



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A
SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NUMA ÁREA
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

REGIS BERNARDO BRANDIM GOMES

**Salvador - Bahia - Brasil
2001**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

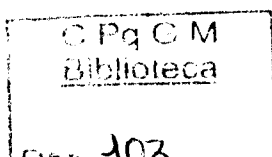
**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A SALIVA
DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NUMA ÁREA ENDÊMICA
DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Regis Bernardo Brandim Gomes

Orientadora : Aldina Barral

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

**Salvador-Bahia
2001**



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

Gomes, Regis Bernardo Brandim

G633a Avaliação da produção de anticorpos contra a saliva de *Lutzomyia longipalpis* em crianças numa área endêmica de Leishmaniose visceral / Regis Bernardo Brandim Gomes. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2001.
57p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Federal da Bahia, 2001.

1. Leishmania donovani chagasi. 2. Anticorpos. 3. Lutzomyia. 4. Hipersensibilidade tardia. I. Título.

CDU

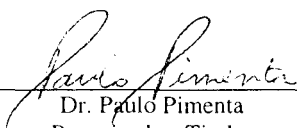
616.993.161:612.313

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A SALIVA DE *Lutzomyia longipalpis* EM CRIANÇAS NUMA ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL.

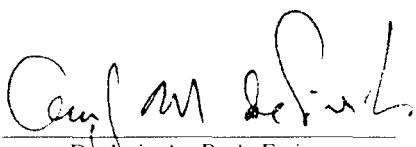
REGIS BERNARDO BRANDIM GOMES

FOLHA DE APROVAÇÃO

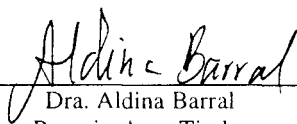
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Pimenta
Pesquisador Titular
CPqRR / FIOCRUZ



Dr. Luiz A. R. de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dra. Aldina Barral
Pesquisadora Titular
CPqGM / FIOCRUZ

***“O heroísmo tem nos sertões, para todo
sempre perdidas, tragédias
espantosas”.***

Euclides da Cunha.

Para o Pai, a Mãe, o Zé Renato, o JP e o Paulino Neto.

Para o professor Carlos Costa.

AGRADECIMENTOS

A professora **Aldina Barral** pela orientação, incentivo e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor **Manoel Barral-Netto** pelos os ensinamentos e sugestões durante o desenvolvimento desta tese.

A **Arlene Caldas e Jackson Costa** pelo grande trabalho desenvolvido na área endêmica no estado do Maranhão.

A professora **Cláudia Ida Brodskyn** pelos ensinamentos na fase final do trabalho.

A **Vera Vinhas** pelo auxílio técnico nos experimentos com os isotipos.

Aos pesquisadores **José Marcos C. Ribeiro e Jesus Valenzuela** (NIH-USA) pela colaboração, consultoria e fornecimento do material indispensável para a realização deste trabalho.

A **Clarissa R. Teixeira** pela companhia, incentivo e sugestões.

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

Ao curso de **Pós-graduação em Patologia**, na pessoa do coordenador e professor **Luis Antônio R. Freitas**.

A **todos os professores e funcionários** do CPqGM/UFBA pelos ensinamentos e colaboração no dia-a-dia das aulas e experimentos no centro.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente durante o desenvolvimento do projeto:

A todos os colegas do LIP e LIM/CPqGM.

José Carlos Miranda e a turma do insetário .

Rosália na secretaria do curso da pós-graduação.

Ana Fiscina e todas as funcionárias da biblioteca.

Todo o pessoal da portaria e segurança.

Vinhas pelo cafezinho nos momentos de descanso.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL.....	3
1.2.1 Considerações gerais.....	3
1.2.2 Resposta Imune na Leishmaniose Visceral.....	5
1.2.3 <i>Lutzomyia longipalpis</i> (filó Arthropoda): O vetor.....	7
1.3 O PAPEL DA SALIVA DE VETORES ARTRÓPODES NA TRANSMISSÃO PARASITÁRIA.....	9
1.3.1 Componentes da saliva dos vetores artrópodes.....	9
1.3.2 Saliva de flebotomíneos e leishmanioses.....	12
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 JUSTIFICATIVA.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Soros utilizados no estudo.....	20
4.2 Considerações éticas.....	21
4.3 Antígenos.....	21
4.4 ELISA para detectar anticorpos (IgG total) anti-saliva de <i>L. longipalpis</i> , <i>Phlebotomus papatasi</i> e <i>Lutzomyia whitmani</i>	22

