos foram letalmente anestesiados e as células do exsudato inflamatório foram coletadas através da lavagem do bolsão com uma injeção de 5 mL de salina estéril. Em seguida, as células do exsudato foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C e os sedimentos foram ressuspensos com 500 μ L de Tampão de salina Fosfatada pH 7,4 1x (PBS) + BSA 1% e contados em um hemocítmetro (Neubauer), com auxílio de solução Turk. Cento e cinquenta microlitros da solução contendo as células foram imobilizadas por citocentrifugação (500 rpm por 5 minutos), coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Foi realizada a leitura das lâminas para a contagem diferencial das células inflamatórias presentes no bolsão.

4.10 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad-Prism 3.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Ca – USA). Foi aplicado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para estabelecer o nível de significância entre os grupos experimentais e o pós-teste de Dunn para comparação múltipla entre estes grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Conteúdo protéico da saliva de *Lu. longipalpis*

A glândula salivar das fêmeas de *Lu. longipalpis* está localizada na parte anterior do tórax e é constituída de dois lóbulos morfologicamente iguais. Cada lóbulo possui um ducto individual curto que se unem formando um ducto comum (figura 3). Apesar de apresentarem o mesmo formato lobular, foi observada uma variação no tamanho dos lóbulos entre os indivíduos no momento da dissecação da glândula salivar. Às vezes, em um mesmo indivíduo, foi possível observar diferenças entre o tamanho de cada um dos lóbulos.

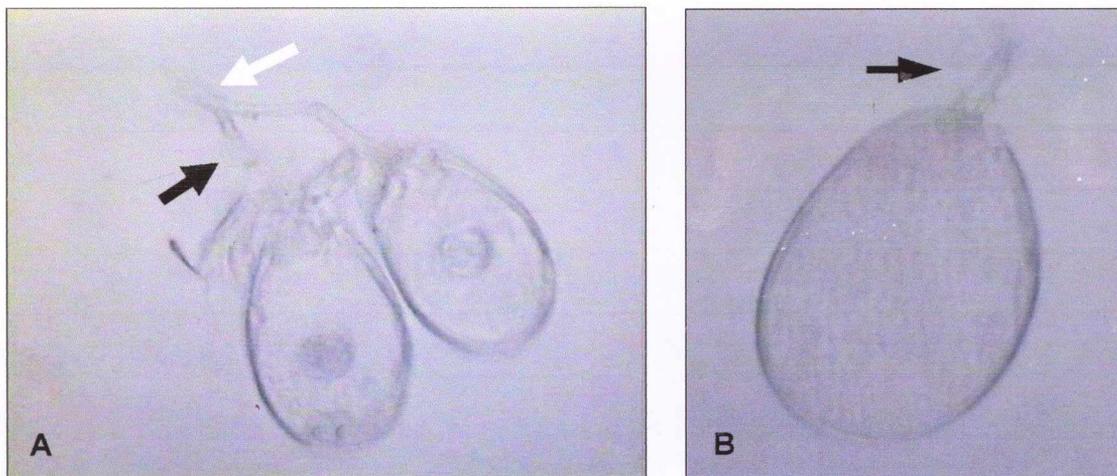


Figura 3. Glândula salivar de uma fêmea adulta de *Lu. longipalpis* da colônia (Cavunge) do CPqGM. Um dia após o nascimento, fêmeas foram dissecadas na lupa e suas glândulas extraídas e fotografadas em microscópio óptico. **A**, glândula salivar completa com 2 lóbulos (200X). **B**, um lóbulo da glândula (40X). *Seta preta*, ducto individual; *Seta branca*, ducto comum.

O conteúdo protéico da saliva de fêmeas e machos de *Lu. longipalpis* foi avaliado através da dosagem de proteínas totais (MICRO BCA™ PIERCE) presentes no SGS usando BSA como padrão. A concentração de proteínas presentes em 3 pares da glândula salivar de fêmeas em jejum com 1, 3, 5 e 7 dias de vida está representada na figura 4A. O conteúdo protéico médio da glândula salivar das fêmeas com 1 dia de vida foi de $1,955 \pm 0,906 \mu\text{g/mL}$ (média \pm erro padrão, $n=6$). A partir do terceiro dia esse conteúdo aumentou ($7,457 \pm 1,667 \mu\text{g/mL}$), com 5 dias foi de $5,322 \pm 1,243 \mu\text{g/mL}$ e de $7,466 \pm 0,878 \mu\text{g/mL}$ em fêmeas com 7 dias de vida. Essa diferença observada no conteúdo protéico em glândulas de fêmeas com 1 dia de vida só diferiu estatisticamente do conteúdo da glândula de fêmeas com 7 dias ($p=0,0308$ – Kruskal-Wallis).

A concentração de proteínas da glândula salivar de fêmeas alimentadas com sangue está representada na figura 4B. Um dia após a alimentação sanguínea o conteúdo protéico da glândula salivar foi de $5,046 \pm 2,727 \mu\text{g/mL}$, porém nos dias subseqüentes essa concentração aumentou de forma não progressiva (3 dias: $8,619 \pm 2,615 \mu\text{g/mL}$; 5 dias: $6,796 \pm 1,568 \mu\text{g/mL}$; 7 dias: $8,172 \pm 3,145 \mu\text{g/mL}$). Esse aumento na concentração de proteínas do primeiro ao sétimo dia após a alimentação sanguínea não foi estatisticamente significante.

