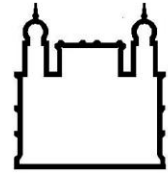




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SOROCONVERSÃO DE GALINHAS PARA ANTÍGENOS
SALIVARES DE *L. LONGIPALPIS*: POSSIBILIDADE DE USO
COMO SENTINELA EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

Salvador – Bahia

2012

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**SOROCONVERSÃO DE GALINHAS PARA ANTÍGENOS
SALIVARES DE *L. LONGIPALPIS*: POSSIBILIDADE DE USO
COMO SENTINELA EM ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Aldina Barral

Co-orientador: José Carlos Miranda

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental para obtenção do grau de
Mestre.

Salvador-Bahia

2012

SOROCONVERSÃO DE GALINHAS PARA ANTÍGENOS SALIVARES DE *L. LONGIPALPIS*:
POSSIBILIDADE DE USO COMO SENTINELA EM ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL

BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

Dra. Patrícia Tavares Sampaio Veras

CPqGM – FIOCRUZ

Dr. Roque Pacheco de Almeida

UFSE

Dra. Aldina Barral

CPqGM – FIOCRUZ

Orientadora

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Pela bolsa de mestrado.

*Ainda que seus passos pareçam inúteis;
vá abrindo caminhos como a água que
desce cantando a montanha. Outros te
seguirão....*

Antonie de Saint-Exupéry

Aos meus irmãos com todo o meu amor...

AGRADECIMENTOS

Uma dissertação pela sua finalidade acadêmica consiste em um trabalho individual, porém há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Dra. Aldina Barral pela competência científica e orientação dada, oportunizando a realização deste trabalho.

Ao Dr. José Carlos Miranda, pelo acolhimento, incentivo e pelo grande trabalho desenvolvido em campo.

Aos Pesquisadores do LIP/LIMI pelos ensinamentos.

À Ana Paula pelos ensinamentos diários, companheirismo e apoio.

A Deboraci e Clarissa pelo apoio fundamental na finalização deste trabalho. Muito Obrigada!

A todos os colegas do LIP e LIM/CPqGM, em especial as colegas Daniela e Katrine vocês se tornaram mais que colegas e hoje posso carinhosamente chamá-las de amigas!

À Edvaldo pela paciência e auxílio durante a realização dos meus experimentos

Aos colegas do curso de Mestrado Jamile, Renatinha, Diana, Túlio, Luana e Daniela, obrigada por terem tornado o ambiente da sala de aula mais agradável.

A meus pais, pelo incentivo e conforto nas horas mais difíceis. Obrigada por acreditarem em mim.

Aos irmãos “meus filhos” Beto e Malu que viveram comigo cada segundo dessa jornada, sem dúvida, essa vitória também é de vocês!

A minha avó, por todo o meu amor (em memória).

A Zé pelo companheirismo e preocupações excessivas, sua palavra amiga e seu incentivo foram fundamentais para que eu chegasse até aqui!

À Ana Carvalho, grande amiga e incentivadora.

À Gui, Jajá, Cida, May e Jami por serem presente nos momentos em que mais precisava de apoio, me incentivado a prosseguir... Adoro vocês!

As secretarias do LIP/LIMI Elze e Andrezza pela disponibilidade em sempre resolver problemas.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ e Universidade Federal da Bahia.

Ao curso de Pós-graduação em Patologia.

Aos funcionários da pós-graduação, biblioteca e segurança.

A todos os professores e funcionários do CPqGM/UFBA.

Aos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

SOARES, Bárbara Nascimento Rocha Ribeiro. Soroconversão de galinhas para antígenos salivares de *L. Longipalpis*: possibilidade de uso como sentinela em área endêmica para leishmaniose visceral. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é transmitida pela picada de insetos da espécie vetora *Lutzomyia longipalpis* através da inoculação dos parasitas juntamente com a saliva na pele do hospedeiro durante a alimentação sanguínea. A saliva deste vetor desempenha um papel importante na obtenção do repasto, sendo também capaz de modular o sistema imune do hospedeiro. Algumas proteínas salivares são imunogênicas e podem induzir a produção de anticorpos específicos. Neste sentido, a presença de anticorpos anti-saliva pode ser utilizada como marcador de exposição ao vetor. Na LV, a presença de galinhas em área endêmica é considerada um fator importante na manutenção da fauna flebotômica, além de ser citada como um importante fator de risco para a transmissão da doença. Entretanto, o papel da galinha na cadeia epidemiológica da LV ainda não é bem compreendido. Nosso objetivo neste estudo foi detectar nestes animais a presença de anticorpos contra o sonicado de glândula salivar (SGS) a serem utilizados como marcadores de exposição a *L. longipalpis* e investigar o potencial papel destas aves como sentinela para a presença do vetor em área endêmica. Para isso, quarenta galinhas foram distribuídas em cinco residências em Cavunge, área endêmica para LV na Bahia e naturalmente expostas a picadas de flebotômicos durante oito meses. Para avaliar a densidade vetorial armadilhas luminosas foram distribuídas e monitoradas mensalmente nas mesmas residências. Amostras de sangue destas aves foram coletadas a cada dois meses e monitorada a soroconversão para SGS. O teste de ELISA foi realizado para avaliar o reconhecimento de SGS onde, após quatro meses do início da exposição 26% das aves se tornaram positivas e com seis meses de exposição detectamos uma soroconversão de 100% das galinhas. Após oito meses, todas apresentavam altos títulos de anticorpos anti-SGS, aumentado 2,7 vezes sobre o valor do *cut-off*. Além do SGS foram utilizadas as proteínas recombinantes LJM17 e LJM11 da saliva da *L. longipalpis* que apresentaram desempenho semelhante ao SGS. O teste de correlação aplicado entre a densidade flebotômica e os níveis de anticorpos específicos após oito meses de exposição não foi positivo, porém pôde-se observar que independente da variação na densidade de vetores, após a soroconversão, galinhas são capazes de manter os níveis de anticorpos IgY anti-SGS constantes. Para avaliar a reatividade cruzada para o reconhecimento a saliva da *L. longipalpis*, foram utilizados soros de galinhas expostas a picadas de barbeiros e *Aedes aegypti*, onde identificamos o reconhecimento de duas proteínas da saliva da *L. longipalpis* com peso de 61 e 79kDa. A proteína recombinante LJM11 não apresentou reatividade cruzada quando testada. Estes resultados demonstram que a exposição natural de galinhas ao vetor *L. longipalpis* resulta na produção de anticorpos IgY específicos anti-saliva sugerindo o uso destes animais como indicadores da presença do vetor, levantando a possibilidade da utilização de galinhas como um animal sentinela para a detecção da *L. longipalpis* em áreas endêmicas.

PALAVRAS CHAVE: Anticorpo, Galinhas, *Lutzomyia longipalpis*, SGS.

SOARES, Bárbara Nascimento Rocha Ribeiro. Seroconversion of chickens naturally exposed to *Lutzomyia longipalpis*, in an endemic area of vl: possibility of the chicken as a sentinel animal. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is transmitted by *Lutzomyia longipalpis*, when saliva and parasites are injected into the host skin during blood feeding. Saliva has an important role not only in the blood meal process but it is also able to modulate the host's immune response. Some salivary proteins are immunogenic inducing production of anti-saliva antibodies in the host that can be used as markers of exposure to the vector. In VL, the presence of chicken in the endemic area is indicated as an important source for a blood meal and is often considered as a risk factor for transmission. However the role of the chicken in the VL epidemiology has not been defined. Here we investigate if the detection of antibodies against salivary gland sonicate (SGS) from *L. longipalpis* could be used as exposure markers to *L. longipalpis* and the potential role of the chicken as a sentinel animal. Forty chickens were distributed in five houses in Cavunge, a VL endemic area in Bahia, where they were naturally exposed to sand flies during eight months. To evaluate vector density, light traps were distributed and monitored monthly in the same houses. Blood samples were collected every two months to monitor the development of anti-SGS antibodies. ELISA was performed for the recognition of SGS and, after 4 months 26% of the exposed chickens became positive and 6 months later 100% were positive. After 8 months all of them were positive with high antibodies titers against SGS, 2.7x above cut-off value. Beside SGS we also used LJM17 and LJM11 and these recombinant proteins showed similar performance as SGS. There was no correlation between specific anti-saliva antibody levels and sandfly density. Although a cross-reactivity test using sera from chicken exposed to triatomines and *Aedes aegypti* demonstrated that the proteins of 61 and 79 kDa salivary proteins were only detected in animals exposed to triatomines, LJM11 recombinant protein was shown to be specific to *L. longipalpis* exposure. Altogether these results show that chicken naturally exposed to the vector develop high titers of anti-saliva antibodies and may be used as important indicators of vector presence, raising the possibility of using chicken as a sentinel animal in endemic areas.

KEY WORDS: Antibodies, Chickens, *Lutzomyia longipalpis*, SGS.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IM	Intramuscular
kDa	Quilodáltons
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
<i>L. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LV	Leishmaniose visceral
PBS	Tampão de Salina Fosfatada (pH 7.4) (Phosphate Buffered saline)
ROC	Característica Receptor Operador
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SGS	Sonicado de Glândula Salivar
SLA	Antígeno Solúvel de Leishmania
WVN	West Nile Virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do Estudo.....	26
Figura 2	Acompanhamento da soroconversão de aves imunizadas experimentalmente com Sônico de Glândula Salivar de flebotômico <i>L. longipalpis</i>	32
Figura 3	Soroconversão de galinhas expostas à picadas de <i>L. longipalpis</i> em área endêmica para LV.....	33
Figura 4.	Proteínas salivares reconhecidas por soro de galinhas expostas à picadas de <i>L. longipalpis</i>	34
Figura 5	Detecção de proteínas recombinantes da saliva da <i>L. longipalpis</i> em soros de galinhas.....	36
Figura 6.	Soroconversão para as proteínas recombinantes da saliva de <i>L. longipalpis</i> em galinhas expostas à picadas em área endêmica para LV.....	37
Figura 7	Curvas ROC dos níveis de anticorpos para previsão da positividade contra proteínas totais e recombinantes da saliva de <i>L. longipalpis</i>	38
Figura 8.	Correlação entre os níveis de anticorpos IgY anti-SGS e IgY anti- LJM11.....	40
Figura 9.	Densidade flebotômica e títulos de anticorpos exibidos pelas galinhas em área endêmica para LV.....	41
Figura 10	Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva da <i>L. longipalpis</i> entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos.....	42
Figura 11	Especificidade no reconhecimento da proteína recombinante LJM11 da saliva da <i>L. longipalpis</i> entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela1.	Acurácia dos antígenos: SGS, LJM11, LJM17 e LJM11+LJM17 no reconhecimento de soros de galinhas expostas em área para LV através de testes ELISA.....	39
-----------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.2	INTERFACE VETOR-PARASITA.....	17
1.2.1	Os flebotomíneos	17
1.2.2	A leishmania.....	18
1.3	A SALIVA DE INSETOS VETORES EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS	19
1.3.1	A importância da saliva.....	19
1.3.2	Anticorpo anti-saliva como marcador epidemiológico de exposição ao vetor.....	20
1.4	UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS SENTINELA PARA MONITORAMENTO DE ÁREAS ENDÊMICAS.....	22
1.5	GALINHAS: POSSÍVEL FATOR DE RISCO PARA LV.....	23
2	OBJETIVOS	26
	HIPÓTESE.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	METODOLOGIA	27
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	27
3.2	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	29
3.3	OBTENÇÃO E COLONIZAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS	29
3.4	OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES.....	30
3.5	IMUNIZAÇÃO DAS AVES.....	30
3.7	OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA SALIVA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> ..	31
3.8	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE DOT BLOT	31
3.9	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SGS E ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR ELISA.....	31
3.10	IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE PROTEÍNAS SALIVARES POR WESTERN BLOT	32
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS	34
4.1	SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPERIMENTALMENTE IMUNIZADAS COM SGS DE <i>L. LONGIPALPIS</i>	34
4.2	SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPOSTAS NATURALMENTE A PICADAS DE <i>L.</i> <i>LONGIPALPIS</i> EM ÁREA ENDÊMICA PARA LV	35

4.3	ANÁLISE DA SOROCONVERSÃO DE GALINHAS UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTE DA SALIVA DA <i>L. LONGIPALPIS</i>	37
4.4	CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE ANTICORPOS IGY ANTI-SALIVA COM DENSIDADE FLEBOTOMÍNICA NA ÁREA ENDÊMICA PARA LV	42
4.5	ESPECIFICIDADE NO RECONHECIMENTO DA SALIVA TOTAL DA <i>L. LONGIPALPIS</i>	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Pertencente ao Filo Arthropoda, a classe Insecta possui relevante destaque por representar 70% das espécies de animais e por estar distribuída nos mais variados ambientes (BORROR e DELONG 1969). Esta classe também se destaca por apresentar diversos insetos transmissores de agentes patogênicos. Em sua maioria, tais vetores são insetos hematófagos que, durante o repasto sanguíneo, transmitem patógenos aos hospedeiros vertebrados incluindo o homem. Nos insetos, a hematofagia pode ocorrer em ambos os sexos, como ocorre nas pulgas, triatomíneos, piolhos anopluros e moscas, ou apenas nas fêmeas, como em culicídeos e flebotomíneos (MARCONDES, 2001). A realização da alimentação sanguínea como importante hábito foi constatada em cerca de 19.000 espécies de aproximadamente um milhão de espécies já conhecidas de insetos e tem sido bastante estudado em diferentes aspectos: biológicos, ecológicos e vetoriais (RIBEIRO, 1995). Grande parte da transmissão de patógenos por insetos vetores ocorre no momento do repasto sanguíneo, devido a sua importância médica, diferentes trabalhos têm demonstrado que os insetos hematófagos possuem em sua saliva um conjunto de moléculas que transpõem as barreiras hemostáticas do hospedeiro facilitando a sua efetiva aquisição de sangue. Muitas dessas moléculas se resumem a diferentes proteínas presentes na saliva dos vetores hematófagos como proteínas, enzimas, etc., que possuem atividade anti-hemostáticas (RIBEIRO, 1995; RIBEIRO, 1987; CHAMPGNE, 1994; STARK e JAMES, 1998). Além de favorecer a alimentação sanguínea, a saliva de alguns insetos vetores é imunogênica, induzindo no hospedeiro vertebrado, incluindo o homem, o desenvolvimento de anticorpos anti-saliva espécie-específico contra antígenos salivares (ROHOUSOVA et al., 2005a). Em virtude dessa característica a saliva de hematófagos tem sido sugerida como um marcador epidemiológico de exposição a tais insetos (BARRAL et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2009; SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010). Nesse sentido, a exposição do hospedeiro à saliva de flebotomíneos, insetos hematófagos vetores das leishmanioses, tem sido bastante estudada, uma vez que, a leishmaniose, é considerada um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo (RIBEIRO, 1995; ANDRADE et al., 2005; ROHOUSOVÁ e VOLF, 2006).