4.5	ELISA para detectar suclases de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) anti-saliva de <i>L. longipalpis</i>	22
4.6	ELISA para detectar anticorpos do isotipo IgE anti-saliva de <i>L. longipalpis</i>	23
4.6.1	Preparo do RF.....	23
4.6.2	ELISA para detecção de IgE.....	24
4.7	Western blots.....	24
4.8	Análise estatística.....	25
5	RESULTADOS.....	26
5.1	Determinação dos grupos controles.....	26
5.2	IgG contra lisado de glândula salivar de <i>L. longipalpis</i>	26
5.3	IgG1, IgG3 e IgG4 contra lisado de glândula salivar de <i>L. longipalpis</i>	27
5.4	IgE contra lisado de glândula salivar de <i>L. longipalpis</i>	28
5.5	IgG contra lisado de glândula salivar de <i>P. papatasi</i> e <i>L. whitmani</i>	28
5.6	Western blottings indicando IgG contra antígenos da glândula salivar de <i>L. longipalpis</i>	29
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÕES.....	45
8	BIBLIOGRAFIA.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP:** Adenosina difosfato
- AMP:** Adenosina monofosfato
- AIDS:** Síndrome da imunodeficiência adquirida
- DTH:** Teste de hipersensibilidade tardia (Delayed Type Hypersensitivity)
- DNA:** Ácido desoxiribonucléico
- DO:** Densidade Óptica
- ELISA:** Ensaio imunoenzimático (Enzyme Immunosorbent Assay)
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN:** Interferon
- IL:** Interleucina
- Ig:** Imunoglobulina
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- LV:** Leishmaniose Visceral
- NO:** Óxido Nítrico
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
- PGE:** Prostaglandina
- PBS:** Tampão salina fosfato (Phosphate Buffer Saline)
- SP-15:** Proteína com peso molecular de 15 quilodaltons
- S+:** Sorologia anti-*Leishmania* positiva
- S-:** Sorologia anti-*Leishmania* negativa
- Th:** Linfócito T auxiliador (T helper)
- TNF:** Fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor)
- KDa:** Quilodalto
- WHO:** Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Orelhas de camundongos Balb/c e C57BL/6, utilizadas no experimento com glândula salivar de flebótomo e *Leishmania major*.....14
- Figura 2:** Anticorpos IgG contra glândula salivar de *L. longipalpis*. Soros de indivíduos de área (NE) não endêmica, endêmica e (S+DTH+) controles positivos.....30
- Figura 3:** Anticorpos IgG contra a glândula salivar de *L. longipalpis*. Indivíduos que tiveram ELISA e DTH negativos e que, seis meses depois foram agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania*: (A) S+ DTH+, (B) S+ DTH-, (C) S- DTH+ e (D) S- DTH-.....31
- Figura 4:** Anticorpos IgG1 contra a glândula salivar de *L. longipalpis*.....32
- Figura 5:** Anticorpos (A) IgG3, (B) IgG4 e (C) IgE contra glândula salivar de *L. longipalpis*.....33
- Figura 6:** Anticorpos IgG contra glândula salivar de (A) *Phlebotomus papatasi* e (B) *Lutzomyia whitmani*.....34
- Figura 7:** Western blot indicando IgG humano contra antígenos da glândula salivar de *L. longipalpis*.....35