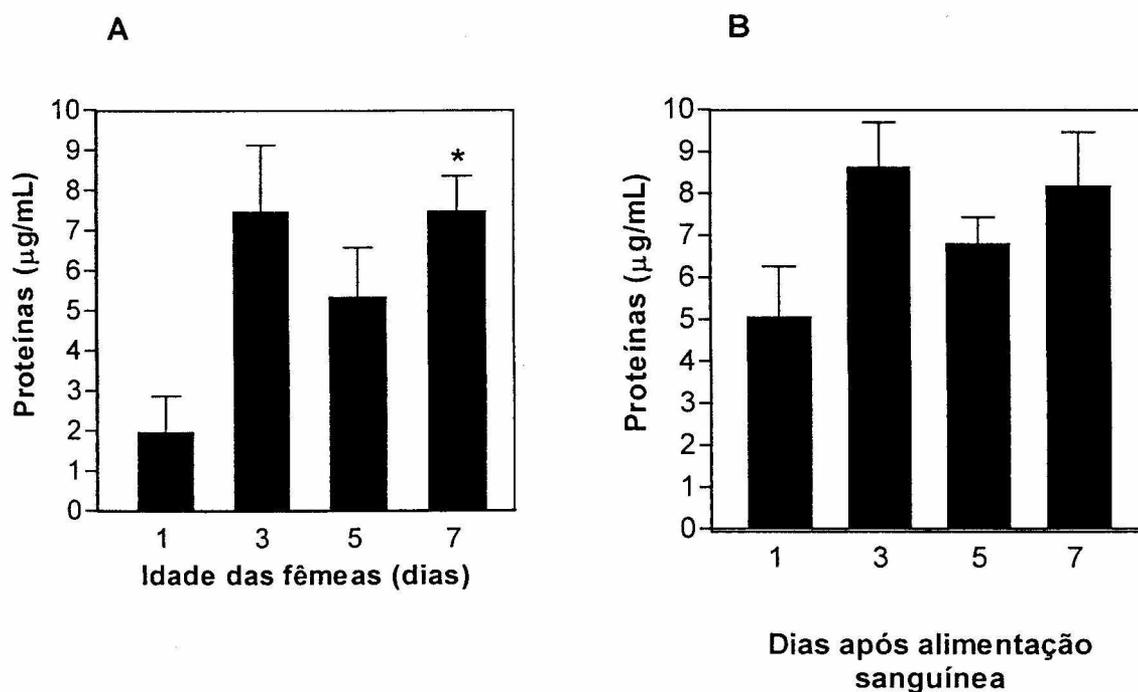


Figura 4. Conteúdo protéico da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis*. **A**, fêmeas em jejum. Após o nascimento as fêmeas foram mantidas em dieta açucarada e isentas de alimentação sanguínea. As glândulas salivares foram extraídas em diferentes dias de vida (1, 3, 5 e 7). **B**, fêmeas alimentadas com sangue. Após o nascimento as fêmeas foram mantidas em dieta açucarada até a alimentação sanguínea. As glândulas salivares foram extraídas em diferentes dias após a alimentação (1, 3, 5 e 7). As concentrações de proteínas foram obtidas de um "pool" de 3 pares de glândulas salivares. Os valores representam a média \pm erro padrão ($n=6$) desse "pool". As dosagens foram realizadas em triplicata em cada grupo experimental. Asterisco indica diferença significativa ($*p=0,0308$) calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes.

A concentração de proteínas da glândula salivar de machos de *Lu. longipalpis* com 7 dias de vida também foi determinada. As glândulas salivares de machos e fêmeas são morfológicamente similares, porém as do macho são bem menores. A quantidade de proteínas quantificadas em um *pool* de 3 pares de glândulas salivares dos machos ($11,42 \pm 5,27 \mu\text{g/mL}$) também é menor que o das fêmeas ($18,05 \pm 5,15 \mu\text{g/mL}$), porém essa diferença observada não foi estatisticamente significativa.

5.2 Perfil eletroforético das proteínas da saliva de *Lu. longipalpis* com diferentes idades e estado nutricional

A análise por SDS – PAGE dos polipeptídeos presentes nas glândulas salivares das fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum (com 1, 3, 5 e 7 dias de vida) e alimentadas (com 1, 3, 5 e 7 dias após a alimentação sanguínea) está representada na figura 5. Foi possível observar 12 bandas com os pesos moleculares: 6, 10, 16, 17, 24, 27, 32, 37, 45, 49, 61 e 130 KDa. A maioria dos polipeptídeos encontrados nas glândulas de fêmeas em jejum também estava presente em fêmeas alimentadas. As bandas correspondentes a 45 KDa (seta escura) foram mais intensas que as outras bandas. Em fêmeas com um dia de vida as bandas estavam menos intensas e não foi possível observar as de 6, 24, 27 e 130 KDa. Um perfil similar foi observado no primeiro dia após a alimentação sanguínea do flebotomíneo, uma vez que as bandas correspondentes a 6, 16, 27, 32, 37, 49, 61 e 130 KDa não estavam presentes.

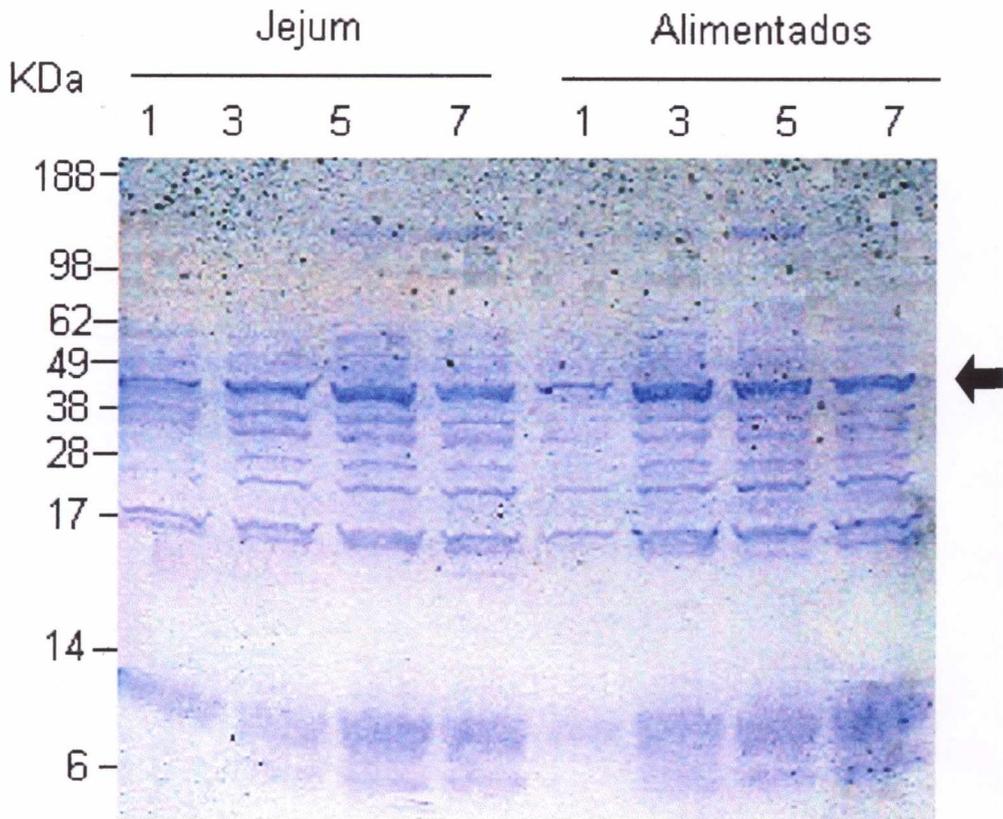


Figura 5. Perfil eletroforético de proteínas da glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum e alimentadas. Polipeptídeos de 5 pares de glândulas salivares de fêmeas dissecadas em diferentes dias de vida (jejum) e em diferentes dias após o repasto sanguíneo foram separados por SDS – PAGE em um gel de poliacrilamida 16%. O gel foi corado com comassie blue. Pesos moleculares (KDa) estão representados à esquerda a partir da amostra padrão (See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard - Invitrogen™).

5.3 Perfil das proteínas da saliva de *Lu. longipalpis* pela eletroforese bidimensional

O perfil de proteínas da glândula salivar de *Lu. longipalpis* com 3, 5, 7 dias de vida, obtido pela eletroforese bidimensional, está representado na figura 6. A maioria dos *spots* identificados nos géis correspondem a peptídeos de baixo peso molecular, havendo um predomínio de peptídeos entre 14 e 45 KDa. No gel bidimensional obtido a partir das glândulas salivares de fêmeas de *Lu. longipalpis* com 3 dias de vida foram observados 82 *spots* (figura 6A), enquanto que nos géis da saliva de flebotomíneos com 5 dias de vida (figura 6B) e de 7 dias de vida (figura 6C) foram observados 30 e 48 *spots*, respectivamente.

Pode-se também observar uma região de peptídeos (não individualizados como *spots*) que permanecem no gel como uma mancha. Quando comparamos os géis de 3 dias com 5 dias, observamos uma correspondência entre 16 *spots*; comparando 3 dias com 7 dias, a correspondência é de 48 *spots*; comparando 5 dias com 7 dias, 30 *spots* são correspondentes. Portanto, todos os peptídeos presentes na glândula salivar de fêmeas de *Lu. longipalpis* com 5 e 7 dias de vida estão presentes na glândula de fêmeas com 3 dias.