1.2 INTERFACE VETOR-PARASITA

1.2.1 Os flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometábolos diminutos, pertencentes à Ordem Diptera, à Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae, cujas fêmeas possuem hábito hematófago (GONTIJO e MELO 2004). Popularmente, os flebotomíneos são conhecidos como “mosquito palha” ou “cangalhinha”. A classificação taxonômica mais aceita reconhece seis gêneros de flebotomíneos: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileyia* no Novo Mundo (LEWIS, 1971). Os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* são os principais vetores das leishmanioses, doenças causadas por protozoários, nas Américas e Velho Mundo, respectivamente (FORATINE, 1973). Esses vetores são comumente encontrados em áreas florestais ou próximo destas, em locais úmidos e escuros com temperaturas moderadas, podendo estar também presentes no ambiente do domicílio e peridomicílio. Além da transmissão de protozoários, os flebotomíneos também são responsáveis pela transmissão de vírus e bactérias (ARIAS et al., 1985), como as bartoneloses (BIRTLES, 2001) e flebovirose (TESH, 1988). Os flebotomíneos possuem aparelho bucal do tipo picador sugador e têm como principal fonte de energia carboidratos obtidos de seiva de plantas (ALEXANDER e USMA, 1994). As fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos, possuindo hábitos alimentares crepuscular e noturno (XIMENES et al., 2000). O ciclo biológico dos flebotomíneos compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Todo o ciclo dura cerca de 30 a 70 dias (FORATINE, 1973).

Existem aproximadamente 700 espécies de flebotomíneos descritas. Destas, 400 espécies e subespécies são do gênero *Lutzomyia*, onde 229 estão distribuídas no Brasil (KILLICK-KENDRICK, 2003). A *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ&NEIVA, 1912 apud DIAS, LOROZA e REBÊLO 2003) é a principal espécie transmissora da *Leishmania infantum chagasi* no Brasil (ARIAS et al., 1985) e certamente preenche todos os critérios estabelecidos para competência vetorial, destacando aqueles considerados essenciais, como a antropofilia, distribuição espacial coincidente com casos humanos da doença e infecção natural pelo parasito (DEANE, 1956; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON e RANGEL, 2005). No Brasil, a *L. longipalpis* já apresenta extensa distribuição geográfica, e de acordo

com estudos anteriores como o de XIMENES e colaboradores (2000) e LAINSON e RANGEL (2005) o comportamento eclético e oportunista da *L. longipalpis* está associado à urbanização da Leishmaniose Visceral (LV), especialmente devido à flexibilidade de hábitos alimentares e fácil adaptação às condições domésticas, o que permite sua captura dentro de moradias humanas e abrigos animais (RANGEL e VILELA, 2008).

1.2.2 A leishmania

A leishmania, agente etiológico das leishmanioses, é um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania*, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastidea e Família Tripanosomatidae (LEISHMAN, 1994). Esses parasitos são digenéticos apresentando diferentes morfologias no seu ciclo biológico. As formas promastigotas são flageladas, móveis e extracelulares, que podem ser encontradas livres ou aderidas às microvilosidades da cutícula intestinal no tubo digestivo do inseto vetor (KILLICK-KENDRICK, 1990; WALTERS et al, 1989). A forma amastigota, como é visto nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, é intracelular obrigatória (HERWALDT, 1999).

A principal forma de transmissão parasitária para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de flebotomíneos no momento em que estas realizam a hematofagia (SCOTT e FARRELL, 1998). O ciclo da leishmania inicia-se com o repasto sanguíneo do inseto que, ao picar um animal infectado, ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas do protozoário. Estas formas atingem o intestino anterior do inseto, desenvolvendo uma série de modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais (KILLICK-KENDRICK 1990; WALTERS et al., 1989) necessárias para sua sobrevivência dentro do hospedeiro e para o desenvolvimento da infecção (SACKS, 1989). Uma vez no interior do trato digestivo do vetor, o parasito assume sua forma promastigota, diferenciando-se em promastigota procíclica, estágio que evita sua expulsão do intestino médio do flebotomíneo. Posteriormente, a leishmania se transforma na forma promastigota metacíclica, forma infectante, fase na qual este parasita migra para a porção anterior do intestino do flebotomo. O hospedeiro vertebrado é infectado pela picada do vetor quando este, ao realizar o seu próximo repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas metacíclicas. Estas, ao penetrarem nas células do sistema fagocitário mononuclear local, transformam-se em amastigotas e, por divisão longitudinal binária, multiplicam-se intensamente (MELBY et al.,1998). As formas amastigotas se desenvolvem dentro de macrófagos do hospedeiro

infectado e estes apresentam os sinais e sintomas da doença, que possui diferentes formas clínicas, ou servem de reservatório do parasito (MELBY et al., 1998).

As leishmanioses estão presentes em 88 países em todo o mundo. Essas doenças foram agrupadas com mais onze enfermidades como doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2010). Entre as suas diferentes formas clínicas está a leishmaniose visceral (LV), a qual é endêmica em 62 países do mundo. O Brasil responde por 90% dos casos registrado de LV na América do Sul e 77% dos casos em nosso país estão distribuídos principalmente na região Nordeste nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (COSTA, 1990). No Brasil, a LV é transmitida pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis* infectado pela *Leishmania infantum chagasi*.

1.2 A SALIVA DE INSETOS VETORES EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.3.1 A importância da saliva

Para os insetos hematófagos, o sangue obtido do hospedeiro é de grande importância e, em sua maioria, é necessário para suprir demandas nutricionais associadas com o seu crescimento e com o amadurecimento do folículo ovariano (CARRERA, 1991; NEVES et al., 2005). Entretanto, a aquisição de sangue do hospedeiro vertebrado não é tarefa tão simples assim, uma vez que estes desenvolveram eficientes mecanismos hemostáticos como a agregação plaquetária, a coagulação e a vasoconstricção para evitar a perda sanguínea provocada por lesões teciduais (BOWMAN, et al., 1997; SCHOELER e WIKEL, 2001). Por outro lado, a saliva dos insetos hematófagos dispõe de um arsenal molecular capaz de neutralizar essas barreiras hemostáticas (RIBEIRO et al., 1994; RIBEIRO, 1995; BASANOVA et al., 2002; CHAMPAGNE, 1994).

Em flebotomíneos, a saliva, além de possuir atividade anti-hemostática que facilita a ingestão sanguínea, apresenta grande relevância pela sua capacidade de regular o sistema imune do hospedeiro vertebrado, criando um ambiente adequado à sobrevivência e multiplicação dos parasitas transmitidos durante a hematofagia (ANDRADE et al., 2005; ROHOUSOVÁ e VOLF, 2006; MENEZES et al., 2008). Em virtude disso, diversos trabalhos têm descrito componentes salivares de espécies de flebotomíneos do Velho Mundo e das Américas, bem como algumas de suas funções. A saliva da *L. longipalpis* possui o mais potente vasodilatador conhecido, o maxadilan (MORO e LERNER, 1997). Além desta

função, também foi descrito que o maxadilán inibe a ação de macrófagos (LERNER et al. 1991; TITUS e RIBEIRO, 1988.), aumenta o fluxo sanguíneo e acelera o repasto no hospedeiro (RIBEIRO, *et al.*, 1989). Além do maxadilán, foi descrito que as glândulas salivares dos flebotomíneos apresentam um complexo de moléculas, sendo a apirase e proteínas da família *yellow* as mais estudadas (RIBEIRO et al., 1989 LENER et al., 1991; 1986; TEIXEIRA et al., 2010 e SHAZIA e READY, 2011). A apirase funciona como um anti-agregante plaquetário e é encontrada em flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (RIBEIRO et al., 1989 e TEIXEIRA et al., 2010). A família de proteínas *yellow* é considerada o mais importante grupo de proteínas presentes na saliva de flebotomíneos. Esta família é a mais abundantemente expressa e a mais estudada atualmente, tendo a função de remoção de mediadores da inflamação e da resposta hemostática (RIBEIRO et al., 2010 e XUEQING XU et al., 2011).

1.3.2 Anticorpo anti-saliva como marcador epidemiológico de exposição ao vetor

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

Existem diversas evidências a respeito das propriedades imunogênicas dos componentes salivares dos flebotomíneos, sendo a produção de anticorpos contra as diferentes proteínas da saliva uma delas. (BELKAID et al., 1998; GOSH e MUKHOPADHYAY et al., 1998; VOLF e ROHOUSOVÁ et al., 2001). Estudos experimentais com camundongos demonstram a presença de anticorpos anti-saliva após exposição destes animais às picadas de flebotomíneos (BELKAID et al., 1998; GHOSH e MUKHOPADHYAY, 1998; VOLF e ROHOUSOVÁ, 2001; SILVA et al., 2005). A presença de anticorpos contra a saliva de flebotomíneos também foi observada em indivíduos de área endêmica para a Leishmaniose

Visceral, sendo detectados anticorpos IgG específicos aos componentes salivares do vetor *L. longipalpis* (BARRAL et al., 2000; GOMES et al., 2002). Dados da literatura demonstram que os diferentes constituintes proteicos da saliva de flebotomos podem variar de acordo com a diversidade de espécies existentes, sugerindo que a saliva de flebotomíneos pode apresentar diferentes componentes salivares imunogênicos (ROHOUSOVÁ et al., 2005a). De fato, neste mesmo trabalho foi demonstrado que diferentes hospedeiros (camundongo e homem) expostos a picadas de flebotomíneos produzem anticorpos que reconhecem antígenos espécie-específicos da saliva de *Phlebotomussergenti* e *Phlebotomuspapatasi*, sugerindo que a especificidade antigênica esteja ligada a distância filogenética entre táxons de insetos, e antígenos compartilhados por espécies distintas são frequentes apenas em espécies correlatas (ROHOUSOVA et al., 2005a). GOMES e colaboradores em 2002, ao verificar a resposta específica contra componentes totais da saliva do *L. longipalpis*, estudaram a frequência de reconhecimento específico para estas proteínas, verificando que soros de crianças de área endêmica para LV são capazes de reconhecer as proteínas salivares de 45, 44, 43 e a de 35 kDa. Estudos epidemiológicos desta natureza, realizados para a identificação das taxas de exposição aos vetores das leishmanioses, buscam, além do uso do SGS como marcador de exposição ao vetor, a utilização de proteínas salivares isoladas, como por exemplo, as proteínas recombinantes (BARRAL et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2010 e SOUZA et al., 2010). A utilização dessas proteínas recombinantes da saliva em estudos de exposição à picadas de flebotomíneos passa, então, a apresentar uma vantagem em relação ao uso da saliva total, uma vez que estas podem ser produzidas em abundância, não havendo variações em seu conteúdo proteico (VALENZUELA et al., 2004). Atualmente já se pode contar com a biblioteca genômica de várias espécies de flebotomíneos, o que possibilita a clonagem e expressão de distintas proteínas contidas na saliva desses vetores.

Utilizando nove proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* TEIXEIRA e colaboradores (2010) fizeram uma triagem das proteínas especificamente reconhecidas em soros provenientes de indivíduos, cães e raposas de uma área endêmica para Leishmaniose Visceral. Neste trabalho, as proteínas recombinantes usadas foram: LJM04 [13,8 kDa (protein SL1)], LJM13 [26kDa (D7 related protein)], LJM143 [32,4 kDa *Hypothetical protein (P. falciparum)*], LJM23 [35 kDa (*apyrase*)], LJM111 [42,9 kDa (*Yellow related-protein*)], LJM11 [43 kDa(*Yellow related-protein*)], LJM138 [43,7 kDa (Endonuclease)], LJM17 [45 kDa(*Yellow related-protein*)] e LJM11 [60,5 (5' Nucleotidase)].Dentre as proteínas citadas, a LJM11 e LJM17 são as mais estudadas,sendo utilizadas como marcadores de exposição

capazes de gerar uma resposta de anticorpos em cães e humanos expostos em uma área endêmica para LV(SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010).A utilização destes antígenos recombinantes, trazem perspectivas para a compreensão das interações vetor-hospedeiro, além de favorecer o desenvolvimento de ferramentas epidemiológicas capazes de correlacionar os níveis de anticorpos anti-proteína recombinante com a suscetibilidade de infecções pela leishmania (BARRAL et al., 2000). Portanto, anticorpos anti-SGS ou anti-proteína recombinante da saliva de flebotomíneos podem servir como indicadores úteis para verificar a distribuição espacial de flebotomíneos em uma determinada região, contribuindo assim para direcionar os esforços de controle de vetores e doenças (Revisado por TEIXEIRA et al., 2005).

1.3 UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS SENTINELA PARA MONITORAMENTO DE ÁREAS ENDÊMICAS

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

A utilização de galinhas como animais sentinela tem sido descrita em diversas doenças tais como *West Nile Virus*(WNV) nos Estados Unidos (REISEN et al., 2009), *Avian Influenza* France e Holland e, *St. Louis encephalitis* nos Estados Unidos (Revisado por RACLOZ et al., 2007), sendo utilizadas em programas de controle epidemiológico. Estes animais auxiliam no monitoramento ou identificação de surtos causados por agentes infecciosos, investigação das mudanças na prevalência ou incidência de uma determinada doença, além de avaliar a eficácia de programas de controle epidemiológico instituído em determinada área (RACLOZ et al., 2007). Em resposta a exposição vetorial e/ou doença em áreas endêmicas, as aves sentinelas podem produzir anticorpos específicos (KWAN et al., 2010), sendo a IgG o isotipo principal. Como a molécula de IgG de aves possui estrutura maior que o seu equivalente em mamíferos, geralmente é chamada de IgY (ORLANDI-PRADINES et al., 2007).