RESUMO

Avaliação da produção de anticorpos contra a saliva de *Lutzomyia longipalpis* em crianças numa área endêmica de Leishmaniose Visceral. REGIS BERNARDO BRANDIM GOMES. Pessoas que vivem numa área endêmica de Leishmaniose Visceral apresentam anticorpos anti-saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Nós avaliamos IgG total assim como as subclasses IgG1, IgG3, IgG4 e IgE contra o lisado de glândula salivar de *L. longipalpis* nos soros de crianças (idade entre 0-5 anos) naturalmente expostas. Os soros foram obtidos em um estudo prospectivo no qual realizou-se sorologia (ELISA) e o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígeno de *Leishmania*. Os indivíduos que foram negativos para ambos os testes na primeira avaliação (fase 1), foram acompanhados, testados mais uma vez (fase 2) e classificados em quatro grupos (positivo para sorologia e DTH, sorologia positiva e DTH negativo, sorologia negativa e DTH positivo e sorologia e DTH negativos). Quinze soros de cada grupo em ambas as fases foram testados pela técnica de ELISA, e cinco dos mesmos grupos pela técnica de Western blot usando extrato de glândula salivar como antígeno. Um aumento significativo de IgG, IgG1 e IgE anti-saliva foi observado nos grupos que convertem a sorologia e o DTH anti-*Leishmania* na segunda fase. Um aumento significativo de IgG4 foi observado somente no grupo que converte a sorologia anti-*Leishmania*. Não se observou um aumento na resposta de IgG anti-saliva quando utilizou-se a saliva de *Phlebotomus papatasi* e *L. whitmani*. A análise por Western blot mostrou um aumento de reconhecimento de bandas no grupo que converte o DTH. Existe pelo menos 10 antígenos no qual dois (50 e 36 kDa) são reconhecidos comumente pelo soro das crianças com DTH positivo. Nossos resultados mostram um aumento de anticorpos IgG, IgG1 e IgE anti-saliva no grupo de indivíduos com DTH positivo. Anticorpos contra as proteínas da glândula salivar de flebotomos podem ser relevantes nos estudos de epidemiologia das leishmanioses e na imunidade natural.

Palavras chaves: *Leishmania donovani chagasi*, anticorpos, *Lutzomyia* e hipersensibilidade tardia.

ABSTRACT

Evaluation of antibody production against *Lutzomyia longipalpis* saliva from children at an endemic area for Visceral Leishmaniasis. REGIS BERNARDO BRANDIM GOMES. People living in endemic areas for Visceral Leishmaniasis present antibodies against the saliva of the vector, *Lutzomyia longipalpis*. We have quantified total as well as specific antibodies against salivary gland lysate of *Lutzomyia longipalpis* from the IgG, IgG1, IgG3, IgG4 and IgE subclasses in the serum of naturally exposed children (aged 0-5 years). Sera were obtained from a prospective study, in which anti-*Leishmania* serologic assay (ELISA) and delayed-type hypersensitivity (DTH) were evaluated. Individuals who were negative for both ELISA and DTH in the first evaluation (phase 1) were followed and tested once more (phase 2) and classified into four groups (positive for both serology and DTH, positive serology and negative DTH, negative serology and positive DTH and negative for both serology and DTH). Fifteen sera from each group in each phase were assayed by ELISA and five from the same groups by Western blots using salivary gland extract as antigen. A significant increase of anti-saliva IgG, IgG1 and IgE were observed in the groups that became serology and DTH positive against *Leishmania* in the second phase. A significant increase of IgG4 titers was observed only in the group that became positive for anti-*Leishmania* serology. An increase in total IgG was not observed in the anti-*Phlebotomus papatasi* and anti-*L. whitmani* saliva response. Immunoblot analysis showed an increase in the number of recognized bands in the group with positive DTH. There were 10 main antigens of which 2 (50 and 36 kDa) were commonly recognized by sera from children with positive DTH. Our results display an increase in anti-saliva IgG, IgG1 and IgE antibody titers in the group with positive anti-*Leishmania* DTH. Antibodies against sandfly salivary proteins may be of relevance in studying leishmaniasis epidemiology and natural immunity.

Key words: *Leishmania donovani chagasi*, antibodies, *Lutzomyia* and delayed-type hypersensitivity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses constituem um grupo de doenças que apresentam diferentes aspectos clínicos em humanos. São patologias causadas pela *Leishmania* spp., um protozoário da ordem Kinetoplastida (LAINSON & SHAW, 1987).