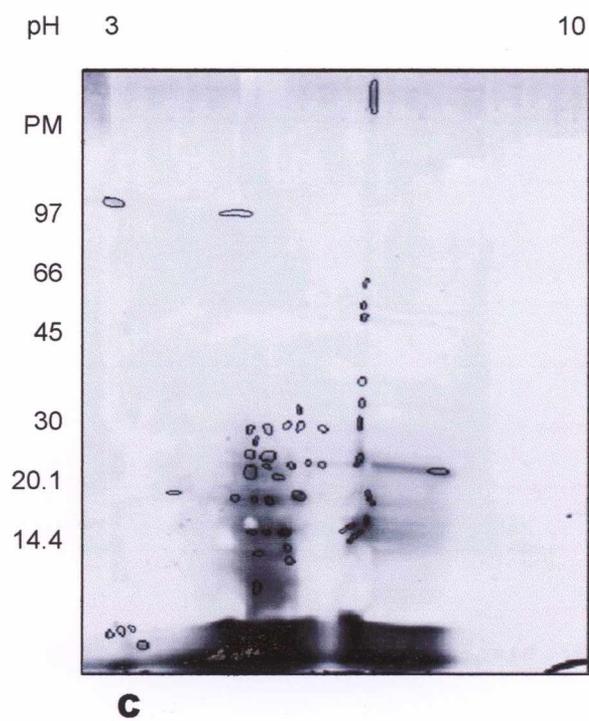
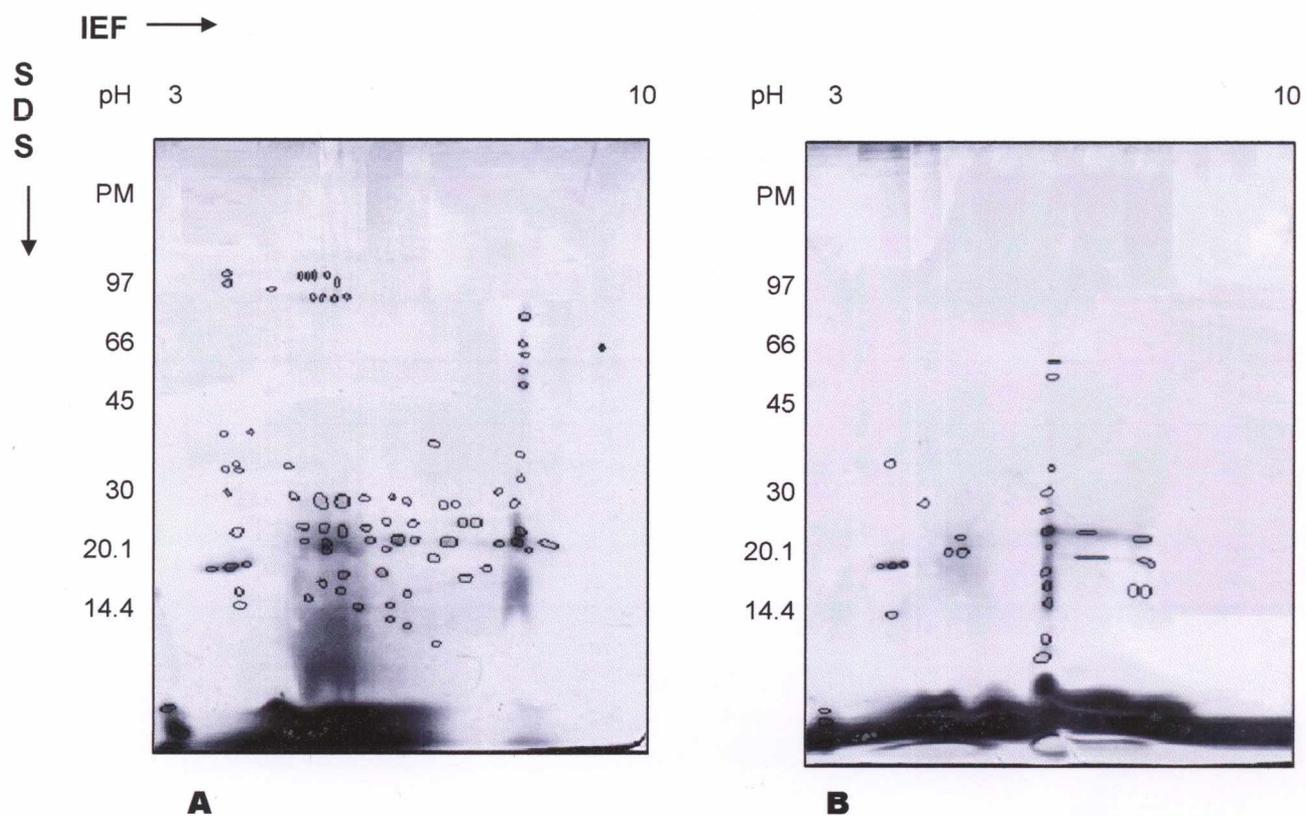


Figura 6. Gel de eletroforese bidimensional das proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis*. Os pontos escuros circulados representam o perfil protéico da saliva após a eletroforese. **A**, gel das proteínas da saliva de flebotomíneos com 3 dias de vida, com 82 peptídeos separados; **B**, gel das proteínas da saliva de flebotomíneos com 5 dias de vida, com 30 peptídeos separados; **C**, gel das proteínas da saliva de flebotomíneos com 7 dias de vida, com 48 peptídeos separados. As proteínas foram primeiramente separadas pelo seu ponto isoelétrico (IEF) usando uma faixa de pH de 3 a 10 (primeira dimensão) e, em seguida, pelo seu peso molecular SDS – PAGE (segunda dimensão). Após a revelação dos géis pela prata, estes foram analisados no *software* Image Master 2D. Os pesos moleculares do padrão (KDa) estão indicados à esquerda dos géis.

5.4 *Efeito da saliva no recrutamento de leucócitos in vivo*

O número total de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c está representado na figura 7. Um maior infiltrado celular foi observado quando foram utilizados o LPS e o SGS como estímulo, e um menor infiltrado inflamatório foi observado quando foi utilizado o extrato 11. Essas diferenças observadas entre o SGS e o extrato 11 e entre o LPS e o extrato 11 foram significantes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os neutrófilos foram as células predominantemente presentes no exsudato inflamatório do bolsão em todos os grupos (figura 8). Linfócitos também estiveram presentes entre as células do exsudato do bolsão inflamatório, porém em quantidades menores em todos os grupos experimentais. Os eosinófilos mostraram-se levemente aumentados no exsudato dos animais estimulados com SGS, extrato 5 e extrato 9. Porém, quando comparado com LPS apenas o SGS e o extrato 9 diferiram significativamente ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). O recrutamento de macrófagos foi diferenciado entre os grupos experimentais, sendo maior quando utilizado o SGS e os extratos 1, 5, 9 e 10 da saliva como estímulos (figura 8). O SGS e o extrato 9 diferiu significativamente do LPS na capacidade de recrutar macrófagos ($p < 0,01$). Apenas os extratos 5, 9 e 10 tiveram uma capacidade de recrutar macrófagos acima de 50% com relação ao SGS (63,78%; 84,9%; 50,06%, respectivamente) (figura 9). O percentual relativo de recrutamento de macrófagos pelos outros estímulos foi de 24,14% (salina), 10,79% (LPS), 32,72% (intestino), 43,98% (ext 1), 20,42% (ext 7) e 22,85% (ext 11).