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

1.4 GALINHAS: POSSÍVEL FATOR DE RISCO PARA LV

Em áreas endêmicas para leishmaniose, as estratégias de controle são complexas e de difícil implantação, principalmente porque estas implicam no combate do vetor da doença. Deste modo, a LV permanece como um problema de saúde pública cada vez mais grave no Brasil e para novas medidas de controle se faz necessário a compreensão da cadeia de transmissão desta doença, direcionando estudos com os vetores (flebotomíneos). Em virtude do pouco conhecimento a cerca da dinamicidade da infecção dos flebotomíneos quando alimentados em determinados animais, faz-se necessário um estudo epidemiológico e entomológico para obter definições indispensáveis às campanhas de profilaxia das leishmanioses. Para isso é necessário a identificação da disponibilidade de fontes alimentares (animais domésticos e/ou silvestres) em áreas onde ocorrem estes vetores, pois constituem um

fator importante na manutenção da população de flebotomíneos (ALEXANDER et al., 2002). Estudos feitos com conteúdo estomacal de flebotomíneos em diversas áreas endêmicas demonstraram alta frequência de sangue de aves em associação com o sangue de diversos outros animais (DIAS et al., 2003; NERY et al., 2004; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008). Investigações conduzidas por DIAS e colaboradores (2003), evidenciaram que a galinha é o animal doméstico comumente encontrado no ambiente do peridomicílio, constituindo 87,9% do tipo sanguíneo preferencial da *Lutzomyia longipalpis*.

Sabe-se que galináceos não se infectam por *Leishmania* devido as suas características fisiológicas, principalmente a alta temperatura corporal e pela atividade do sistema complemento que impede o seu desenvolvimento (OTRANTO, et al., 2009). Apesar de galinhas não atuarem como reservatório, alguns estudos epidemiológicos sobre a LV têm demonstrado que a presença de galinheiros próximos as habitações humanas constituem um fator de risco para a transmissão da doença, (ALEXANDER et al., 2002; CALDAS et al., 2001) e que indivíduos residentes em casas próximas a galinheiros possuem risco 4.21 maior de contrair a LV (RODRIGUES et al., 1999). Inúmeros são os fatores que podem favorecer a alimentação de flebotomíneos em sangue de galinha. Menores níveis de hemoglobina, a inatividade durante o período noturno e por possuírem áreas de exposição que facilitam a alimentação, como cristas e barbelas ricas em capilares e sua epiderme mais fina, o que também facilita a introdução da probóscide destes insetos (FREEMAN et al., 1984; ALEXANDER et al., 2002). Além de possuir características fisiológicas favoráveis para alimentação de flebotomíneos, galinhas também são importantes na atração das fêmeas para alimentação e posterior realização da corte (BRAY et al., 2010). Inicialmente os machos são atraídos para o local da alimentação liberando feromônios, estes têm a sua volatilização favorecida devido a alta temperatura corporal das aves (41°C), que somado a emissão de CO₂ parece auxiliar a orientação das fêmeas para realização do repasto sanguíneo (PETERS et al., 1983 e BRAY et al., 2010). A relação entre galinhas e os flebótomos já havia sido verificada por TEODORO e colaboradores (1999), quando observaram que o galinheiro se mostra bastante atrativo para o *L. longipalpis*, que encontra neste local abundância de alimento e matéria orgânica úmida para seus criadouros. Com base nestas evidências, a proximidade de casas e galinheiros constitui um fator de risco para transmissão da LV. Deste modo, compreender o papel específico da galinha na cadeia epidemiológica de transmissão da LV pode auxiliar na implementação de medidas preventivas sustentáveis contra a doença,

sobretudo porque estas aves são criadas em abundância em zonas rurais e bairros de baixa renda nas grandes cidades do Brasil (ALEXANDER et al., 2002).

2 OBJETIVOS

HIPÓTESE

A galinha (*Gallus gallus domesticus*) é considerada um animal sentinela para detecção da presença do vetor *L. longipalpis* em uma área endêmica para LV.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de galinhas como sentinela para detecção da presença da *L. longipalpis* a partir dos níveis de anticorpos produzidos contra a saliva deste vetor em uma área endêmica para LV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os níveis séricos de IgY anti-SGS em galinhas experimentalmente imunizadas com SGS de *L. longipalpis* em laboratório.
- 2) Acompanhar a soroconversão para SGS da *L. longipalpis* em galinhas expostas naturalmente a picadas deste vetor em área endêmica para LV.
- 3) Avaliar a soroconversão para as proteínas recombinantes (LJM11 e LJM17) da saliva de *L. longipalpis* em galinhas expostas a picadas deste vetor.
- 4) Correlacionar os níveis séricos de anticorpos IgY anti-SGS presentes em galinhas expostas naturalmente ao *L. longipalpis* com a densidade flebotomínica em área endêmica para LV.
- 5) Verificar a reatividade cruzada em soros de galinhas picadas por outros insetos vetores usando como antígeno o SGS e a proteína recombinante LJM11.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Para avaliar a utilização de galinhas como sentinela em área endêmica para Leishmaniose Visceral foram realizadas três abordagens. Primeiramente, foi avaliado o desenvolvimento da resposta humoral IgY anti-SGS em galinhas (n=3) previamente imunizadas com SGS de *L. longipalpis* e adjuvante de *Freund's*. Nesta etapa, as aves foram acompanhadas para monitoramento da soroconversão através de testes sorológicos ELISA anti-SGS. O ponto de corte (*cut-off*) foi estabelecido com a média mais três desvios-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de 15 galinhas de área não endêmica. As amostras de soro com DO acima deste *cut-off* (0.045) foram consideradas positivas para SGS. Esta etapa subsidiou os experimentos posteriores realizados em Cavunge-Bahia, área endêmica para LV.

A segunda abordagem constituiu na análise da soroconversão de galinhas naturalmente expostas a picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV. Para isso, galinhas (n=40) foram randomicamente distribuídas em cinco casas no povoado de Cavunge e mantidas nestas residências por um período de oito meses. A cada dois meses foram realizadas coletas de sangue dessas aves para detecção dos níveis séricos de anticorpos IgY anti-SGS por ELISA e *Western Blot*.

A terceira abordagem consistiu em verificar a possibilidade de utilização de proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* em substituição ao SGS. a partir da construção de curvas ROC (Receiver Operator Characteristic). As duas proteínas recombinantes utilizadas nesta etapa (LJM11 e LJM17) foram previamente selecionadas a partir de um screening de reconhecimento de quatro proteínas através de *Dot blots* feitos com soros de galinhas picadas por *L. longipalpis*. Os pontos de corte para o estabelecimento de *cut-off*, bem como a avaliação das proteínas recombinantes como marcadores de exposição em substituição ao SGS foram estabelecidas a partir da construção de curvas ROC (Receiver Operator Characteristic).

Na terceira abordagem, foi verificada a reatividade cruzada de proteínas totais e recombinantes da saliva de *L. longipalpis* (SGS, rLJM11 e rLJM17) em soros de galinhas expostas a *L. longipalpis* e outras espécies de artrópodes vetores como *Aedes aegypti* e triatomíneos. O objetivo foi validar, em aves, um marcador de exposição específico para o *L. longipalpis* que não fosse reconhecido por outras espécies de insetos vetores.

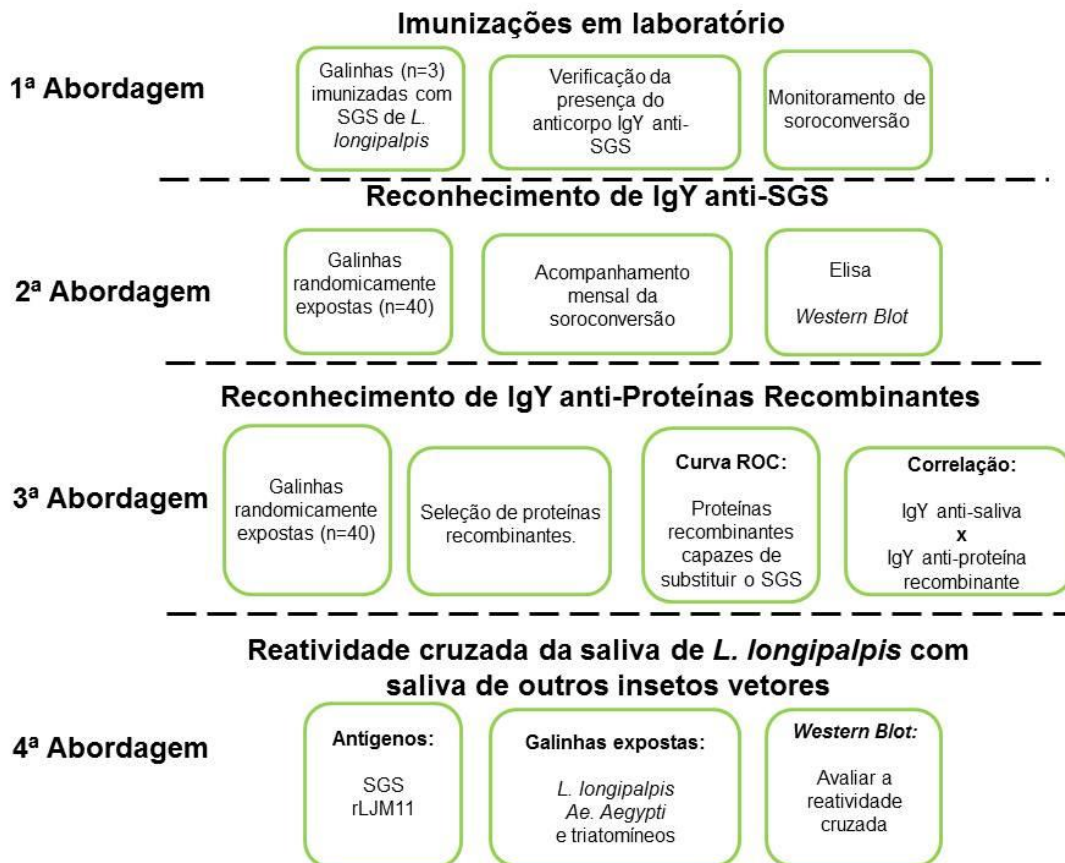


Figura 1. Fluxograma do Estudo. Na 1º abordagem, as galinhas foram imunizadas com SGS. Na 2ª abordagem, as galinhas foram randomicamente dispostas em área endêmica para LV para monitoramento da soroconversão para o SGS. Na 3ª abordagem, o soro destas aves foi utilizado para discriminação de possíveis proteínas recombinantes da saliva da *L. longipalpis*. Na 4ª abordagem, verificou-se a reatividade cruzada de antígenos salivares da *L. longipalpis* no reconhecimento de soros de galinhas expostas a flebotomíneos e outros vetores.

3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O povoado de Cavunge (12.3 ° Sul e 39.3° Oeste) pertence ao município de Ipecaetá, semi-árido baiano, que dista 168 Km de Salvador e 57 Km de Feira de Santana. De acordo com estudo seccional de base populacional realizado no ano de 2010, a população de referência é de 1.185 pessoas, com idades entre 7 dias e 95 anos. A localidade possui área dimensionada em 369,883 Km² no semi-árido baiano e foi escolhida para o estudo por ser uma área de transmissão ativa de LV. Para introdução das galinhas nesta área e realização deste estudo, cinco residências localizadas no distrito foram identificadas e selecionadas pela equipe realizadora deste projeto.

3.3 OBTENÇÃO E COLONIZAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos foram coletados em Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia. Para as capturas foram utilizados armadilhas do tipo C.D.C.- Centers for Diseases Control Light Trap (Sudia e Chamberlain, 1962), as quais foram colocadas ao entardecer e retiradas logo após o amanhecer. Essas armadilhas foram colocadas no peri-domicílio. Os flebotomíneos capturados foram mantidos em gaiolas específicas e receberam dieta de solução açucarada 50% (em pequenos chumaços de algodões), sendo acondicionados em caixas de isopor com chumaços úmidos de algodão, necessários para manter uma umidade alta até chegarem ao Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa 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 é rotineiramente utilizado pelo insetário para a colonização de flebotomíneos. Neste, hamsters previamente anestesiados com uma associação de Xilasina 10mg/Kg + Ketamina 200mg/Kg (misturados em uma mesma seringa), por via intra peritoneal, foram colocados nas gaiolas para alimentação das fêmeas durante 40-60 minutos. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram colocadas em potes para ovoposição 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 a fase de inseto adulto. As condições de temperatura e umidade relativa do insetário são 24°C e 80%, respectivamente. Os insetos adultos obtidos a partir da colonização foram utilizados para extração da glândula salivar.

3.4 OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Glândulas salivares de fêmeas adultas de *L. longipalpis* em jejum sanguíneo mantidas apenas com solução açucarada por cerca de 5 dias (após a eclosão) foram extraídas sob uma lupa, com auxílio de pinça e estiletos entomológicos. As glândulas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo solução salina e armazenadas a -70° C até o momento do uso. Antes da 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 foram mantidas resfriadas durante todo o processo e após a sonicação 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).

3.5 IMUNIZAÇÃO DAS AVES

Galinhas (*Gallusgallus*) com aproximadamente 25 semanas de idade foram obtidas de uma granja no município de Santo Estevão- Bahia. Estas foram imunizadas com 50 μ g de SGS (Sonicado de Glândula Salivar) de *L. longipalpis*. Para as imunizações, de saliva foi ressuspenso em 500 μ L de PBS (Tampão fosfato salina, pH 7.4) misturado a um igual volume de adjuvante completo de *Freund's*. A mistura antígeno-adjuvante após homogeneização foi inoculada no músculo peitoral das galinhas. O esquema de imunização incluiu mais duas doses do homogeneizado (SGS) com o adjuvante incompleto nas concentrações citadas acima, com intervalos de 15 dias. No total foram realizadas 3 imunizações e, o sangue foi coletado antes e após cada imunização para acompanhamento da soroconversão.

3.6 INSERÇÃO DAS GALINHAS EM ÁREA ENDÊMICA

Para avaliar a soroconversão contra antígenos salivares da *L. longipalpis*, galinhas (n=40) provenientes de uma granja do município de Santo Estevão foram randomicamente distribuídas em peridomicílios de residências (n=5) em Cavunge, área endêmica para LV. A escolha dos domicílios onde as aves foram inseridas e acompanhadas foi realizada de acordo com resultados prévios de capturas de flebotomíneos obtidos neste mesmo local por nossa equipe. Durante oito meses, sempre após avaliar a abundância vetorial, o sangue destas aves foi coletado para análise de soroconversão contra o anticorpo IgY anti-saliva.