A *Leishmania* possui um ciclo de vida dimórfico sendo encontrada nas seguintes formas: amastigota e promastigota. Estas formas são morfologicamente semelhantes entre as mais de 20 espécies de *Leishmania* encontradas na natureza (LAINSON et al., 1987; PEARSON et al., 1994). As amastigotas são formas ovais encontradas no hospedeiro vertebrado e instalam-se intracelularmente nas células do sistema reticuloendotelial. As promastigotas são as formas flageladas encontradas no trato digestivo do vetor invertebrado (a fêmea dos flebotomíneos) onde o desenvolvimento passa por vários estágios até atingir a forma metacíclica, que é a infectante transmitida pela picada do inseto (SACKS & PERKINS, 1984).

Lainson e Shaw (1987) dividiram o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Esta divisão é baseada no desenvolvimento do parasita no intestino do vetor. O subgênero *Viannia* inclui as espécies (seção peripilaria) que se desenvolvem no intestino posterior antes de migrarem para o intestino médio e anterior do inseto. No subgênero *Leishmania* estão as espécies (seção suprapilaria) que se desenvolvem somente no intestino médio e anterior do vetor, perdendo assim a fase primitiva de desenvolvimento no intestino posterior. No entanto, esta metodologia não é a única utilizada para esta finalidade. Outras

técnicas que incluem análises de isoenzimas, anticorpos monoclonais espécies específicas, análises do DNA do cinetoplasto e PCR (Polymerase Chain Reaction) usando oligonucleotídeos específicos para *Leishmania spp.*, estão disponíveis em laboratórios de referência da Organização Mundial de Saúde.

A cada ano surgem em torno de 2 milhões de novos casos no mundo, sendo que o maior número de casos ocorre na África, Índia, sul da Europa, Oriente Médio, América do Sul e Central (WHO, 2001). Com o aparecimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV), as leishmanioses têm surgido como uma infecção oportunista em muitos pacientes com imunodeficiência adquirida severa (AIDS) em vários lugares do mundo (WHO, 1991). O controle das leishmanioses, atualmente, é feito através do tratamento quimioterápico em pacientes, eliminação dos reservatórios e controle vetorial para reduzir a transmissão (PEARSON & QUEIROZ SOUSA, 1994). Até o momento, não existe uma vacina eficaz contra as leishmanioses.

A doença humana tem sido tradicionalmente dividida em quatro manifestações clínicas que são: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. Uma simples espécie de *Leishmania* pode ser responsável por mais de uma manifestação clínica e uma única manifestação pode também ser produzida por várias espécies de *Leishmania* (PEARSON et al., 1996). As manifestações clínicas das leishmanioses dependem de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania* até o estado nutricional e imunológico do hospedeiro humano (CERF et al., 1987; PEARSON et al., 1996)

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

1.2.1 Considerações gerais

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, pertencente a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e única representante do complexo *donovani* na América Latina. Na África, Índia e Ásia, a *L. donovani* é o parasita responsável pela manifestação clínica da doença, sendo a *L. infantum* a responsável no litoral do Mediterrâneo (LAINSON & SHAW, 1987). A LV é caracterizada por febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anemia com leucopenia, ativação policlonal de células B com hipergamaglobulinemia, edema e estado de debilidade progressivo, levando o paciente ao óbito se não for tratado a tempo. Na Índia é conhecida como Kala-azar ou febre Dum-Dum; no Mediterrâneo é conhecido como Leishmaniose Infantil ou Visceral e no Brasil é conhecido como Leishmaniose Visceral ou classicamente como calazar.

A Leishmaniose Visceral é uma causa importante de morbidade e mortalidade entre crianças e adultos jovens no nordeste do Brasil (EVANS et al., 1992). PENNA (1934) detectou casos de LV pela primeira vez no nordeste do Brasil ao examinar fígados de pessoas que haviam falecido com suspeita de febre amarela. Ele encontrou neste material formas amastigotas de *Leishmania spp.* Os estudos clássicos do casal DEANE (DEANE & DEANE, 1955a, 1955b) e ALENCAR (1961) no Ceará apontaram a *Leishmania (L.) chagasi* como o agente etiológico da LV. Os mesmos estudos mostraram que o vetor responsável pela transmissão era o

flebótomo *Lutzomyia longipalpis* e o cão e a raposa selvagem (*Lycalopex vetulus*) constituem os principais reservatórios do parasita.