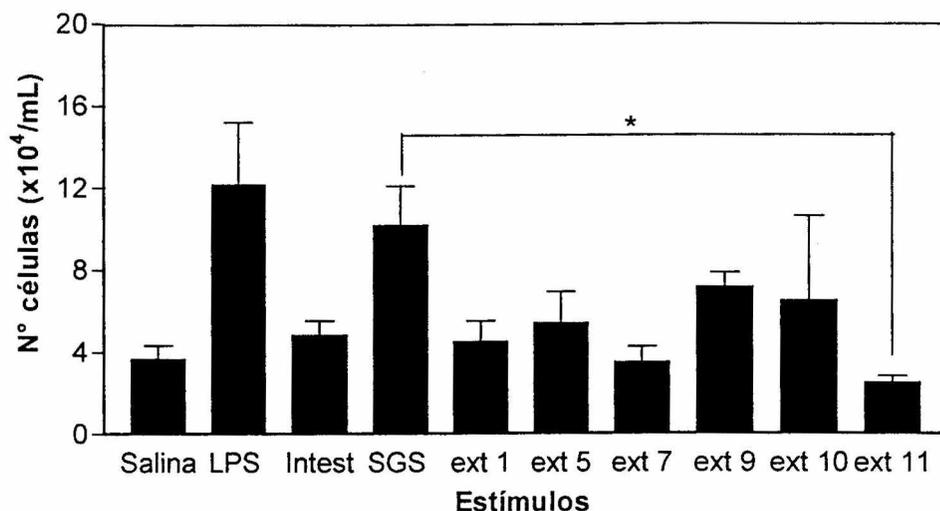


Figura 7. Número total de células presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c. O bolsão foi realizado com a injeção de 3 mL de ar estéril juntamente com os estímulos [salina (100 μ l/animal), LPS (20 μ g/animal), intestino de flebotomíneo (intest) (1/animal), SGS (0,5 pares/animal) e extratos 1, 5, 7, 9, 10 e 11 da saliva - ext 1, ext 5, ext 7, ext 9, ext 10, ext 11(0,5 μ g/animal cada)] na região subcutânea do dorso dos camundongos. Doze horas após o inóculo dos estímulos no bolsão, as células do exsudato foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas e contadas em hemocítômetro (Neubauer), com solução Turk. Foram utilizados 3 camundongos BALB/c por grupo experimental em cada experimento. Os valores representam a média \pm erro padrão, n=6, de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Asterisco indica diferença significativa (*p<0,05) calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

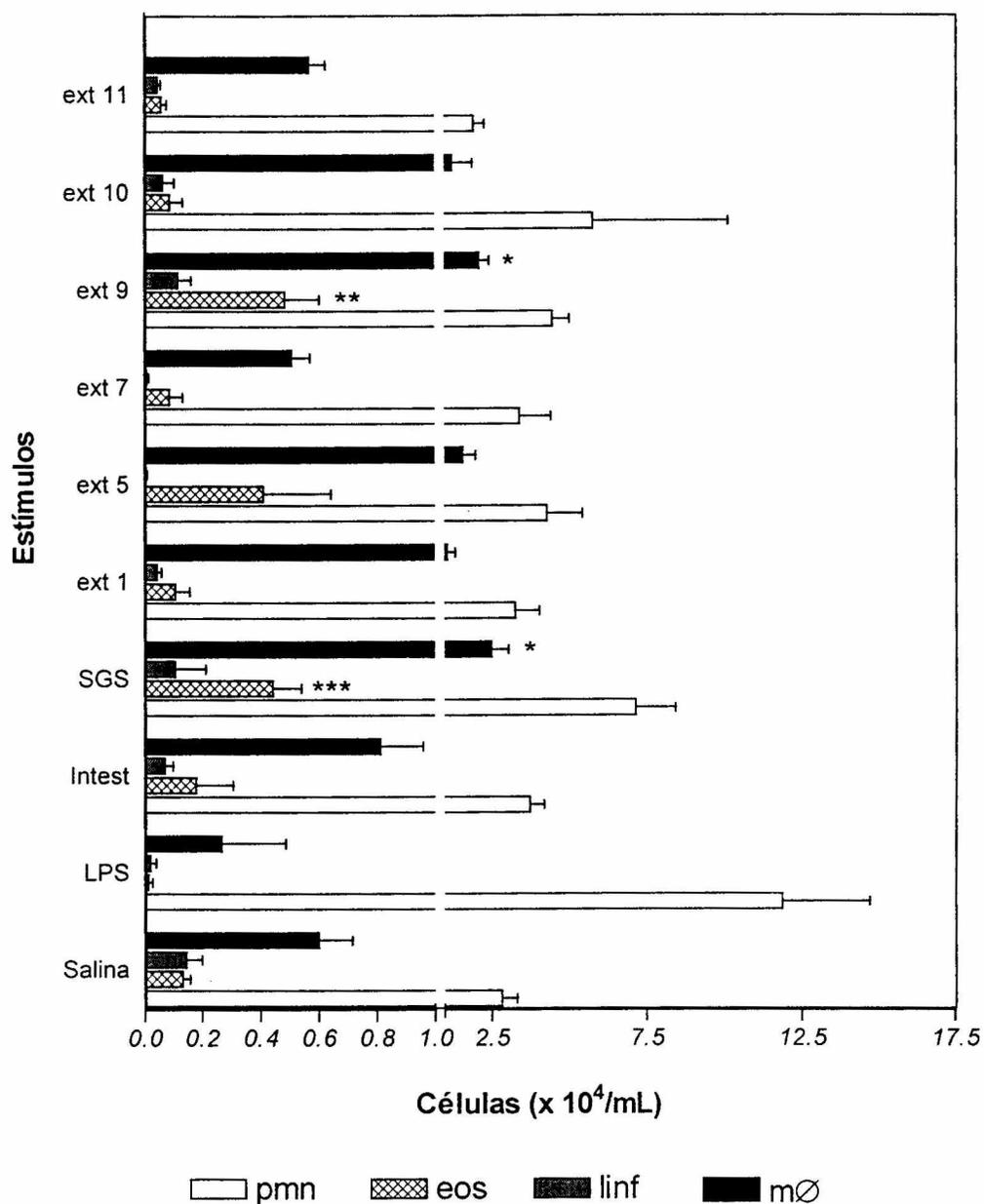


Figura 8. Quantificação das células inflamatórias presentes no exsudato do bolsão inflamatório de camundongos BALB/c tratados com salina (100 μ l/animal), LPS (20 μ g/animal), intestino de flebotomíneo (intest) (1/animal), SGS (0,5 pares/animal) e extratos 1, 5, 7, 9, 10 e 11 da saliva - ext 1, ext 5, ext 7, ext 9, ext 10, ext 11 (0,5 μ g/animal cada). Doze horas após o inóculo dos estímulos no bolsão, as células do exsudato foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas e contadas em lâminas coradas pela H&E para contagem diferencial. Foram utilizados 3 camundongos BALB/c por grupo em cada experimento. Os valores representam a média \pm erro padrão, n=6, de um experimento representativo de dois experimentos independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, *p<0,01, **p<0,05, ***p<0,001. pmn, polimorfonuclear/neutrófilo; eos, eosinófilo; linf, linfócito; mØ, macrófago.