3.7 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA SALIVA DE *L. LONGIPALPIS*

As proteínas recombinantes da saliva do *L. longipalpis* (LJM11, LJM17, LJM19 e LJM111) foram produzidas pelo Dr. Jesus Valenzuela (NIH, USA), que possui estreita colaboração com o nosso grupo de pesquisa. Os métodos utilizados na clonagem e expressão destas proteínas estão descritos em Teixeira e colaboradores (2010).

3.8 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE DOT BLOT

A identificação das proteínas recombinantes reconhecidas pelo soro de galinhas expostas naturalmente à picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV, foi realizada através de *Dot Blot*. Para a realização da técnica, a membrana de nitrocelulose foi recortada e posta em placa de 6 poços para a realização das incubações. Proteínas da glândula salivar do vetor *L. longipalpis* (5 pares) e das recombinantes candidatas (1 μ g) foram transferidas para membranas de nitrocelulose em um volume aproximado de 10 μ L. As membranas contendo os antígenos foram bloqueadas com PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado durante 2 horas à 37° C. Após 3 ciclos de lavagem com PBS Tween 0,05%, com duração de 5 minutos cada, os soros na diluição 1:50 foram incubados em PBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado, durante 2 horas a 37°C. Em seguida foram realizadas três lavagens e adicionado o segundo anticorpo (IgY anti-Chicken conjugado a fosfatase alcalina – SIGMA) na diluição de 1: 1000, durante uma hora a 37°C. Após três séries de lavagens, a membrana foi revelada com o substrato para fosfatase alcalina (Western Blue - Promega).

3.9 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SGS E ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR ELISA

Os anticorpos anti-SGS e anti-proteínas recombinantes presente nos soros das galinhas foram detectados através do ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com SGS de *L. longipalpis*, aproximadamente 5 μ g / ml de proteína salivares, ou com 1 μ g /mL de cada proteína recombinante (usadas isoladamente ou em combinação) em tampão carbonato (NaHCO₃ 0,45M, Na₂CO₃ 0,02 M, pH 9,6) durante a noite a 4°C. Após três lavagens com PBS-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com

PBS Tween 0,05%, mais 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Os soros foram diluídos (1:100) com PBS-Tween 0,05%, mais 5% de leite desnatado e incubados por uma hora a 37°C. Os poços foram lavados 5 vezes e, em seguida, incubados com IgY anti-Chicken conjugado a fosfatase alcalina – SIGMA, na diluição 1:5000, por uma hora, à 37°C. Novamente, as placas foram lavadas e reveladas com uma solução cromogênica composta por p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9.6 mais 1mg/mL de MgCl₂ durante 30 minutos. As concentrações de saliva ou proteínas recombinantes utilizadas foram determinadas em um experimento de dose-resposta para avaliar um sinal ótimo sem perder a sensibilidade. Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. Os experimentos sorológicos foram repetidos duas vezes obtendo-se resultados semelhantes. Foi realizado estudo cego para os testes sorológicos com proteínas recombinantes e SGS.

3.10 IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE PROTEÍNAS SALIVARES POR *WESTERN BLOT*

Para o reconhecimento sorológico de proteínas totais da saliva da *L. longipalpis* assim como de proteínas recombinantes específicas (LJM11 e LJM17), foi utilizada a técnica de *Western blot*, adaptando-se a metodologia descrita por Teixeira e colaboradores (2010) e Schwarz e colaboradores (2009).

Proteínas salivares de *L. longipalpis* foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Para a eletroforese foi utilizado o equivalente a 1 µg de SGS para cada µl, sendo usado um total de 12 µl de amostra em canaleta. Para as proteínas recombinantes de saliva foi utilizado cerca de 8 µg de proteína por poço em gel de acrilamida a 12%. As proteínas do SGS e recombinantes foram desnaturadas durante 3 minutos a 95°, em seguida as amostras foram carregadas por poço. A eletroforese teve duração de 30 minutos com voltagem inicial de 60 V para o gel concentrador e 40 minutos com 120V para o gel separador. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose usando trans-blot Invitrogen a 200 mA durante 1,5 horas. Após a transferência a membrana foi corada com Vermelho Ponceau, em seguida lavada com PBST 0,05% e bloqueada por 2 horas com PBST 0,05% e leite desnatado 5% à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes e incubada com os soros de galinha diluído (1:10) em PBST 0,05% e 5% de leite desnatado. A membrana foi novamente lavada e incubada com o anticorpo IgY anti-chicken Sigma diluído na proporção de (1:1000) em PBST 0,05% e 5% de leite desnatado em temperatura ambiente. Após uma hora de incubação a membrana foi

novamente lavada e revelada com a adição de Western Blue, substrato conjugado a fosfatase alcalina-Promega. Após 3 minutos a reação foi interrompida pela lavagem da membrana com água destilada.

Como controle positivo, foram usados soros de galinhas expostas a picadas de flebotomíneos em área endêmica para LV. Estas galinhas foram usadas como fonte de alimentação para esses vetores e possuíam altos títulos de anticorpos anti-SGS. Soro de galinhas de área não endêmica, por sua vez, foi usado como controle negativo.

Para avaliar a especificidade do reconhecimento da saliva da *L. longipalpis* por *western blot*, foram cedidas pelo Técnico Gilmar Ribeiro do Insetário de Triatomíneos do LPBM (Laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular) soros de galinhas expostas a uma colônia de *Aedes aegypti* e a diversas colônias de triatomíneos (*Triatoma dimidiata*, *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius palecens*, e *Rhodnius prolixus*)

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad software Prisma 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Os dados sobre os níveis de anticorpos antes e após a soroconversão para SGS foram comparados através do teste pareado de Friedman. O teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas estimando, assim, as diferenças de valores entre as densidades ópticas (DO) das imunizações em laboratório. As análises de soroconversão entre o mês 0 e mês 8 foi avaliada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon com pós teste Dunn. As curvas ROC foram utilizadas para estabelecer os valores de *cut-off* com base na identificação dos valores de sorologia que apresentaram uma maior sensibilidade e especificidade na predição de positividade anti-SGS. As análises de correlação entre os títulos de anticorpos contra o SGS e contra a proteína recombinante LJM11 foram controladas por meio do teste não paramétrico de Spearman. Em todos os casos, os valores apresentaram diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPERIMENTALMENTE IMUNIZADAS COM SGS DE *L. LONGIPALPIS*

O desenvolvimento de anticorpos contra antígenos salivares da *L. longipalpis* em galinhas foi avaliado a partir de imunizações experimentais em laboratório utilizando o SGS dessa espécie de flebotomíneo. Observamos que as galinhas imunizadas apresentaram altos níveis de anticorpos IgY anti-SGS e esta produção foi estatisticamente significativa entre a primeira e a terceira imunização (Figura 2). Esses resultados indicam que galinhas são capazes de soroconverter contra antígenos da saliva da *L. longipalpis*.

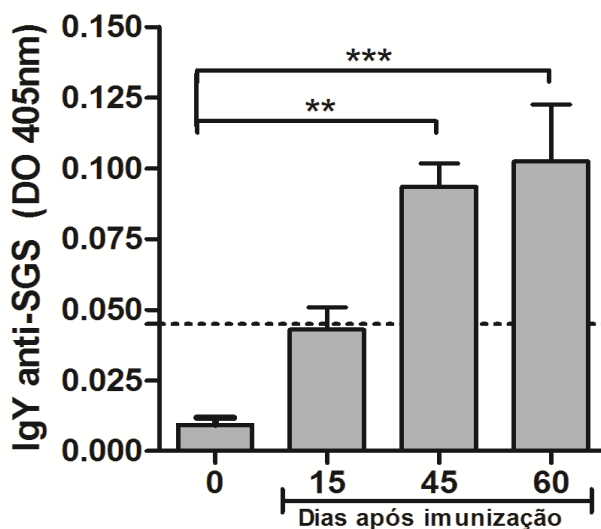


Figura 2. Soroconversão de galinhas imunizadas com o SGS de *L. longipalpis*. Galinhas foram imunizadas três vezes com o SGS de *L. longipalpis*. Após imunização as mesmas foram acompanhadas para a soroconversão contra o SGS através de ELISA. Os dados apresentam a média e o erro padrão da média de experimentos realizados com três galinhas. Asterisco representa diferenças estatisticamente significantes calculadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

4.2 SOROCONVERSÃO DE GALINHAS EXPOSTAS NATURALMENTE A PICADAS DE *L. LONGIPALPIS* EM ÁREA ENDÊMICA PARA LV

A partir de observações da soroconversão de galinhas experimentalmente imunizadas com o SGS de *L. longipalpis* resolvemos avaliar o desenvolvimento do anticorpo IgY anti-saliva em galinhas naturalmente exposta à picadas da *L. longipalpis* em área endêmica para LV em um período de 8 meses. Ao mensurar os níveis séricos destes anticorpos, observamos um aumento gradual e significativo nos títulos de anticorpos IgY anti-saliva de *L. longipalpis* à partir do quarto mês de exposição (Figura 3). Antes da exposição (mês 0) as galinhas variaram suas densidades ópticas (DO) entre 0.001 a 0.025. Após quatro meses de exposição, 26% destas soroconverteram e a partir do sexto mês 100% se tornaram positivas com DOs entre 0.089 e 0.175 (Figura 3). O aumento da DOs após oito meses de exposição foi de 2,7X sobre o valor do *cut-off*. Em conjunto, esses dados confirmam que galinhas submetidas naturalmente a picadas da *L. longipalpis* são capazes de soroconverter à partir do quarto mês de exposição em área endêmica para LV.

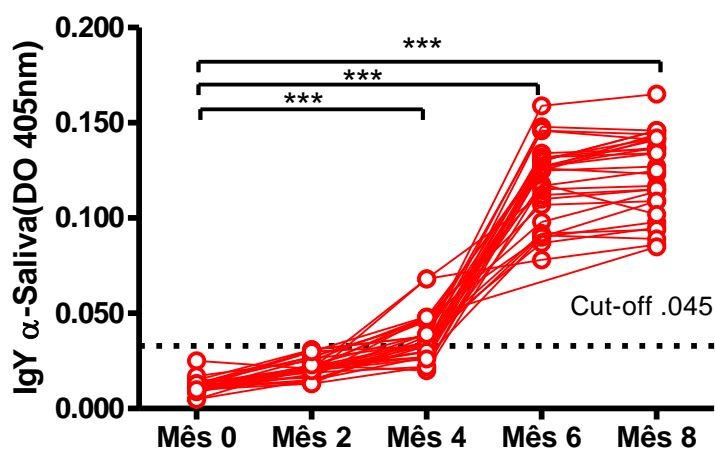


Figura 3. Soroconversão de galinhas expostas à picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV. Galinhas (n=40) naturalmente expostas a picadas de flebotomíneos *L. Longipalpis* no período de 8 meses em área endêmica foram avaliadas para a produção de anticorpo IgY anti-saliva por ELISA. Dados apresentam a densidade óptica para cada galinha no período avaliado. Diferenças foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. Asterisco representa diferenças estatisticamente significantes ($p^{***} \leq 0.0001$).

Nosso próximo passo foi avaliar a especificidade do anticorpo IgY anti-saliva no reconhecimento de proteínas totais da saliva de *L. longipalpis*, por Western blot. Para isso,

foram utilizados soros de galinhas naturalmente expostas à flebotomíneos em área endêmica para LV. Nossos resultados indicaram que apenas um subconjunto de proteínas foi identificado, sendo reveladas oito proteínas que possuíam reconhecimento específico nos soros das galinhas (Figura 4). Esse reconhecimento foi progressivo, conforme observado na Figura 4, e os pesos moleculares destas proteínas estão indicados na Tabela 1. As proteínas identificadas com maior reatividade apresentaram peso molecular similar às proteínas pertencentes à família *yellow*, 5' nucleotidase e às proteínas com peso molecular de 71 e 79 KDa, ainda desconhecidas na saliva de *L. longipalpis*.

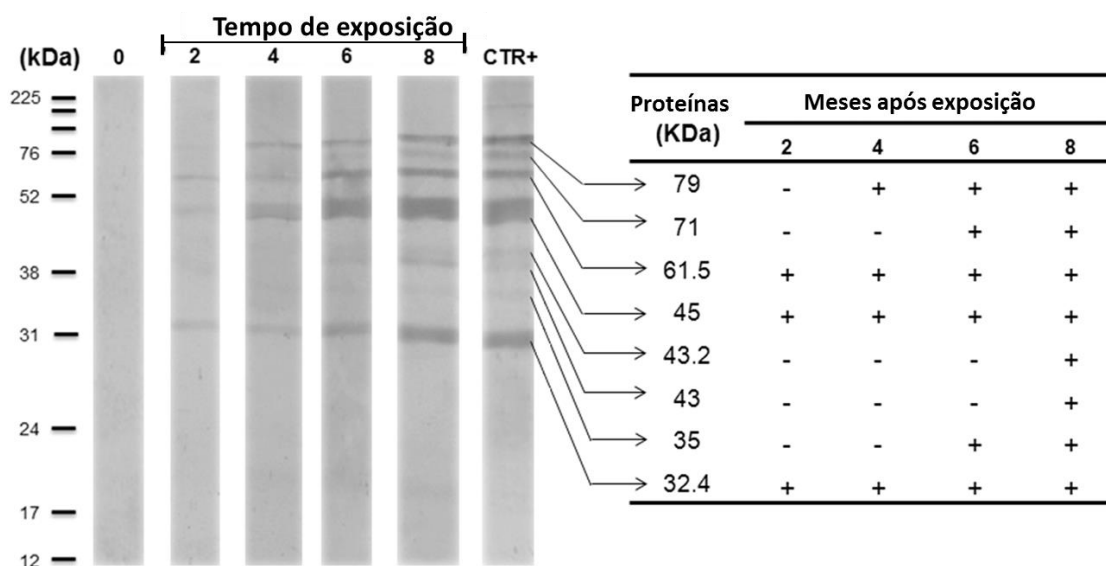


Figura 4. Proteínas salivares reconhecidas por soro de galinhas expostas a picadas de *L. longipalpis*. O reconhecimento das proteínas da saliva da *L. longipalpis* em pools de soros de galinhas (n=5) expostas naturalmente a picadas deste vetor foi demonstrado por Imunoblot. Como controle positivo (+) foi utilizado soro de galinha de alta exposição mantida em área endêmica para captura de flebotomíneos. Como controle negativo foi utilizado soro de ave de área não endêmica para Leishmaniose.