Conhecida classicamente como uma doença rural, a Leishmaniose Visceral tem emergido em grandes cidades do Brasil como em Teresina, capital do estado do Piauí (COSTA et al., 1990) e São Luís, capital do estado do Maranhão (COSTA et al., 1995). As condições epidemiológicas favoráveis criadas pela redução dos espaços ecológicos naturais (desmatamentos e aumento de favelas nos espaços urbanos das grandes cidades), criam assim, um ambiente propício para o estabelecimento do ciclo antrozoontótico. O vetor *L. longipalpis* passou a ser neste ambiente, o elo de ligação entre o reservatório silvestre, o homem e o cão (REBELO, 2001).

Em áreas endêmicas do nordeste do Brasil, estima-se que, a cada ano, 7.5% de indivíduos com menos de 15 anos de idade são infectados com *Leishmania*, onde somente 20% dos indivíduos infectados com *L. chagasi* desenvolvem a forma clássica da doença. Nestas áreas, a maioria das infecções são subclínicas. Os indivíduos apresentam exame físico normal apesar dos testes com antígeno de *Leishmania* serem reativos. Crianças com idades entre 0 a 9 anos correspondem a 80% dos casos da doença humana, sendo que 60% com idade inferior a 5 anos (BADARÓ et al., 1986; BADARÓ, 1988).

A ilha de São Luís, no estado do Maranhão, uma região epidêmica para a ocorrência de LV, registra 65% dos casos ocorridos em todo o estado. As crianças numa faixa etária de 0 a 5 anos são mais acometidas, principalmente as que exibem intenso movimento migratório e baixa renda familiar. (CALDAS et al., 2001).

1.2.2 Resposta imune na Leishmaniose Visceral

A resposta imune mediada por células é fundamental na proteção contra as leishmanioses. Uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia (Teste de Intradermoreação de Montenegro) a antígeno de *Leishmania* é comumente associado à forma assintomática da doença. No entanto, em indivíduos apresentando manifestações clínicas da LV, observa-se a supressão da resposta imune celular, responsável pela disfunção imunológica presente nesta patologia. Assim, as células dos pacientes mostram ausência de resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos de *Leishmania* e ausência de proliferação linfocitária. Apresentam também, uma baixa produção de Interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), *in vitro*, quando estimulados com antígenos de *Leishmania*. Estas citocinas e a linfoproliferação são recuperadas após tratamento quimioterápico (CARVALHO et al., 1981; CARVALHO et al., 1985). Outras características são também observadas, como a presença de fatores supressores no soro, presença de imuno-complexos circulantes (GALVÃO-CASTRO et al., 1984), hipergamaglobulinemia policlonal (BARRAL-NETTO et al., 1986) e aumento da susceptibilidade a várias outras infecções (CARVALHO & BACELLAR, 1983; GUERREIRO et al., 1985).

Em seres humanos, a produção de IFN- γ está associada ao controle da infecção em crianças infectadas com *L. chagasi*. O IFN- γ é uma das citocinas mais importantes para a ativação de macrófagos, os quais atuam também no controle da infecção por *Leishmania* e na apresentação de antígenos do parasita (MURRAY et al., 1983; CARVALHO et al., 1985; CARVALHO et al., 1994). A IL-10, no entanto,

teria a função oposta, promovendo a redução da proliferação linfocitária, da produção de IFN- γ e da atividade citotóxica em células mononucleares responsivas do sangue periférico (BACELLAR et al., 1991; BARRAL-NETTO et al., 1998).

Na LV experimental e humana, as células T auxiliares CD4+ do tipo Th1, estão fortemente associadas com um padrão de proteção (SCOTT., 1991; HEINZEL et al., 1991). Durante a LV humana, observa-se uma ausência deste padrão de resposta celular, especialmente no baço, com baixa produção de IFN- γ e altos níveis de IL-4 e IL-10 (citocinas de padrão Th2). Este tipo de resposta é obtido também quando células mononucleares do sangue periférico são estimuladas com antígenos de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1994). No entanto, a citocina IL-12 promove a produção de IFN- γ , aumenta a resposta citotóxica e restaura a resposta de células mononucleares do sangue periférico em pacientes com LV (GHALIB et al., 1995; BARRAL-NETTO et al., 1998).