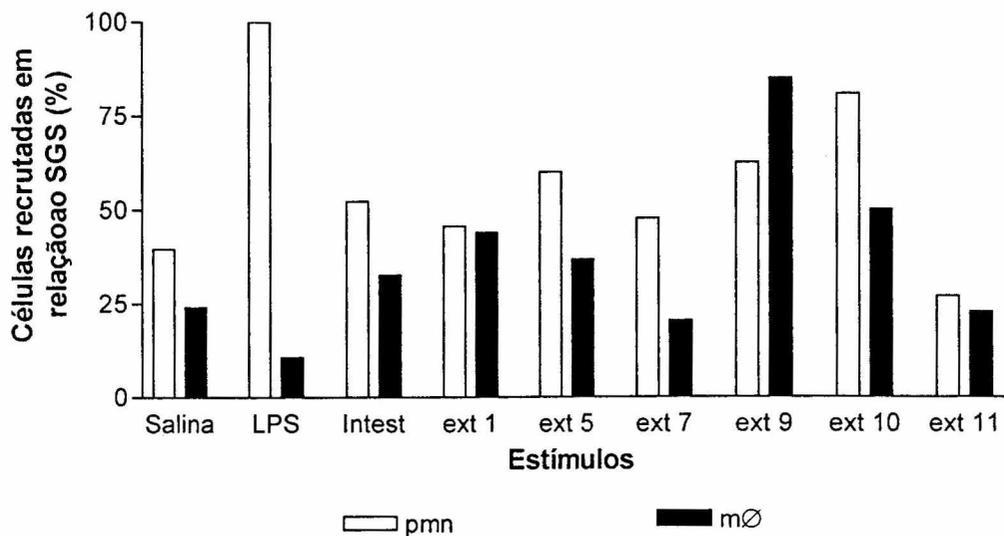


Figura 9. Percentual relativo de neutrófilos e macrófagos recrutados pelos diferentes estímulos utilizados, comparados com o número dessas células recrutadas pelo SGS. Esse percentual foi obtido a partir do número total de neutrófilos e macrófagos presentes no bolsão inflamatório de camundongos BALB/c tratados com salina, LPS, intestino (intest), SGS e extratos 1, 5, 7, 9, 10 e 11 da saliva (ext 1, ext 5, ext 7, ext 9, ext 10, ext 11). pmn, polimorfonuclear/neutrófilo; mØ, macrófago.

6 DISCUSSÃO

As glândulas salivares de insetos hematófagos são responsáveis pela síntese e secreção de substâncias que auxiliam o processo de obtenção do alimento sanguíneo. A saliva também tem papel importante na localização do vaso sanguíneo, na lubrificação do aparelho bucal do inseto, na dissolução de alimentos e na síntese ou formação de enzimas para digestão de açúcares (ROSS, 1965; MARINOTTI et al., 1990; MOREIRA-FERRO et al., 1999; RIBEIRO, 2000; Revisado por RODRIGUEZ e HERNANDEZ-HERNANDEZ, 2004). Além disso, a saliva de insetos hematófagos tem sido bastante estudada devido a seu papel na transmissão de agentes etiológicos de doenças e por interagir e modular o sistema imune do hospedeiro (LIMA & TITUS, 1996). O perfil de componentes da saliva e sua quantidade apresentam uma grande variabilidade entre os diferentes grupos de artrópodes, principalmente pelo fato da hematofagia ter evoluído independentemente em pelo menos seis diferentes grupos de artrópodes (RIBEIRO, 1995; RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003). Variações no conteúdo salivar também podem ocorrer entre indivíduos de uma mesma espécie (WARBURG et al., 1994), dependendo do sexo e de condições fisiológicas como a idade e a temperatura em que os espécimes são mantidos (VOLF et al., 2000).

Neste trabalho nós quantificamos o conteúdo de proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* em diferentes dias de vida (em jejum sanguíneo) e em

diferentes dias após o repasto sangüíneo. Observamos uma diferença no conteúdo protéico total da saliva de fêmeas adultas, mantidas em dieta açucarada, no decorrer dos dias de vida. Esse conteúdo foi menor na saliva de insetos no primeiro dia, tendo um aumento de 3,8 vezes no 3º dia de vida. Entre o 3º e o 7º dia de vida a variação desse conteúdo foi menor. Essa variação do conteúdo protéico total pode estar relacionada ao período de síntese de proteínas que ocorre na glândula salivar antes do amadurecimento deste flebotômíneo, período no qual ele realizará seu primeiro repasto sanguíneo. NASCIMENTO e colaboradores (2000), ao analisarem a quantidade de proteínas nas glândulas salivares de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, observaram um aumento de aproximadamente 5 vezes na quantidade de proteínas do primeiro ao sétimo dia de vida do inseto adulto. Em *Culex pipiens* foi observado um aumento de 1,3 vezes do conteúdo protéico da glândula salivar nos primeiros três dias de desenvolvimento do inseto. Em *Aedes caspius*, porém, esse conteúdo não variou durante os primeiros 4 dias de vida, sendo observado um acréscimo de proteínas de 2 vezes apenas no quinto dia (SOLIMAN et al., 1999).

No primeiro dia após o repasto sanguíneo, o conteúdo protéico da saliva diminuiu 1,4 vezes quando comparados com o conteúdo de fêmeas com 7 dias de vida em jejum, quando então foi realizada a alimentação sanguínea das fêmeas. Porém, houve um aumento na quantidade de proteínas a partir do 3º dia após a alimentação. SOLIMAN e colaboradores (1999) observaram uma depleção do conteúdo protéico total das glândulas salivares de *Cx. pipiens* após a alimentação

sangüínea. Contudo, esse conteúdo atingiu os valores observados antes do repasto sangüíneo nos 6 dias subseqüentes ao mesmo. Esses autores também observaram um aumento no conteúdo protéico da saliva de *Ae. caspius* nos três dias após a alimentação sangüínea das fêmeas. GOLENDÁ e colaboradores (1995) quantificaram a redução do conteúdo de proteínas totais da glândula salivar de quatro diferentes espécies de anofelinos vetores da malária. Eles concluíram que existe diferença na quantidade de proteínas depletadas entre as diferentes espécies de mosquitos estudadas. A diminuição inicial do conteúdo protéico após o repasto pode ser explicada pela liberação de proteínas da saliva durante a alimentação, uma vez que o sucesso da hematofagia está relacionado a grande variedade de substâncias farmacológicas da saliva que é liberada durante a alimentação (RIBEIRO, 1989). O decréscimo da atividade de determinadas proteínas da saliva de flebotomíneos alimentados já foi demonstrado em diferentes trabalhos: hialuronidase em *Lu. longipalpis* (CHARLAB et al., 1999), proteína fosfatase em *Ph. papatasi* e *Lu. longipalpis* (KATZ et al., 2000), adenosina desaminase em *Lu. longipalpis* (CHARLAB et al., 2000), fosfodiesterase em *Lu. longipalpis* (RIBEIRO et al., 2000b) e AMP e adenosina em *Ph. argentipes* (RIBEIRO & MODI, 2001). A diminuição da atividade destas proteínas foi avaliada quando seus respectivos substratos foram incubados com a saliva de insetos alimentados com sangue.

A concentração de proteínas na glândula salivar de machos foi menor que a das fêmeas. Essa diferença se correlaciona com o menor tamanho da glândula salivar dos machos. Diferenças morfológicas e de conteúdo protéico da glândula

salivar entre machos e fêmeas de insetos hematófagos da mesma espécie já foram descritas em *Phlebotomus duboscqi* (Neveu-Lemaire) por VOLF e colaboradores (2000) e em *Anopheles darlingi* (Root) por MOREIRA e colaboradores (2001). Essas diferenças têm sido correlacionadas com os hábitos alimentares dos machos e das fêmeas.