Testes sorológicos anti-*Leishmania* também foram realizados durante o período de exposição das aves em área endêmica, porém estas não foram capazes de desenvolver uma resposta imune IgY anti-leishmania.

4.3 ANÁLISE DA SOROCONVERSÃO DE GALINHAS UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTE DA SALIVA DA *L. LONGIPALPIS*

A partir dos resultados obtidos após a análise de soroconversão das galinhas para as proteínas totais da saliva de *L. longipalpis*, nossa próxima etapa buscou avaliar a soroconversão para proteínas recombinantes específicas da saliva de *L. longipalpis*. Primeiramente, através de Dot blot, foi possível identificar as proteínas recombinantes reconhecidas em soro de galinhas expostas a estes vetores em área endêmica para LV. Entre as cinco proteínas recombinantes utilizadas como antígeno a serem reconhecidos pelos soros destas aves (LJM11, LJM17, LJM111, LJM143 e LJM19), uma maior reatividade foi observada apenas para as proteínas recombinantes LJM11 e LJM17 (dados não mostrados). Em seguida, os soros destas galinhas expostas também foram testados para o reconhecimento das proteínas recombinantes LJM11 e LJM17 por *Western Blot* e observamos que estas aves são capazes de reconhecer tais antígenos (Figura 5).

Para analisar a soroconversão para os antígenos salivares recombinantes LJM11 e LJM17 nas galinhas expostas a picadas em área endêmica, realizamos testes sorológicos para níveis de anticorpos anti-proteínas recombinantes da saliva da *L. longipalpis*. Os resultados apresentaram médias de DOs após a soroconversão de $0,140 \pm 0,070$ com *cut off* 0,026 para a proteína rLJM11; $0,076 \pm 0,079$ com *cut off* 0,040 para a LJM17 e média de $0,143 \pm 0,050$ com *cut off* 0,035 para as ambas as proteínas LJM11 e LJM17 conjugadas, demonstrando que existe uma resposta específica para esses antígenos salivares (Figura 6).

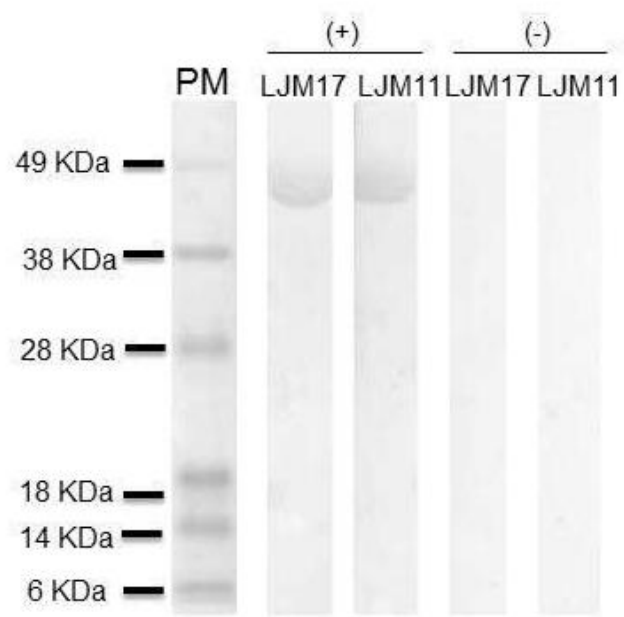


Figura 5. Detecção de proteínas recombinantes da saliva da *L. longipalpis* em soros de galinhas. Soro de galinhas naturalmente expostas a picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV foram usados para identificação das proteínas recombinantes salivares LJM11 e LJM17 por *Western Blot*. Soro de galinha de alta exposição mantida em área endêmica para captura de flebotomíneos foi utilizado como controle positivo (+) e como controle negativo (-) foi utilizado soro de ave de área não endêmica para Leishmaniose.

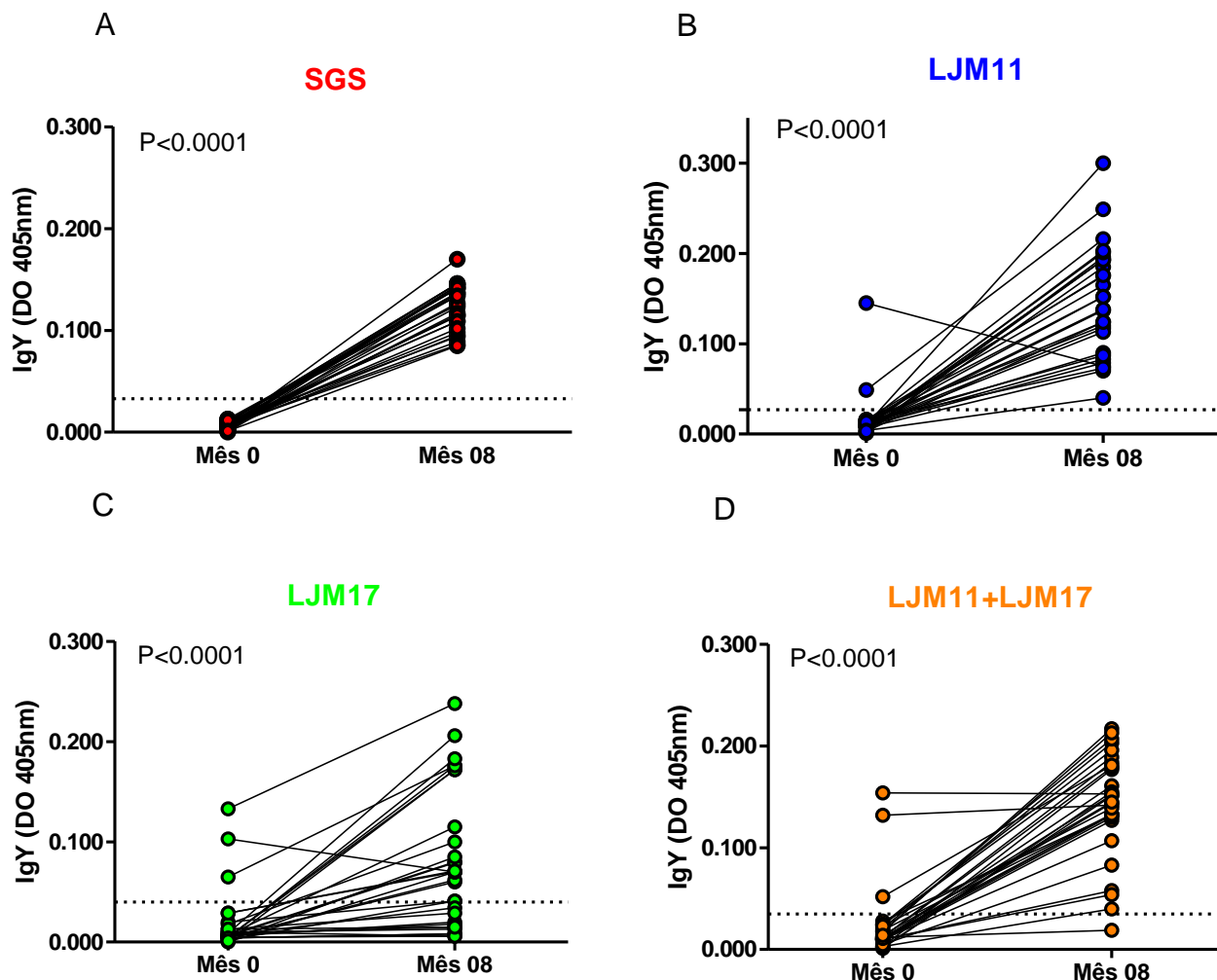


Figura 6. Soroconversão para as proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* em galinhas expostas à picadas em área endêmica para LV. Soro de galinhas (n=40) foram testados, por ELISA, para a presença de anticorpos IgY antes (mês 0) e após oito meses (mês 8) de exposição a picadas de *L. longipalpis*. Para análise foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon com pós-teste Dunn. (A) Detecção de anticorpos IgY anti-SGS (*cut-off* 0.045). (B, C e D) Anticorpos IgY anti-LJM11 (*cut-off* 0.026) (B), anti-LJM17 (*cut-off* 0.040) (C) e anti-LJM11+LJM17 (*cut-off* 0.035) (D).

A partir da construção das curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic*) foi possível avaliar o desempenho dos antígenos recombinantes da saliva de *L. longipalpis* em comparação ao SGS para discriminar galinhas que soroconverteram de galinhas que não soroconverteram (Figura 7). Além disso, confirmamos os valores de *cut-off*, combinando melhores níveis de sensibilidade e especificidade a partir do maior índice de probabilidade de discriminação estabelecido pela curva (Figura 7). Quando comparados os níveis de IgY do soro das aves expostas a picadas de flebotomíneos e aves não expostas através das curvas ROC,

o SGS, padrão ouro, obteve a melhor performance observada (AUC: 1; $p < 0,0001$), seguido da proteína rLJM11 (AUC: 0,9606; $p < 0,0001$). Quando analisado o desempenho dos antígenos conjugados LJM11 e LJM17 (AUC: 0,9575; $p < 0,0001$) foi observado que estas proteínas aumentaram a sensibilidade e especificidade somente quando comparadas com a LJM17, a qual apresentou menor desempenho quando comparada com a LJM11 e LJM11+LJM17, conforme evidenciado pela redução nos valores dos parâmetros testados (AUC: 0,8173; $p < 0,0001$) (Figura 7).

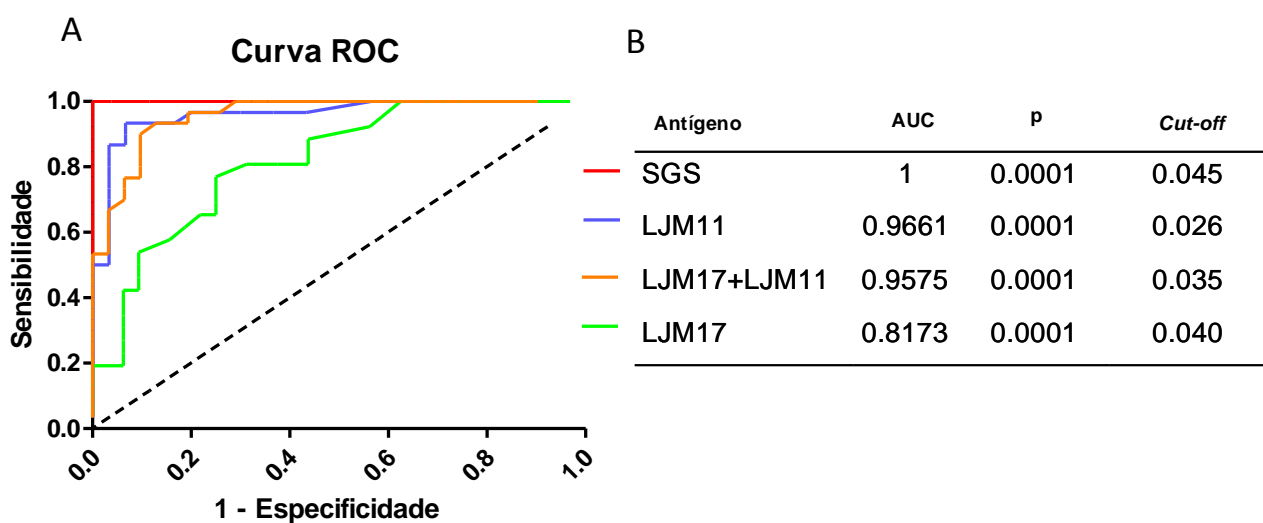


Figura 7. Curvas ROC dos níveis de anticorpos para previsão da positividade contra proteínas totais e recombinantes da saliva de *L. longipalpis*. (A) As curvas ROC foram construídas utilizando os dados relativos aos níveis séricos de anticorpos de galinhas que soroconverteram contra antígenos totais de glândula salivar (n= 40). Para controle negativo, foram utilizados soro das mesmas galinhas no mês 0. (B) Informações detalhadas obtidas de cada curva ROC (área sob a curva - AUC, os valores de p e valores de *cut-off* escolhidos) são mostradas na tabela acima.

Buscando confirmar a efetividade dos antígenos salivares recombinantes como possíveis marcadores para exposição ao *L. longipalpis*, foi avaliada a acurácia de cada um dos antígenos estudados, a partir das análises obtidas pela curva ROC (Tabela 1). Para isso, foram combinados os valores de especificidade e sensibilidade para calcular a razão preditiva positiva [RP(+)] e a razão preditiva negativa [RP(-)]. A RP(+) aponta que tanto a LJM11 sozinha quanto conjugada com a LJM17 (LJM11+LJM17) obtiveram RP(+) de 13,99 e 9,2, respectivamente, apresentando-se como melhores antígenos para identificação da exposição ao *L. longipalpis*. A RP(-) apresentada pela LJM11 sozinha e conjugada (LJM11+LJM17) foram

de 0,07 e 0,11, respectivamente. Por outro lado, a proteína recombinante LJM17 não obteve bom desempenho discriminado em ambos os testes [RP(+) e RP(-)] (Tabela 1).

Tabela 1. Acurácia dos antígenos SGS, LJM11, LJM17 e LJM11+LJM17 no reconhecimento de soros de galinhas expostas a picadas de *L. longipalpis* em área endêmica para LV obtida através de testes de ELISA.

Antígeno		Valores de DO				Acurácia			
		Min	Max	Média DO (SD)10 ³	Cut-off	Sens.	Specif.	RP (+)	RP (-)
SGS	Pré exposição	0	0,029	0,014 (29)	0,045	1	0,9032	10,33	0
	Pós exposição	0,029	0,238	0,076 (69)					
LJM11	Pré exposição	0,003	0,154	0,015 (25)	0,026	0,933	0,933	13,99	0,07
	Pós exposição	0,019	0,249	0,140 (70)					
LJM17	Pré exposição	0,002	0,133	0,019 (37)	0,040	0,8065	0,7097	2,77	0,27
	Pós exposição	0,008	0,206	0,076 (69)					
LJM11+LJM17	Pré exposição	0,001	0,132	0,018 (34)	0,035	0,900	0,903	9,2	0,11
	Pós exposição	0,040	0,217	0,143 (50)					

Após a observação de que a saliva da *L. longipalpis* e a proteína recombinante LJM11 podem atuar como marcadores biológicos e epidemiológicos de exposição a estes vetores em área endêmica para LV, a proteína LJM11 foi testada como antígeno substituto no reconhecimento de anticorpos anti-saliva, através de análise de correlação de Spearman. Nesta, os níveis de anticorpos IgY anti-SGS e LJM11 mensurados exibiram uma correlação positiva mediana (Spearman $r= 0,422$, $p<0,01$; Figura 8).