Vários trabalhos demonstraram em estudos com leishmaniose humana a relevância do papel do IFN- γ e da IL-12 como as principais citocinas envolvidas na proteção do hospedeiro, enquanto a IL-10 seria a citocina responsável pela sobrevivência do parasita e progressão da doença (GHALIB et al., 1993; BACELLAR et al., 1996; BARRAL-NETTO et al., 1998).

Apesar da ocorrência da supressão da resposta imune celular, pacientes com LV apresentam elevados títulos de anticorpos anti-leishmania, sendo utilizado inclusive como critério de diagnóstico da doença. Títulos elevados persistem mesmo após a cura clínica e parasitológica, durante pelo menos os seis primeiros meses após o início do tratamento (BADARÓ et al., 1986). A presença de produtos parasitários poderia ser capaz de causar uma ativação policlonal de linfócitos B, seguida de uma produção exacerbada de imunoglobulinas pelo plasmócitos,

provocando a hipergamaglobulinemia (GALVÃO-CASTRO et al., 1984; PERSON et al., 1996)

Embora existam anticorpos anti-leishmania na LV, a sua presença não está associada à proteção do hospedeiro. Nos modelos experimentais de leishmaniose murina, também não foi demonstrado o efeito protetor dos anticorpos presentes no soro imune. Apesar de não serem benéficos, ou mesmo prejudiciais à proteção e a resolução das lesões, os anticorpos podem estar envolvidos em outros fenômenos, como a modulação da interação parasita-macrófago (MAUEL, 1982; SACKS et al., 1984).

1.2.3 *Lutzomyia longipalpis* (filó Arthropoda) : O vetor

Os flebotomíneos são pequenos insetos alados, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. A posição taxonômica atualmente mais aceita, reconhece seis gêneros distribuídos da seguinte maneira: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo; *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África), são os principais vetores transmissores das leishmanioses. As fêmeas hematófagas, com hábitos crepusculares ou noturnos podem picar o homem tanto no interior do domicílio como fora dele. Estes insetos necessitam das proteínas presentes no sangue dos hospedeiros vertebrados para a maturação de seus ovos. Estes ovos, por sua vez, são depositados em material orgânico, em fendas de parede e troncos de árvore, para que ocorra a eclosão e

posterior andamento do seu ciclo de vida, com o surgimento de larvas, pupas e insetos adultos. As fêmeas adultas vivem em torno de um mês (FORATTINI, 1973).

Os flebótomos ingerem as formas amastigotas quando picam o hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas transformam-se em formas promastigotas no intestino do inseto e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (metaciclogênese) em aproximadamente uma semana, completando o ciclo de vida do parasita quando o inseto volta a se alimentar no hospedeiro vertebrado para o repasto sangüíneo (SACKS et al., 1984., LAINSON et al., 1977)

O flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (responsável pela transmissão nas Américas) é descrito como o principal transmissor da LV, predominando nas áreas rurais de clima semi-árido do Nordeste brasileiro e que tem como reservatórios o cão, a raposa e até mesmo o homem, como ocorre com o calazar indiano (ALENCAR, 1956., DEANE, 1958; COSTA et al., 2000).

1.3 O PAPEL DA SALIVA DE VETORES ARTRÓPODES NA TRANSMISSÃO PARASITÁRIA

1.3.1 Componentes da saliva dos vetores artrópodes

Os vetores artrópodes ao picarem o hospedeiro, injetam, juntamente com os mais variados patógenos, produtos da sua saliva (LAW et al., 1992). A glândula salivar dos vetores artrópodes possui substâncias farmacologicamente ativas, que estão envolvidas em diferentes atividades para resolver problemas comuns a estes animais. A hemostasia, talvez o principal empecilho para a alimentação de vetores hematófagos, compreende um conjunto de mecanismos fisiológicos utilizado pelo hospedeiro vertebrado no qual estão envolvidas a coagulação, agregação de plaquetas e vasoconstricção, que em conjunto impedem a perda de sangue. Para vencer estes obstáculos, os vetores hematófagos desenvolveram uma grande variedade de moléculas com atividades anti-coagulante, anti-agregação plaquetária e vasodilatadora, encontradas na glândula salivar destes insetos (RIBEIRO., 1987; RIBEIRO, 1995).