O perfil eletroforético (SDS – PAGE) das proteínas da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* revelou 12 bandas, algumas delas apresentam peso molecular aproximado e correspondente ao de peptídeos já seqüenciados e descritos na saliva dessa espécie de flebotomíneo por VALENZUELA e colaboradores (2004). Dentre elas podemos citar o peptídeo vasodilatador maxadilan de aproximadamente 6 KDa, um anticoagulante (16 KDa), proteína D7 (24 KDa), proteína relacionada ao antígeno 5 (27 KDa), Hidrolase (32 KDa), proteína relacionada a *Yellow* (45 KDa), inibidor de serina protease (49 KDa) e 5' - nucleotidase (61 KDa). Em insetos hematófagos existe uma variação no tempo de síntese de proteínas da saliva após a emergência do inseto adulto. Em *Anopheles gambiae* o amadurecimento das glândulas salivares só ocorre a partir do 3º dia de vida, quando todas as proteínas salivares estão presentes na glândula (BRENNAN et al., 2000). Em outras espécies de mosquitos como *An. darlingi* todos os polipeptídeos encontrados na glândula salivar do inseto adulto já estão presentes desde o primeiro dia após a emergência (MOREIRA et al., 2001). VOLF e colaboradores (2000) descreveram o amadurecimento da glândula salivar de *Ph. papatasi* no 5º dia após a emergência do inseto adulto. No nosso trabalho, o perfil eletroforético da saliva de fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum não

variou muito. As proteínas começaram a ser acumuladas na glândula salivar a partir do 1º dia após a emergência, contudo algumas bandas presentes a partir do 3º dia não foram visualizadas no 1º após a emergência do inseto adulto, como a de 6 KDa, as que estão entre 17 e 45 KDa e a de 130 KDa. A diferença na intensidade das bandas observadas do 1º ao 7º dia após a emergência pode ser atribuída ao acúmulo de proteínas na glândula salivar no decorrer do amadurecimento. MOREIRA e colaboradores (2001) analisaram, por SDS – PAGE, o padrão de proteínas da glândula salivar de fêmeas de *An. darlingi* durante os primeiros dez dias de vida do inseto adulto. O aumento quantitativo das bandas observado por esses autores foi correlacionado com o aumento do conteúdo protéico da glândula salivar dos mosquitos mais velhos.

O perfil eletroforético da glândula salivar de fêmeas alimentadas com sangue também foi analisado por SDS – PAGE. Quando comparado com a glândula de fêmeas em jejum, observamos um padrão similar. No 1º dia após o repasto sanguíneo, algumas bandas (6 KDa, as que estão entre 17 e 45 KDa e a de 130 KDa) não foram visualizadas. A partir do 3º dia após o repasto sanguíneo as glândulas salivares apresentaram o mesmo padrão de bandas presentes na saliva de insetos em jejum, indicando que, provavelmente, a alimentação sanguínea não induz a síntese de proteínas específicas na saliva de *Lu. longipalpis* como descrito em algumas espécies de mosquito. BRENNAN e colaboradores (2000) observaram a expressão de uma proteína de 100 KDa na glândula salivar de *An. gambiae* em resposta a alimentação sanguínea. Quando comparamos a intensidade da banda

correspondente a 45 KDA entre os grupos de fêmeas em jejum e fêmeas alimentadas, observamos que para os grupos de 1, 3 e 5 dias, a intensidade das bandas foi maior no grupo que permaneceu em jejum (1,26; 2 e 5 vezes, respectivamente). No grupo de 7 dias, a intensidade da banda foi 1,76 vezes maior no grupo de fêmeas alimentadas.

Nós também analisamos o perfil de proteínas salivares das fêmeas de *Lu. longipalpis* em jejum pela eletroforese bidimensional. Esse método possibilita a separação e a identificação de proteínas de uma dada amostra através do deslocamento em duas dimensões divergentes 90° uma da outra, fornecendo-nos dados do ponto isoelétrico e do peso molecular das proteínas separadas. A eletroforese bidimensional constitui uma forte ferramenta para pesquisas na área do proteoma (SCHEVCHENKO et al., 1996; revisado em GÖRG et al., 2000), pois permite a caracterização do perfil de proteínas de um sistema biológico em diferentes momentos ou condições experimentais. Neste estudo, consideramos apenas diferenças envolvendo a presença ou ausência de *spots* individualmente. Surpreendentemente, o número de *spots* de proteínas presentes no SGS das fêmeas de *Lu. longipalpis* com 3 dias foi maior em relação aos insetos com 5 e 7 dias. Apesar da glândula salivar ter apresentado uma menor quantidade de proteínas com 3 dias, em termos qualitativos houve uma variedade das mesmas. Com 5 e 7 dias observamos uma menor variedade de proteínas. É provável que durante o ciclo de vida dessa espécie de flebotomíneo, a síntese de determinadas substâncias na

saliva seja modulada em função do seu comportamento alimentar ou até de condições fisiológicas do inseto. Nos sistemas vivos, a síntese de compostos requer uma demanda energética do organismo de modo que as células sintetizam compostos preferenciais, em detrimento à síntese de outras substâncias dispensáveis à mesma, em condições específicas (BAKER & ALLEN, 1975). As proteínas que permaneceram presentes na saliva da *Lu. longipalpis* com 5 e 7 dias correspondem a algumas das que já estavam presentes com 3 dias, havendo um predomínio de proteínas na região entre 14 e 45 KDa. VOLF e colaboradores (2000) estudaram a composição protéica da saliva de *Ph. papatasi* e observaram uma variação de acordo com a idade do inseto. Em seus trabalhos, porém, essa composição protéica aumentou de acordo com a idade dos flebotomíneos e a temperatura em que os adultos foram mantidos também foi um fator que interferiu no perfil completo de proteínas presentes.

Pode-se também observar uma região de peptídeos de baixo peso molecular (não visualizados como *spots* e sim como uma mancha escura). Esse fato pode ser explicado pela predominância de peptídeos de baixo peso molecular na saliva desse inseto. VALENZUELA e colaboradores (2004) identificaram 143 famílias de proteínas relacionadas na glândula salivar de *Lu. longipalpis* através de seqüenciamento de cDNA. Nove famílias representaram novos peptídeos ainda não descritos na saliva desse inseto e que apresentaram, em sua grande maioria, baixo peso molecular que variaram de 2,5 – 10 KDa. Já foi descrito por RIBEIRO e FRANCISCHETTI (2003) que muitas seqüências de possíveis peptídeos de peso molecular entre 1 e 15 KDa

são encontradas no genoma da maioria dos artrópodes hematófagos estudados. Contudo, o papel biológico destas ainda não é evidente e a identificação de sua função permanece como um desafio.

Quando analisamos os pesos moleculares das proteínas separadas pela eletroforese bidimensional, observamos que essas proteínas podem ser agrupadas em determinadas faixas de peso molecular, nas quais uma ou mais estão inclusas. A grande quantidade de *spots* observada em nossos géis bidimensionais pode não estar correspondendo cada um uma proteína em particular, mas grupos de proteínas com pesos moleculares aproximados. Como revisado por RIBEIRO e FRANCISCHETTI (2003), nos artrópodes hematófagos a saliva contém pelo menos uma molécula anticoagulante, uma inibidora de agregação plaquetária e uma molécula vasodilatadora, mas em alguns casos mais de uma destas está presente na glândula salivar de uma determinada espécie. VALENZUELA e colaboradores (2004) relataram que uma das famílias de proteínas mais abundantes na saliva de *Lu. longipalpis* era a de possíveis anticoagulantes.