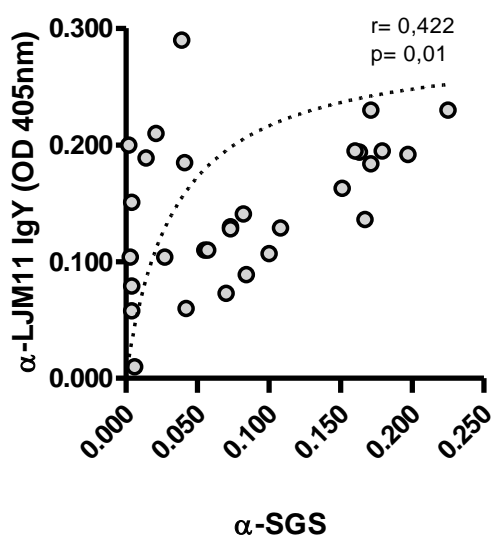


Figura 8. Correlação entre os níveis de anticorpos IgY anti-SGS e IgY anti- LJM11. Os níveis de anticorpos IgY anti-saliva e IgY anti-LJM11 exibidos pelas galinhas (n=40) foram correlacionados, resultando em uma associação mediana. Os dados foram analisados usando o teste de Spearman e, os valores de r e p estão plotados no gráfico.

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE ANTICORPOS IGY ANTI-SALIVA COM DENSIDADE FLEBOTOMÍNICA NA ÁREA ENDÊMICA PARA LV

Para mensurar o número de flebotomíneos que infestavam as casas escolhidas para o estudo em Cavunge, área endêmica para LV, foram realizadas capturas peridomiciliares mensais. O total de flebótomos capturados durante oito meses em cada residência constituíram a densidade flebotomínica no local (Figura 9). A partir dos dados de densidade vetorial, foi realizada a sobreposição dos níveis de anticorpos IgY anti-saliva detectados em galinhas após oito meses de exposição (Figura 9A), sugerindo a ausência de correlação entre os níveis de anticorpos e densidade vetorial após esse período de exposição. De fato, quando aplicado um teste de correlação de Spearman, foi comprovada a ausência de correlação positiva entre densidade flebotomínica e a média dos anticorpos anti-saliva detectados nas galinhas após o período de oito meses (Spearman $R=0,500$ com $p \leq 0.45$). Porém ao analisar temporalmente a dinâmica da relação dos níveis de anticorpos anti-saliva apresentados pelas galinhas expostas durante oito meses com a infestação por flebotomíneos no mesmo local, pudemos observar que independente dos níveis de vetores encontrados, após quatro meses galinhas mantêm constantes os níveis de anticorpos (Figura 9 B, C, D, E e F).

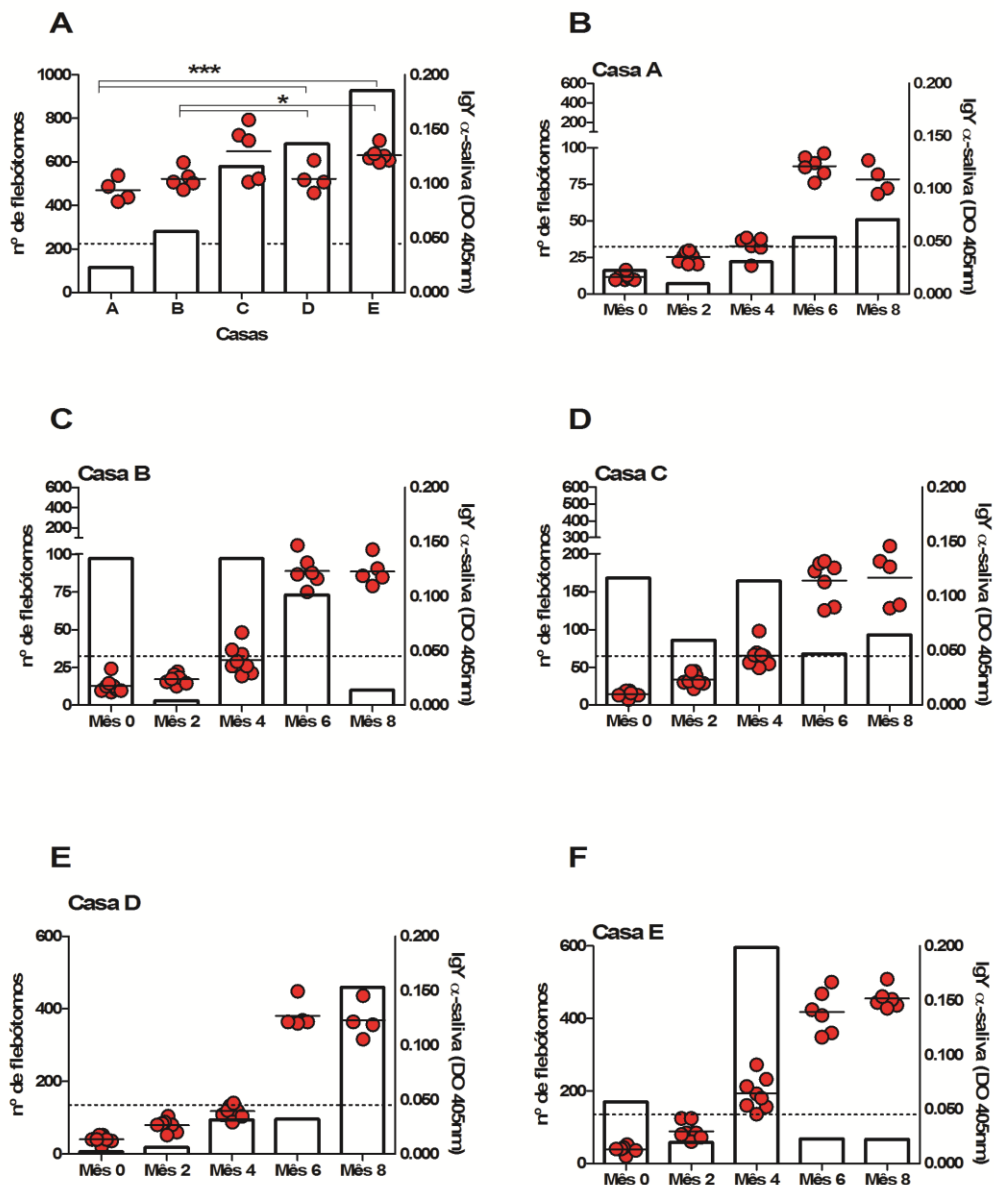


Figura 9. Densidade flebotomíca e títulos de anticorpos exibidos pelas galinhas em área endêmica para LV. Os gráficos demonstram o número de flebotomos capturados (representado por barras) e os níveis de anticorpos IgY anti-saliva em galinhas (representado por círculos) ao longo de oito meses nas residências escolhidas para o estudo. Após oito meses, foram mensurados os níveis de anticorpos apresentados pelas galinhas e avaliada a densidade de flebotomos presentes no local estudado. Para análise estatística foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, onde * representa $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ (A). Os demais gráficos demonstram temporalmente a dinâmica de soroconversão associada com a densidade de vetores em cada casa em que as galinhas foram inseridas.

4.5 ESPECIFICIDADE NO RECONHECIMENTO DA SALIVA TOTAL DA *L. LONGIPALPIS*.

Devido à variabilidade da imunogenicidade de antígenos salivares de vetores artrópodes, nós avaliamos a reatividade cruzada de proteínas da saliva de *L. longipalpis* em soros de galinhas expostas a picadas de triatomíneos e *Aedes aegypti*. Na avaliação da especificidade do reconhecimento de proteínas totais da saliva de flebotomíneos, através do *Western blot*, observamos que somente galinhas expostas a triatomíneos foram capazes de reconhecer os antígenos salivares com os pesos moleculares aproximados de 61 e 79 KDa (Figura 10).

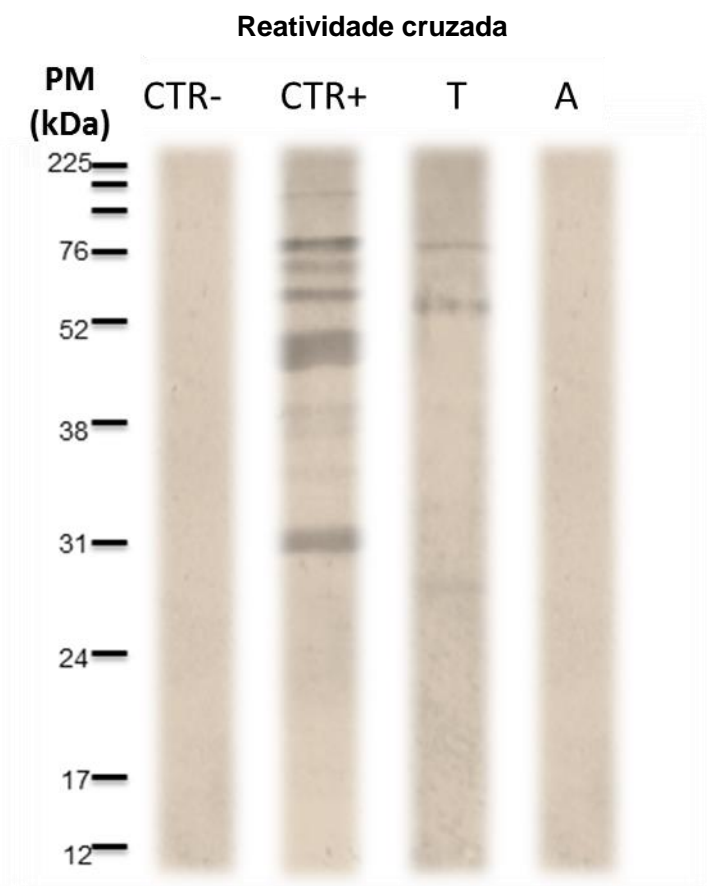


Figura 10. Especificidade no reconhecimento de proteínas totais da saliva da *L. longipalpis* entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos. Pool de soros de galinhas expostas a picadas de diversas espécies de triatomíneos (A) e *Ae. Aegypti* (B) foram testados para verificação de reatividade cruzada com saliva total do flebotomíneo *L. longipalpis*. Como controle negativo foram utilizados soros de galinhas de área não endêmica (-) e como controle positivo soro de galinhas de alta exposição utilizada como fonte alimentar para captura de flebotomíneos em área endêmica para LV (+).

Após verificar a existência de reatividade cruzada de duas proteínas da saliva de *L. longipalpis* (61 e 79 KDa) por soros de galinhas picadas por barbeiros, testamos a ausência de

reatividade cruzada da proteína recombinante LJM11, já que a mesma apresenta peso molecular estimado de 43 kDa. Os resultados encontrados evidenciam que não existe reatividade cruzada, sugerindo assim que a proteína recombinante LJM11 pode ser utilizada como marcador de exposição confiável a ser utilizado em estudos epidemiológicos em área endêmica para LV (Figura 11).

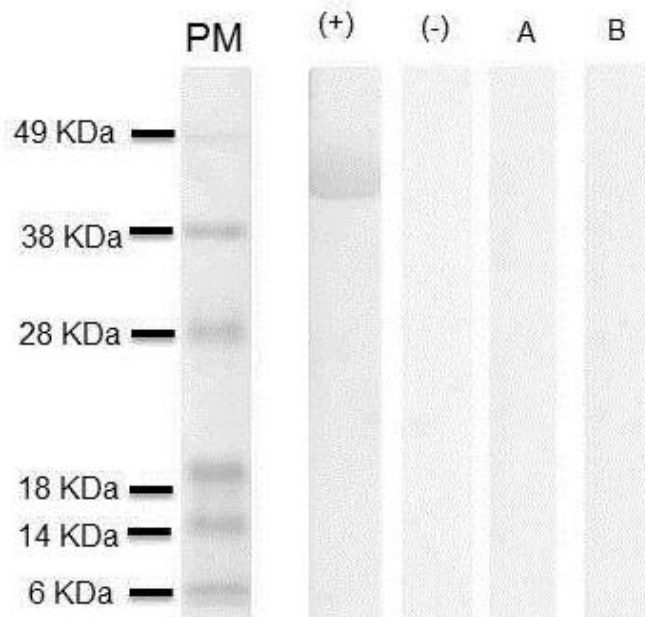


Figura 11. Especificidade no reconhecimento da proteína recombinante LJM11 da saliva da *L. longipalpis* entre galinhas expostas a outros vetores artrópodes hematófagos. Pool de soros de galinhas expostas a picadas de diversas espécies de triatomíneos (A) e *Ae. Aegypti*(B) foram testados para verificação de reatividade cruzada com a LJM11. Como controle negativo foram utilizados soros de galinhas de área não endêmica (-) e como controle positivo soro de galinhas de alta exposição utilizada para captura de flebotomíneos em área endêmica para LV (+).

5 DISCUSSÃO

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

Em testes realizados com armadilhas e compostos de feromônios sexuais, foi demonstrado que flebotomos machos também possuem papel importante na alimentação e perpetuação da espécie. Estes para atrair as fêmeas precisam liberar feromônios sexuais que alcançam curtas distâncias e são dependentes da volatilização. A volatilização destes compostos é otimizada com aumento de temperatura. O macho para realizar o acasalamento, encontra no hospedeiro um aliado, além da associação de feromônios com temperatura corpórea das aves (41°C) favorecendo a volatilização, galináceos possuem odor característico e alta emissão de CO₂, auxiliando a propagação dos feromônios por distâncias mais longas e auxiliando a orientação das fêmeas para realização da alimentação sanguínea (PETERS et al., 1983 e BRAY et al., 2010). Por constituir forte atrativo para vetores e/ou facilidade destes em se alimentarem, aves são usadas como sentinela em diversos estudos para monitoramento de transmissão de doenças (Komar, et al., 2001). Para a realização deste trabalho foi avaliado o papel de galinhas como sentinela para presença de vetores em área endêmica para LV, buscando a possibilidade de correlação entre os níveis séricos de anticorpos IgY anti-saliva com a densidade vetorial na área em estudo.