Uma grande quantidade de vetores hematófagos (flebotomíneos, triatomíneos, mosquitos, carrapatos) possuem produtos com atividades anti-agregação plaquetária na saliva (RIBEIRO et al., 1989). Esta atividade está relacionada com a presença da enzima apirase, que também está presente na parede interna dos vasos sangüíneos do hospedeiro vertebrado. Sua função é impedir a adesão da plaqueta à parede do vaso. A apirase degrada ADP em AMP,

impedindo um dos estímulos fisiológicos necessários para a agregação plaquetária (RIBEIRO et al., 1989).

Apesar da grande maioria dos vetores utilizarem a apirase como agente anti-agregador plaquetário, outras substâncias com as mesmas características têm sido descritas, como o antitromboxano e a prostaglandina E₂ (PGE₂), produzido pelo triatomíneo *Rhodnius prolixus* e a prostaciclina pelo carrapato *Ixodes dammini* (RIBEIRO et al., 1985; TITUS & RIBEIRO, 1990).

A PGE₂ e a prostaciclina também promovem a vasodilatação, evento que permite uma maior quantidade de sangue no local da picada. Alguns vasodilatadores foram descritos e caracterizados. Os triatomíneos do gênero *Rhodnius*, por exemplo, liberam óxido nítrico – NO (RIBEIRO et al., 1990; RIBEIRO et al., 1993; RIBEIRO, 1995). NO é um gás de vida curta, que no gênero *Rhodnius*, se mantém estável quando associado ao ferro presente no grupamento heme que ocorre na glândula salivar dos *Rhodnius* (VALENZUELA & RIBEIRO, 1998).

O carrapato tem como vasodilatador a prostaglandina, um lípideo derivado do ácido araquidônico (RIBEIRO et al., 1985). Mosquitos do gênero *Aedes* têm taquicininas (LAW et al., 1992), substâncias semelhantes às encontradas em vertebrados, como a substância P ou neurocinina. Outros tipos de mosquitos, os *Anopheles*, apresentam uma enzima, a peroxidase, com atividade que parece ser capaz de destruir substâncias vasoconstritoras (RIBEIRO et al., 1989). As glândulas salivares dos flebotomíneos apresentam um complexo de moléculas, sendo os peptídeos apirase e maxadilan as mais analisadas (LERNER et al., 1991; RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO et al., 1989). O maxadilan é considerado um vasodilatador extremamente potente sendo encontrado somente nas glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* (RIBEIRO et al., 1986). A apirase, por outro lado, é encontrada

nos generos *Lutzomyia* e *Phlebotomus* e apresenta atividade anti-agregação plaquetária (RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO et al., 1989).

Após entrar em contato com a pele do hospedeiro, o vetor hematófago necessita facilitar a obtenção do sangue para sua alimentação. Portanto, antes da alimentação propriamente dita, o vetor introduz seu aparelho bucal repetidas vezes até formar um “lago” sangüíneo (RIBEIRO, 1995).

A epiderme superficial é avascular, enquanto a derme possui uma distribuição de vasos característicos. Durante a sondagem, o vetor atinge o vaso sangüíneo, causando a hemorragia, levando à formação do “lago sanguíneo”. Como conseqüência, o sangue que é obtido destes vasos danificados aumenta a chance do vetor em obtê-lo. A laceração dos vasos para a obtenção do sangue é observada em ambos os tipos: os que se alimentam diretamente do canal do vaso e aqueles que se alimentam do lago hemorrágico formado na pele (RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO, 1995). O mecanismo homeotástico do hospedeiro é muito eficiente e um pequeno dano causado nos vasos sangüíneos é logo reparado pelas plaquetas. Portanto, a agregação palquetária, a vasoconstrição e a coagulação, que ocorrem durante o processo de hemostasia, diminuem o fluxo sangüíneo no local da picada não permitindo que o vetor se alimente. Como as reações inflamatórias geralmente estão associadas à alterações no fluxo sangüíneo, eritema, edema e dor, a hemostasia está ligada inerentemente a reação inflamatória. Substâncias que impedem estes processos são as principais armas destes animais para a obtenção do seu alimento (RIBEIRO., 1987).