Mudanças qualitativas no perfil de proteínas da saliva de flebotomíneos foram sugeridas como um importante fator para os estudos de atividades imunomodulatórias da saliva (VOLF et al., 2000). Quando inoculadas no hospedeiro, a partir da picada do vetor, promastigotas infectivos de *Leishmania* spp. invadem macrófagos e se replicam intracelularmente, uma vez que as funções microbidas

dessas células estão suprimidas (revisado em de ALMEIDA et al., 2003). No mecanismo natural de transmissão das leishmanioses, os parasitos são inoculados no hospedeiro juntamente com a saliva do vetor. Além da sua importante função na aquisição do alimento, tem-se mostrado o papel exarcebador da saliva no curso da infecção em diversos modelos experimentais (SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; WARBURG et al., 1994; TITUS & RIBEIRO, 1988). Diversos mecanismos estão supostamente envolvidos, contribuindo para essas observações.

Utilizamos o modelo do bolsão de ar em camundongos BALB/c para observar o papel do SGS e de algumas de suas frações obtidas pelo HPLC (extratos) no evento inflamatório. Os neutrófilos e os macrófagos foram as células predominantemente recrutadas. O recrutamento de eosinófilos também foi observado, principalmente quando utilizado o SGS e os extratos 5 e 9. Estas células participam ativamente em várias infecções parasitárias, estando também presentes em reações alérgicas e nas reações induzidas por picadas de insetos hematófagos (CAPRON, 1992; GLEICH et al., 1993). Um aumento de eosinófilos no sangue de cobaias expostas a picadas de *Lu. longipalpis* foi observado por BROWN e ROSALSKY (1984). Foi sugerido que a presença dessas células no local da picada poderia modificar o progresso da infecção. PARANHOS e colaboradores (1993) também observaram uma eosinofilia em cães inoculados com saliva de *Lu. longipalpis* por via intra-dérmica. Eosinófilos também foram observados no processo inflamatório no sítio de imunização de camundongos com a proteína recombinante de 15 KDa de *Ph. papatasi* por VALENZUELA e colaboradores (2001b). Além disso,

eosinófilos também podem participar no processo de vasodilatação (BELKAID et al., 2000), contribuindo para o êxito da hematofagia.

Ao utilizarmos o intestino do flebotomíneo como um dos controles observamos o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e até mesmo de alguns eosinófilos, apesar de não significativo. Já foi descrita a ocorrência de bactérias Gram negativas e também de bactérias Gram positivas, em menor escala, na microbiota do trato digestivo de fêmeas dessa espécie (OLIVEIRA et al., 2000). A presença de algumas espécies de helmintos também já foi relatada (revisado em SOARES & TURCO, 2003). A possível presença de tais microorganismos pode estar contribuindo para o infiltrado inflamatório observado no bolsão neste grupo experimental.

O número de macrófagos presentes no bolsão estimulado com LPS foi bem menor que o presente no bolsão estimulado com o SGS e seus extratos. ANJILI e colaboradores (1995) observaram que a saliva de *Ph. duboscqi* (vetor natural da *L. major* no Kenya) atrai monócitos peritoneais de camundongos em estudos *in vitro*, utilizando lâminas de agarose. ZER e colaboradores (2001) também observaram a quimiotaxia de macrófagos peritoneais murinos usando a saliva de *Ph. papatasi* e *Lu. longipalpis* em câmaras de quimiotaxia. Além disso, eles também descreveram um aumento na carga parasitária das células infectadas com promastigotas de *Leishmania*. A quimiotaxia de macrófagos nos eventos iniciais de infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado possivelmente tem um importante papel

trazendo macrófagos que irão "abrigar" o parasito no sítio de infecção. Dessa forma eles estariam inicialmente protegidos da resposta imune do hospedeiro. Em um segundo momento, a replicação do parasito dentro dos macrófagos e sua evasão à ação dessas células poderiam ser auxiliados também pela saliva do vetor. O efeito inibitório da saliva de *Lu. longipalpis* nas funções de apresentação de antígeno pelos macrófagos e ativação pelo interferon-gama foi descrito por TITUS e RIBEIRO (1990) e THEODOS e TITUS (1993). A redução da produção de óxido nítrico pelo SGS de flebotomíneos *in vitro* também já foi demonstrada (HALL & TITUS, 1995), assim como a inibição da produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos (GILLESPIE et al., 2000).

7 CONCLUSÃO

O conteúdo e o perfil qualitativo de proteínas da saliva das fêmeas de *Lu. longipalpis* varia de acordo com a idade desses insetos e seu estado nutricional. Algumas proteínas da glândula salivar de *Lu. longipalpis* provavelmente só são produzidas a partir do terceiro dia de vida do inseto e o repasto sanguíneo não induz a produção de novas proteínas em *Lu. longipalpis*.

O SGS das fêmeas de *Lu. longipalpis* induz o recrutamento de macrófagos e eosinófilos no modelo do bolsão inflamatório. Existem componentes na saliva dessa espécie capazes de recrutar diferencialmente estas células, como evidenciado pelos experimentos realizados com diferentes extratos da saliva. Estudos posteriores devem ser realizados para investigar quais são estes componentes e quais os mecanismos envolvidos neste recrutamento.

REFERÊNCIAS

ANJILI, C.O.; MBATI, P.A.; MWANGI, R.W.; GITHURE, J.I.; OLOBO, J.O.; ROBERT, L.L.; KOECH, D.K. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Trop**, **60**:97-100, 1995.

BAKER, J. J. W.; ALLEN, G. E. **Estudo da Biologia**. 1V. 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1975. 366 p.

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

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

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**, **96**:349-51, 2001.

BLACK IV, W.C.; KONDRATIEFF, B.C. Evolution of Arthropod Disease Vectors. In: MARQUARDT, W. C.; BEATY, B. J. **Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 2002. p. 1-16.

BOZZA, M.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; SATOSKAR, A.R.; DIACOVO, T.G.; BROMBACHER, F.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, J.R.; DAVID, J.R. The PACAP-type I agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. **Eur J Immunol**, **28**: 3120-27, 1998.

BRENNAN, J.D.; KENT, M.; DHAR, R.; FUJIOKA, H.; KUMAR, N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **97**:13859-64, 2000.

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

CAPRON, M. Dual function of eosinophils in pathogenesis and protective immunity against parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **87** Suppl 5:83-9, 1992.

ČERNÁ, P.; MIKEŠ, L.; VOLF, P. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Insec Biochem Mol Biol**, **32**: 1691-1697, 2002.

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

CHARLAB, R.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Exp Parasitol**, **95**:45-53, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996.

de ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **98**:861-70, 2003.

FELICIANGELI, M.D.; RODRIGUEZ, N.; BRAVO, A.; ARIAS, F.; GUZMAN, B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. **Med Vet Entomol**, **8**:317-24, 1994.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1973. v.4. 658 p.

GASSER, R.A. JR.; MAGILL, A.J.; OSTER, C.N.; EILEEN, D.F.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin Infect Dis** 18:83-90, 1994.

GENARO, O.; SILVA, A.L.F.F.; MICHALICK; M.S.M.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; DIAS, M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 36 – 53.

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

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

GOLEND, C.F.; KLEIN, T.; COLEMAN, R.; BURGE, R.; WARD, R.A.; SEELEY, D.C. Depletion of total salivary gland protein in blood-fed *Anopheles* mosquitoes. **J Med Entomol**, 32:300-5, 1995.

- GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, **21**: 1037-1053, 2000.
- HASKO, G.; KUHEL, D.G.; NEMETH ZH MABLEY, J.G.; STACHLEWITZ, R.F.; VIRAG, L.; LOHINAI, Z.; SOUTHAN, G.J.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. **J Immunol**, **164**:1013-9, 2000.
- HALL, L.R.; TITUS, R.G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J Immunol**, **155**:3501-6, 1995.
- JAMES, A.A.; ROSSIGNOL, P.A. Mosquito salivary glands: Parasitological and molecular aspects. **Parasitol Today**, **7**:267-71,1991.
- KAMHAWI, S., BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, **290**: 1351-4, 2000.
- KATZ, O.; WAITUMBI, J.N.; ZER, R.; WARBURG, A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. **Am J Trop Med Hyg**, **62**:145-50, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. Prefácio. In: RANGEL, E. F. & LAINSON, R.

Flebotomíneos do Brasil. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 11 – 12.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, **266**:628-30, 1977.

LANZARO, G.C.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M.V.; LAWYER, P.G.; WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **Am J Trop Med Hyg**, **48**:839-47, 1993.

LANZARO, G.C.; LOPES, A.H.C.S.; RIBEIRO, J.M.C.; SHOEMAKER, C.B.; WARBURG, A.; SOARES, M.; TITUS, R.G. Variation in the salivary peptide, maxadillan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Insect Mol Biol**, **8**:267-275, 1999.

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

LEWIS, D.J. Internal structural features of some Central American phlebotomine sandflies. **Ann Trop Med Parasitol**, **59**:375-85. 1965.

LEWIS, D. J. Phlebotomid sandflies. **Bull World Health Organ**, **44**: 535-51, 1971.

LEWIS, D.J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annu Rev Entomol**, **19**:363-84, 1974.

LIMA , H.C.; TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect Immun**, **64**: 5442-5, 1996.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 432 p.

MARINOTTI, O., JAMES, A. A.; RIBEIRO, J.M.C. J. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Physiology**, **36**: 545-8, 1990.

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

MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; SILVA, A. L.F.F.; MEYRINK, W. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 31 – 35.

MILLERON, R.S.; RIBEIRO, J.M.; ELNAIME, D.; SOONG, L.; LANZARO, G.C. Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, **70**:278-85, 2004.

MOREIRA, C.K.; MARRELLI, M.T.; LIMA, S.P.; MARINOTTI, O. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**, **38**:763-7, 2001.

MOREIRA-FERRO, C.K.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A.T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue Cell**, **31**:264-73, 1999.

NASCIMENTO, E.P.; DOS SANTOS MALAFRONTTE, R.; MARINOTTI, O. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, **43**:9-15, 2000.

OLIVEIRA, S.M.P.; MORAES, B.A.; GONÇALVES, C.A.; GIORDANO DIAS, C.M.; d'ALMEIDA, J.M.; ASENSI, M.D.; MELLO, R.P.; BRAZIL, R.P. Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva,

1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes do campo. **Rev Soc Bras Med Trop**, **33**: 319 – 322, 2000.

PARANHOS, M.; DOS SANTOS, W.C.; SHERLOCK, I.; OLIVEIRA, G.G.; DE CARVALHO, L.C. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **88**:249-51, 1993.

PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J.; MCCONVILLE, M.J.; LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V.; SACKS, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, **256**:1812-5, 1992.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, M.; ROWTON, E.; MODI, G.B.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S.; SACKS, D.L. The vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglyca. **Proc Nat Acad Sci USA**, **91**: 9155-59, 1994.

PIMENTA, P.F.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D.L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, **115**:359-69, 1997.

RIBEIRO, J.M. Vector saliva and its role in parasite transmission. **Exp Parasitol**, **69**:104-6, 1989.

RIBEIRO, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect Agents Dis**, **4**: 143-52, 1995.

RIBEIRO, J.M. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med Vet Entomol**, **14**:142-8, 2000.

RIBEIRO, J.M.; MODI, G. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. **J Parasitol**, **87**:915-7, 2001.

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, **48**:73-88, 2003.

RIBEIRO, J.M.; ROWTON, E.D.; CHARLAB, R.. Salivary amilase activity of the phebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochem Mol Biol**, **30**:271-7, 2000a.

RIBEIRO, J.M.; ROWTON, E.D.; CHARLAB, R. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochem Mol Biol**, **30**:279-85, 2000b.

RIBEIRO, J.M.; ROWTON, E.D.; CHARLAB, R. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochem Mol Biol**, **30**:271-7, 2000c.

RISPAIL, P.; DEREURE, J.; JARRY, D. Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **97**:477-83, 2002.

RODRIGUEZ, M.H.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. de L. Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. **Insect Biochem Mol Biol**. **34**:615-24, 2004.

ROGERS, K.A.; TITUS, R.G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunol.** **25**:127-34, 2003.

ROSS, H. H. **A Textbook of Entomology**. 3 ed. United States of America: Wiley, 1965. 539 p.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, **34**:456-9, 1985.

SACKS, D.L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**, **3**:189-96, 2001.

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

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today**, **9**:255-8, 1993.

SEDGWICK, A.D.; SIN, Y.M.; EDWARDS, J.C.; WILLOUGHBY, D.A. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. **J Pathol**, **141**:483-95, 1983.

SHERLOCK, I.A.; MAIA, H.; DIAS-LIMA, A.G. Preliminary results of a project about the ecology of *Phlebotomus* vectors of cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop**, **29**:207-14, 1996.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, **68**: 850-5, 1996.

SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J.C.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am J Trop Med Hyg**, **72**:94-8, 2005.

SOARES, M.B.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J Immunol**, **160**:1811-16, 1998.

SOARES, R.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc**, **75**:301-30, 2003.

SOLIMAN, M.A.; ABDEL-HAMID, M.E.; MANSOUR, M.M.; SEIF, A.I.; KAMEL, K.I.; EI HAMSHARY, E.M. Total salivary gland proteins of female *Culex pipiens* and *Aedes caspius* (Diptera: Culicidae) and their fractionation during adult development and after blood sucking. **J Egypt Soc Parasitol**, **29**:619-34, 1999.

THEODOS, C.M.; TITUS, R.G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. **Parasite Immunol**, **15**:481-7, 1993.

THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.C.; TITUS, R.G. Analysis of the enhancing effect of sand fly saliva on infection with *Leishmania* in mice. **Infect Immun**, **59**: 1592-8, 1991.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, **239**: 1306-8, 1988.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitol Today**, **6**:157-60, 1990.

TRAVI, B.L.; ADLER, G.H.; LOZANO, M.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. **J Med Entomol**, **39**:451-6, 2002.

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.M. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. **J Exp Biol**, **204**:229-37, 2001a.

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med**, **194**:331-42, 2001b.

VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; GONZALEZ, E.C.; DE MIRANDA-SANTOS, I.K.; MARINOTTI, O; FRANCISCHETTI, I.M.; RIBEIRO, J.M. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. **Insect Mol Biol**, **11**:149-55, 2002.

VALENZUELA, J.G.; GARFIELD, M.; ROWTON, E.D.; PHAM, V.M. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. **J Exp Biol**, **207**:3717-29, 2004.

VOLF, P.; TESAROVA, P.; NOHYNKOVA, E.N. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. **Med Vet Entomol**, **14**:251-6, 2000.

WARBURG, A.E.; SARAIVA, LANZARO,G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, **345**: 223-30, 1994.

WELLS, Michael A. Vector Nutrition and Energy Metabolism. In: MARQUARDT, W. C.; BEATY, B. J. **Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 2002. p. 2.

WIKEL, S. K. Immune responses to arthropods and their products. **Annu Rev Entomol**, 27: 21-48, 1982.

WILLIAMS, P. Psychodidae. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 311–319.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm> , acesso em 29/12/2004.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int J Parasitol**, 31:810-4, 2001.