Para avaliar o papel da galinha como sentinela em detecção da presença de flebotomíneos em área endêmica para LV, foram realizados testes sorológicos para verificar o desenvolvimento

do anticorpo anti-saliva nestes animais. Inicialmente foram realizadas imunizações intramuscular (IM) com SGS e adjuvante, nesta etapa foi possível induzir experimentalmente a produção de anticorpos IgY anti-SGS, constatando que após a imunização com SGS de *L. longipalpis*, a soroconversão ocorre gradativamente. Após a primeira imunização os níveis de anticorpos permaneceram equivalentes com o valor do *cut-off*, ocorrendo a soroconversão somente a partir da segunda imunização. As diferenças estatisticamente significativas ocorreram entre a primeira e demais imunizações, não havendo diferenças entre a segunda e a terceira. Em estudo realizado a partir de imunizações IM em galinhas com proteínas do WNV foi demonstrado que estas são capazes de produzir altos níveis de IgY anti-WNV, porém o aumento nas taxas de anticorpos só pôde ser observado a partir de uma segunda imunização (ORTH et al., 2009).

Após confirmar a presença de anticorpos IgY anti-SGS em aves imunizadas experimentalmente, quarenta galinhas foram inseridas em Cavunge, área endêmica para LV. Apesar de galináceos não se infectarem por leishmania, pudemos avaliar a sua capacidade em desenvolver uma resposta imune IgY anti-Leishmania. Os resultados sorológicos anti-Leishmania após oito meses de exposição demonstraram que galinhas não são capazes de desenvolver anticorpos contra o agente etiológico da LV. OTRANTO e colaboradores (2010) ao observarem galinhas provenientes do campo, constataram que estas não possuíam anticorpos anti-Leishmania, sendo capazes de desenvolver anticorpos somente quando inoculadas com 5×10^7 promastigotas de *Leishmania infantum*. Neste estudo, a soroconversão foi atribuída à alta concentração de parasitas e uso do adjuvante no inóculo quando comparado com doses utilizadas habitualmente em imunizações e infecções experimentais. Anteriormente, já havia sido demonstrado que galinhas também são capazes de destruir o tripanossomatídeo *T. cruzi*. Neste trabalho o autor comparou a sobrevivência de tripomastigotas na corrente sanguínea injetada por via normal e com o complemento inativado. Os experimentos com complemento inativado prolongou por pelo menos 24 horas o tempo de sobrevivência desses parasitas, concluindo que a sobrevivência do *T. cruzi* é dependente da ação do complemento (KIERSZENBAUM et al., 1976). Além dos fatores celulares e humorais envolvidos na destruição do parasita, a alta temperatura corporal (41°C) também pode ser prejudicial ao desenvolvimento das tripomastigotas, sendo demonstrado em 1973 por BAKER e McCONNELL que estes parasitas são termossensíveis, porém o efeito de temperaturas como 41°C em culturas de *T. cruzi* ainda não foi estudada com detalhe.

Além dos mecanismos anti-hemostáticos já descritos no início deste trabalho, a saliva dos flebotomíneos também é capaz de induzir a produção de anticorpos anti-saliva. Ao avaliar a

oroconversão contra proteínas salivares em galinhas expostas naturalmente a picadas da *L.longipalpis*, notou-se que a detecção destes anticorpos ocorreu a partir do quarto mês de exposição em área endêmica. O efeito de anticorpos anti-saliva já havia sido avaliado em hamsters expostos a picada de *Phlebotomus argentipes*, nos quais se observou altos títulos de anticorpos anti-componetes da saliva (GHOSH e MUKHOPADHYAY, 1998). Dessa maneira, em estudos realizados com indivíduos residentes em área endêmica para LV é sugerido que a presença de anticorpos anti-saliva seja resultado da exposição natural à picada de flebotomíneo, o que pode influenciar na epidemiologia da doença (BARRAL et al., 2000). BELKAID e colaboradores (1998) observaram no modelo murino que a pré-exposição ao sonicado da glândula salivar (SGS) levou a produção de anticorpos anti-saliva capazes de neutralizar a capacidade do lisado em exacerbar a infecção. A resposta IgY anti-saliva avaliada neste estudos é considerada tardia quando comparadas com respostas imunes geradas por galinhas expostas a triatomíneos, onde dois dias após uma única exposição em área endêmica, o equivalente a cinco barbeiros, é possível detectar uma resposta precoce com baixas DOs contra seus antígenos salivares (SCHWARZ et al., 2009). Em concordância, Vinhas e colaboradores em 2007 verificaram que uma única exposição a flebotomos foi o suficiente para induzir em indivíduos voluntários uma resposta IgG anti-SGS. e que, após duas exposições esta resposta tornou-se mais evidente elevando a mediana das DOs IgG anti-SGS. Estes achados nos leva a concluir que a exposição regular e frequente de galinhas a saliva dos vetores da LV, assim como outros hospedeiros vertebrados, mantem elevados os níveis de anticorpos IgY anti-saliva.

Para confirmar a especificidade da resposta IgY anti-saliva nestas mesmas aves, foi feito um *western blot* utilizando a saliva total da *L. longipalpis*. Apesar da diversidade das proteínas salivares, nossos resultados indicaram que apenas oito possuem reconhecimento específico por soros das galinhas naturalmente imunizadas. O experimento mostrou que o reconhecimento pelas proteínas totais da saliva acontece gradativamente, de acordo com o tempo de exposição, sendo caracterizadas como mais imunogênicas as proteínas da família yellow, a 32.4 kDa seguidas pelas proteínas apirase 35kDa, 5' nucleotidase 61,5kDa e proteína desconhecida com peso de 79 kDa. Estes achados corroboram os trabalhos de TEIXEIRA e colaboradores em 2010, quando verificou que indivíduos e cães de uma área endêmica no nordeste do Brasil reconheceram as proteínas da família yellow e apirase. Também em 2010, SOUZA e colaboradores verificaram a exposição de indivíduos aos vetores da LV, constatando a existência de uma resposta imune anti-SGS da *L. longipalpis*, mais especificamente, o reconhecimento pelas proteínas da família yellow.

Para verificar a exposição natural à saliva de insetos vetores, a grande maioria dos trabalhos científicos são realizados com sorologias em humanos, porém, a utilização de sorologias humanas em área de transmissão deve ser realizada para verificação de incidência de uma doença. Estudos desta natureza possuem limitações quanto ao uso dos dados etendem a possíveis vieses, como por exemplo, a dificuldade em determinar o real local da infecção devido a facilidade em se locomover por longas distâncias em um curto período de tempo (KWAN *et al.*, 2010). Assim para monitoramento de áreas de transmissão de LV a utilização de galinhas como sentinela não traz problemas éticos tão pouco risco a população local, pois estas são incapazes de se infectar por *leishmania*, podendo indicar os “verdadeiros territórios criadouros de vetores”, tendo em vista que galinhas não alcançam longas distâncias do local de criação. Estas, além de auxiliar no monitoramento de áreas de transmissão, são capazes de soroconverter em um curto período de tempo, sendo reportado por KWAN e colaboradores em 2010 que aves sentinelas positivas para WNV são possíveis indicadores de casos humanos, sendo relatados como temporalmente concordantes os casos. A mesma associação foi observada em outra área de atividade do WNV onde o *Culex quinquefasciatus* foi o principal vetor tangencial (PALMISANO *et al.*, 2005). Portanto, estudos epidemiológicos com o modelo de ave sentinela são inovadores em substituição ao modelo humano podendo ser útil para implementação de programas de controle de vigilância epidemiológica (KWAN *et al.*, 2010).

A identificação das taxas de exposição de hospedeiros vertebrados a vetores pode ser constatada em diversos trabalhos científicos em áreas endêmicas (BARRAL *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002; SCHWARZ *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2012 e TEIXEIRA *et al.*, 2010) e estes, normalmente utilizam como antígeno a saliva total do inseto vetor como marcador de exposição. Experimentos desta natureza são laboriosos, pois necessitam de grandes quantidades deste antígeno bruto, o que vem a ser um fator limitante devido a dificuldades técnicas na obtenção e dissecação de flebotomos para extração das glândulas. Estudos epidemiológicos de grande extensão tendem a ser prejudicados não apenas pelas limitações na obtenção dos antígenos brutos, mas também pela variação da concentração dos constituintes moleculares da glândula, o que certamente pode vir a ser um viés de análise. A partir dos perfis de reconhecimento dos antígenos pela espécie hospedeira é possível desenvolver proteínas recombinantes isoladas com alta imunogenicidade a fim de substituir o uso da saliva total (SCHWARTZ *et al.*, 1991 e SCHWARZ *et al.*, 2009b). Dentre as vantagens da utilização de antígenos recombinantes em relação a antígenos brutos são que os recombinantes podem ser produzidos em grandes quantidades, além de permitir testes sorológicos altamente reprodutíveis e

mais confiáveis em relação às concentrações de antígenos utilizadas (SOUZA *et al.*, 2010, SCHWARZ *et al.*, 2009b). Em trabalhos pioneiros utilizando proteínas recombinantes de saliva em substituição ao SGS, BARRAL e colaboradores (2000) testaram a antigenicidade do maxadilina (6,5 kDa) de *L. longipalpis* em soros de indivíduos de uma área endêmica, como método alternativo para a substituição da saliva total. Nestes testes, foi verificada uma correlação positiva com títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, entretanto não houve correlação com a resposta contra homogenado da saliva total, o que levou a crer que essa proteína isolada não se aplica como uma potencial candidata à utilização em estudos desta natureza. Na literatura já foi demonstrado que em flebotomíneos as proteínas salivares mais estudadas e consideradas como potenciais marcadores de exposição pertencem a família *yellow*, onde estudos experimentais com apenas uma proteína isolada desta família, a LJM11, foi capaz de conferir proteção para LV (GOMES *et al.*, 2008). A LJM11, já é descrita como a proteína isolada da saliva da *L. longipalpis* mais reconhecida quando realizados estudos epidemiológicos em zonas endêmicas. Esta proteína foi capaz de prever positividade contra antígenos salivares de *L. longipalpis* em cães e crianças residentes em área endêmica no Maranhão, sendo verificado que os valores de DO foram semelhantes ao padrão observado para anti-SGS (SOUZA *et al.*, 2010 e TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Para avaliar o reconhecimento de proteínas recombinantes da saliva da *L. longipalpis*, o presente estudo mostrou que soro de galinhas expostas a este vetor reconhecem cinco proteínas recombinantes testadas por *dot blot* (LJM11, LJM19, LJM17, LJM111 e LJM143). Depois de confirmado o reconhecimento específico pelas proteínas da família *yellow*, foram utilizadas nas etapas seguintes as proteínas recombinantes LJM11 e LJM17. Os testes sorológicos através de ELISA anti-LJM11 e anti-LJM17 constituíram uma ferramenta poderosa para a detecção específica de exposição ao vetor da LV em áreas endêmicas, indicando um aumento significativo na DO das aves nos tempos entre zero a oito meses de exposição, sendo capazes de identificar soroconversão em galinhas expostas a picadas da *L. longipalpis*. Os valores de DO quando usadas proteínas recombinantes foram superiores quando comparados com uso de SGS como antígeno. A utilização da LJM17 significou em DOs mais baixas, gerando mais falsos negativos (40%), e também falsos positivos (7,5%). Quando usadas conjugadas LJM11+LJM17 o número de falsos negativos foi reduzido e, o teste sorológico realizado apenas com a LJM11 teve um número reduzido de falsos positivos, não havendo falsos negativos. Estes dados concordam com os achados de SCHWARZ e colaboradores em 2009 e SOUZA e colaboradores 2010 que, ao utilizarem proteína recombinante da saliva de vetores artrópodes para verificar a exposição de

hospedeiros vertebrados ao vetor verificaram que as DOs obtidas eram superiores às obtidas com uso da saliva total.

Em análises feitas por curva ROC também foi avaliada a eficácia do uso das proteínas recombinantes através do teste de ELISA para prever a soroconversão anti-saliva. A combinação das proteínas recombinantes LJM11+LJM17, assim como a utilização da LJM11 isoladamente aumentou a eficácia do teste em relação ao LJM17. A eficácia foi estimada através de uma maior área sob a curva. Assim, os testes sorológicos utilizando o antígeno recombinante salivar LJM11 são adequados para discriminar galinhas que foram expostas à saliva da *L. longipalpis*. A viabilidade da utilização destes antígenos recombinantes também foi avaliada por acurácia e comparada com o antígeno “padrão ouro”, o SGS. A substituição do SGS pela LJM11 tem sua eficácia demonstrada pela curva ROC, RPP e RPN. As evidências sobre a acurácia de um teste são baseadas em sensibilidade, especificidade e curva ROC para apontar em acurácia perfeita indivíduos expostos e/ou não expostos. Portanto o método diagnóstico utilizando a LJM11 foi capaz de reconhecer e classificar galinhas expostas e galinhas não expostas, levando a uma produção de resultados com menor possibilidade de vieses, confirmando a LJM11 como um antígeno candidato para marcador de exposição à *L. longipalpis*. Em estudo similar realizado com 1077 indivíduos de uma área endêmica do Maranhão foi demonstrado que as proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* LJM11 e LJM17 são capazes de substituir a utilização do SGS. Ao validar a utilização destas proteínas o autor verificou que a combinação dos antígenos LJM11 e LJM17 poderia aumentar a especificidade em até 91% (SOUZA et al., 2010). Buscando confirmar a eficácia da LJM11, esta proteína também foi avaliada em correlação com o SGS. O teste estatístico de Spearman foi aplicado entre as DOs anti-LJM11 e anti-saliva obtidas após o oitavo mês de exposição. O teste de correlação aplicado foi positivo, demonstrando que a LJM11 parece ser um marcador confiável para detectar galinhas expostas a picadas da *L. longipalpis*. Estes achados corroboram os trabalhos de SCHWARZ e colaboradores em 2009 quando verificaram que a proteína recombinante da saliva de triatomíneos também é um marcador adequado para detecção de pequenas infestações de diferentes espécies de triatomíneo, podendo ser utilizada como uma ferramenta para controle de áreas infestadas. Em concordância, SOUZA e colaboradores (2010) também demonstraram correlação positiva entre antígenos brutos e recombinantes capazes de reconhecer soros positivos de indivíduos expostos em área endêmica para LV com alta sensibilidade e especificidade, mantendo um perfil de reconhecimento sorológico muito semelhante ao do SGS. Entretanto, para validar os dados encontrados no presente estudo é necessário repetir os experimentos aumentando o número de galinhas além de

testar o uso da LJM11 em outras áreas de transmissão para leishmaniose em que o *L. longipalpis* não seja o vetor.

A avaliação da densidade vetorial neste estudo, foi temporalmente concordante com o tempo de permanência das galinhas em área endêmica e esta não pôde ser correlacionada com as taxas de anticorpos IgY anti-saliva detectados nas mesmas. Os gráficos sobrepostos indicam uma correlação muito fraca, não sendo possível associar a densidade de vetores aos níveis de anticorpos gerados pelas aves. Porém, estes achados evidenciam que no quarto mês onde 26% destas galinhas soroconvertem, a proporção de soroconversão pode ser relacionada com a densidade de flebotomos e, após seis meses 100% fazem a soroconversão independentemente do número de flebotomíneos capturados, mantendo elevados os níveis de anticorpos IgY anti-saliva. VINHAS e colaboradores em 2007 verificaram que uma única exposição a aproximadamente trinta flebotomos em voluntários normais foi o suficiente para induzir uma resposta IgG anti-SGS e que, após duas exposições esta resposta tornou-se mais evidente elevando os títulos de IgG anti-SGS. Estes achados levam a concluir que a exposição regular e frequente de galinhas a saliva dos vetores da LV mantém elevados os níveis de anticorpos IgY anti-saliva. SCHWARZ e colaboradores (2009a) verificaram que a resposta imune gerada por galinhas expostas em área endêmica a triatomíneos podem ser utilizadas como biomarcador de exposição ao vetor, sendo possível estimar níveis de infestação de acordo com a titulação de anticorpos mensurada, constituindo uma ferramenta ideal para reconhecimento de áreas infestadas por barbeiros. Apesar de galinhas serem consideradas sentinelas ideais por não se infectarem por *Leishmania* estas também são consideradas como fator de risco em áreas de transmissão de leishmanioses, visto que são responsáveis pela manutenção da população de vetores e atração de animais que são reservatórios para o ambiente do peridomicílio (ALEXANDER et al., 2002).

Após testar a resposta imune de galinhas contra componentes totais da saliva do flebotomíneo *L. longipalpis* e a especificidade de suas proteínas recombinantes para prever exposição em área endêmica para LV, analisamos a reatividade cruzada em soro de galinhas expostas a picadas de outros vetores não flebotomíneos. Em estudos anteriores Teixeira e colaboradores em 2010 e SOUZA e colaboradores (2010) já haviam testado as proteínas recombinantes LJM11 e LJM17 para verificar reatividade cruzada em soros de indivíduos expostos em área de leishmaniose cutânea (LC), concluindo que indivíduos residentes em área de LC não são capazes de reconhecer antígenos salivares do vetor da LV. Em nosso estudo, verificamos que antígenos totais da saliva de *L. longipalpis* também podem ser reconhecidos por aves expostas a triatomíneos, o reconhecimento cruzado é observado nas proteínas de 61 e 79

KDa. De acordo com NASCIMENTO e colaboradores (2001) e BARBOSA e colaboradores (2004) alguns antígenos salivares de insetos vetores são compartilhados e podem ser reconhecidos entre diferentes espécies hospedeiras, como a proteína de 79 kDa precursora da apirase, membro da família 5'-nucleotidase e inibidora da agregação plaquetária que é reconhecida por coelhos, cobaias e humanos expostos a outras espécies vetores. Devido a variabilidade na imunogenicidade de antígenos salivares compartilhados entre insetos vetores é importante identificar proteínas isoladas que provoquem uma resposta de anticorpos específica, independentemente da espécie vetora. Para isso, também testamos a especificidade da proteína recombinante LJM11. Tendo em vista que esta foi a proteína com maior reconhecimento em soros de galinhas expostas ao *L. longipalpis* e que o seu peso molecular é equivalente a 43kDa, a LJM11 foi testada através de um *western blot* para afastar a existência de reatividade cruzada. Apesar das proteínas da família *yellow* estarem presentes na saliva de quase todos os artrópodes, a LJM11 não foi reconhecida por soros de aves expostas a vetores não flebotomíneos, sendo consideradas bons marcadores de exposição aos vetores da LV. A identificação destes perfis de bandas não reconhecidas por aves expostas a outros insetos vetores, trazem como perspectiva o uso de proteínas recombinantes, pois estas são capazes de causar uma resposta previsível na população hospedeira e predizer infestações vetoriais em áreas endêmicas (SCHWARZ et al.,2009b).

Em resumo,o presente trabalho possui relevância uma vez que galinhas são criadas em abundância em peridomicílios de áreas endêmicas para LV e são capazes de desenvolver anticorpos IgY anti-saliva, detectando assim possíveis áreas de transmissão. Além disso, ficou evidente que o uso da proteína recombinante LJM11 também foi capaz de discriminar galinhas expostas a picadas da *L. longipalpis*. Esta proteína recombinante quando testada para verificação de reatividade cruzada, demonstrou ser um antígeno confiável, pois, além de gerar respostas similares ao padrão SGS não foi reconhecida por soro de galinhas expostas a outros vetores.

6 CONCLUSÃO

A galinha (*Gallusgallus*) é capaz de desenvolver anticorpos IgY anti-SGS e anti-proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis*, sugerindo que estes animais podem ser considerados como sentinelas para detectar a presença destes vetores em área endêmica para LV. Com isso, a utilização da proteína recombinante LJM11 traz como perspectiva a sua utilização para monitoramento de áreas de transmissão, sendo considerada uma ferramenta de alerta sobre o risco de exposição ao flebotomíneo *L. longipalpis* e consequente risco para a transmissão da LV.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Infect. Dis.**, v. 8, p. 1480-1485, 2002.
- ALEXANDER, B.; USMA, M.C. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n.5, p. 543-549, 1994.
- ANDRADE, B. B.; TEIXEIRA, C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An. Acad. Bras. Ciên.**,v. 77,p. 665-693, 2005.
- ANÔNIMO **Weekly Disease Information and Handi-status II**. World Organization for Animal Health (OIE), 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 22 set 2011.
- ARIAS, J. R. et al. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 6, p. 108-198, 1985.
- BAKER, J. R.; MCCONNELL, E. Strains of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei* spp. isolated in Ethiopia from *Glossina tachinoides* and *Trageluphus scriptus*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**,v. 67, p.153-154, 1973.
- BARBOSA, S. E.; DIOTAIUTI, L.; BRAGA, E. M.; PEREIRA, M. H. Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Acta Trop.**,v. 92, p. 25–33, 2004.
- BARRAL, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.62, n.6, p.740-745, 2000.
- BASANOVA, A. V.; BASKOVA, I. P.; ZAVALOVA, L.L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry** v. 67, p. 143-150, 2002.
- BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania* major infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.** v. 188, n. 10, p. 1941-1953, 1998.
- BIRTLES, R. J. Carrión's disease. The Enciclop. **Arthrop-Transmit. Inctions**. s.d, p. 6-104. 2001.
- BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao Estudo dos insetos**. São Paulo: USP. 653p, 1969.
- BOWMAN, A. S. et al. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, n. 3, p. 85-277, 1977.

- BRAY, D. P. et al. Research Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. **Paras. Vect.**, v. 3, p. 16, 2010.
- BUCKLEY, A. et al. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 2807–2817, 2003.
- CALDAS, A. J. M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 1-8, 2001.
- CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: UFPR, 228 p. 1991.
- CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.** v. 34, n. 4-5, p. 7-221, 2005.
- CHAMPAGNE, D. E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitol. Tod.**, v. 10, p. 430-433, 1994.
- CORNELIE, S. et al. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae*. **Afr. Childr. Malar. J.**, v. 6, p. 75, 2007.
- COSTA, C. H. N. et al. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde Públ.**, v. 24, n. 5, 1990.
- DEANE, L. **Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. 1956. 161 f.. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Serviço Nacional de Educação Sanitária. Fortaleza, 1956.
- DIAS, F. O. P., LOROSA, E. S., REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Públ.**, v. 16, n. 1, p. 217-218, 2003.
- FORATINE, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1973. v. 4. 658p.
- FREEMAN, B. M. **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academ Press, 1984.
- GHOSH, K.; MUKHOPADHYAY, J. The effect of antisaliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 275-281, 1998.
- GOMES, R. B. et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 2, p. 127-133, 2007.
- GOMES, R. B. et al. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J Infect Dis**, v.186, n.10, p.1530-1534. 2002.
- GOMES, R., et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 105, p. 7845–7850, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3 p. 12, 2004.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis, **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p.1191-1199, 1999.

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

KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J. e BUDZKO, D. B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. **Immunology**, v. 30, p. 1-6, 1976.

KILLICK-KENDRICK, R. Prefácio. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p.11-12.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 65, p. 37-42, 1990.

KOMAR, N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 951, p. 58-73, 2001.

KWAN, J. L., et al. Sentinel Chicken Seroconversions Track Tangential Transmission of West Nile Virus to Humans in the Greater Los Angeles Area of California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 5, p. 1137-1145, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, E. D. A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. 116 p.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 27-811, 2005.

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

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence oh tripanosomiasis in India. 1903. **Natl. Med. J. India**, v. 7, n. 4, p. 196-200, 1994.

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

LEWIS, D. J. Phlebotomid sandflies. **Bull. World Health Org.**, v. 44, p. 535-551, 1971.

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

- MELBY, P. C. et al. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infec. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 18-27, 1998.
- MENEZES, M. J. et al. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BMC Immunol.**, v. 9, 2008.
- MORO, O.; LERNER, E. A. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 2, p. , 272:966-970, 1997.
- NASCIMENTO, R. J., et al.. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 219–226, 2001.
- NERY, L. C. R.; LOROSA, E. S.; FRANCO, A. M. R. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae. Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 571-574, 2004.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. 524p.
- OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; et al. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v.24, n. 9, 2008.
- ORLANDI-PRADINES, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1454–1462, 2007.
- ORTH, F. A. C.; et al. Oral and parenteral immunization of chickens (*Gallus gallus*) against west Nile vírus with recombinant envelop protein. **Ave Disease**, v. 53, n. 4, p. 502-509, 2009.
- OTRANTO, D., et al. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Trop.**, v. 113, p. 80–83, 2010.
- PALMISANO, C. T. et al. Impact of West Nile virus outbreak upon St. Tammany Parish Mosquito Abatement District. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 21, p. 33–38, 2005.
- PETERS, R. H. **The ecological implications of body size**. Cambridge (MA): Cambridge: Univ. Press, 1983.
- POINSIGNON, A. Human/Vector relationships during Human African Trypanosomiasis: Initial Biomarker *An.gambiae* Exposure screening of immunogenic salivary proteins of *Glossina* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 327–333, 2007.
- RACLOZ, V.; GRIOT, C. E. ; STA, R. K. K. D. C. Sentinel surveillance systems with special focus on vector-borne diseases. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 7, n. 1/2, p. 71–79, 2007.

- RANGEL, E. F. e VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 24, n. 12, p. 52, 2008.
- REISEN, W. K; et al. Repeated West Nile Virus Epidemic Transmission in Kern County, California, 2004–2007. **J. Med. Entomol.**, v. 46, p. 139–157, 2009.
- RIBEIRO, J. M. C.; VACHEREAU, A.; MODI, G. B.; TESH, R.B. A novel vasodilatory peptide from salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**, v. 243, p. 212–214, 1989.
- RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, v. 4, p. 143–152, 1995.
- RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463–478, 1987.
- RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M., Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 48, p. 73-88, 2003.
- RIBEIRO, J. M. C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J. A. Purification and characterization of proxilín S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem. J.**, v. 308, p. 243-249, 1995.
- RIBEIRO, J. M.; MANS, B. J.; ANDARCA, B. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p.767–784, 2010.
- RODRIGUE, S. A. C. et al. Criação peridomiciliar de galináceos aumenta o risco de leishmaniose visceral humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p.12–13, 1999.
- ROHOUSOVA, I.; OZENSOY, S.; OZBEL Y.; VOLF, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, v. 5, p. 493-499, 2005a.
- ROHOUSOVA, I.; VOLF, P.; LIPOLDOVA, M. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. **Parasite Immunol.**, v. 27, p. 469–473, 2005b.
- ROHOUSOVA, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitol.**, v. 53, p. 161–171, 2006.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 69, n. 1, p. 3-100, 1989.
- SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, n. 8, p. 71-755, 2001.
- SCHWARTZ, B. S. et al. Anti-ticksaliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. **Am. J. Epidemiol.**, v. 134, p. 86–95, 1991.

- SCHWARZ, A., et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, p. 1021–1029, 2009a.
- SCHWARZ, A., et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e532. <<http://doi:10.1371/journal.pntd.0000532>. 2009b>.
- SCOTT, P.; FARREL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chem. Immunol., S.I.**, v. 70, p. 60-80, 1998.
- SHAZIA, S. M.; PAUL, D. R. No recent adaptive selection on the apyrase of Mediterranean *Phlebotomus*: implications for using salivary peptides to vaccinate against canine leishmaniasis. *Evolutionary Applications*. Department of Entomology, **Nat. Hist. Mus**, v. 5, n. 3, 2011.
- SILVA, F. S. et al. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 94-98, 2005.
- SOUZA, A. P., et al. Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. (Usando Proteínas Recombinantes da Saliva de *Lutzomyia longipalpis* para Estimar a Exposição Humana ao Vetor numa Área Endêmica de Leishmaniose Visceral). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 2010.
- STARK, K. R.; JAMES, A. A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 20802-20809, 1998.
- TEIXEIRA, C., et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, p. e638, 2010.
- TEIXEIRA, C.; et al. Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, p. 18-23, 2005.
- TEODORO, U.; KÜHL, J. B.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v.15, n. 4, 1999.
- TESH, R. B. The genus *Phlebovirus* and its vectors. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 33, p. 81-169, 1988.
- TESH, R. B. et al. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sand flies as determined by precipitin test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, p. 150-156, 1971.
- 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.**, v. 15, p. 481-487, 1993.

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

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitol. Tod.**, v. 6, p. 157-160, 1990.

VALENZUELA, J. G. et al. Identification of the most abundant secret proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia Longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 3717-3729, 2004.

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

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

VOLF, P. et al. Molecular crosstalks in Leishmania-sandfly-host relationships. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 43-237, 2008.

WALTERS, L. L. et al. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 3, p. 295-317, 1989.

WARD M. P., et al. Infection of cattle with bluetongue viruses in Queensland, Australia: results of a sentinel herd study, 1990–1992. **Vet. Microbiol.**, v. 45, p. 35–44, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 2010.

XIMENES, M. F.; et al.. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.37, n.1, p.162-169, 2000.

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