1.3.2 Saliva de flebotomíneos e Leishmanioses

Durante o repasto sangüíneo, o flebótomo injeta no hospedeiro vertebrado, juntamente com a forma infectante do parasita, produtos da sua glândula salivar contendo moléculas com atividades farmacológicas e que atuam na resposta hemostática do hospedeiro. Estas moléculas têm se mostrados capazes de exacerbar a infecção por *Leishmania* em modelos murinos (TITUS & RIBEIRO , 1988). TITUS & RIBEIRO (1988) mostraram que além de potente atividade anti-hemostática e vasodilatadora, a saliva também aumentava a infectividade por *Leishmania*.

A análise da composição dos produtos da saliva de flebotomíneos, principalmente *L. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, foi importante na compreensão do seu efeito na modulação da infecção por *Leishmania* e da resposta imune em modelos experimentais (THEODOS et al., 1991; LIMA & TITUS , 1996).

Camundongos com um fenótipo de resistência na infecção por *Leishmania* se tornam susceptíveis se a inoculação de *L. major* é feita juntamente com lisado de glândula salivar de *L. longipalpis* ou *P. papatasi*, mesmo quando utilizada uma pequena quantidade de parasita (THEODOS et al., 1991; BELKAID et al., 1998). Outros trabalhos demonstraram que a inoculação de *L. braziliensis* juntamente com a saliva de *L. longipalpis* causa uma lesão progressiva em BALB/c, enquanto a inoculação de *Leishmania braziliensis* não causa lesão no camundongo (SAMUELSON et al., 1991; LIMA & TITUS, 1996).

Uma das primeiras abordagens imunológicas feitas na tentativa de esclarecer a imunomodulação da saliva na exacerbação da infecção, foi a avaliação

do comportamento do macrófago presente no sítio da infecção. O lisado de glândula salivar do flebotomíneo *Phlebotomus duboscqui*, possui atividade quimiotática para macrófagos peritoneais murinos (ANJILI & MBATI, 1995). A atração de monócitos provocada pela saliva do vetor leva a uma exacerbação da infecção por *Leishmania* nos macrófagos do hospedeiro susceptível (ANJILI & MBATI, 1995). O estudo histopatológico feito no local da inoculação (pele de hamster) do lisado de glândula salivar de *L. longipalpis*, mostrou que a saliva promove no tecido um acúmulo de macrófagos (LAURENTI et al., 1992).

THEODOS & TITUS (1993) mostraram que apesar do macrófago estar presente no local da infecção este não é capaz de apresentar eficientemente o parasita. A saliva inibe a capacidade apresentadora de antígeno do macrófago e de produzir H_2O_2 em resposta à estimulação com $IFN-\gamma$, evitando uma participação efetiva da imunidade mediada por células T. O peptídeo maxadilan, vasodilatador presente na glândula de *L. longipalpis*, tem mostrado potentes efeitos imunomodulatórios em macrófagos. Macrófagos de BALB/c tratados com maxadilan e estimulados com LPS *in vitro*, apresentaram uma inibição na produção de $TNF-\alpha$ e um aumento de IL-6 (SOARES et al., 1998). A saliva do *P. papatasi* não altera a endocitose de *Leishmania* por macrófagos mas altera a sua atividade microbicida induzida por $IFN-\gamma$. A saliva inibe a produção de óxido nítrico permitindo a proliferação da *Leishmania* no interior do macrófago (HALL & TITUS., 1995).

A saliva do *P. papatasi*, quando inoculada juntamente com *L. major*, exacerba a infecção na pata de camundongos resistentes sendo associada a uma inibição da resposta celular do tipo Th1 com conseqüente diminuição de $IFN-\gamma$, IL-12 e óxido nítrico sintase. Neste tipo de situação, observou-se uma resposta do tipo Th2 com detecção de IL-4 (MBOW et al., 1998). Foi demonstrado, também, que o

lisado de glândula salivar é capaz de induzir a produção de IL-4 quando injetada no camundongo sem *Leishmania* (MBOW et al., 1998).

BELKAID e colaboradores (1998) estabeleceram um novo modelo de infecção murina, utilizando a derme da orelha do camundongo para a infecção por *Leishmania major* juntamente com lisado de glândula salivar do *Phlebotomus papatasi*, tentando assim mimetizar a infecção natural. A exacerbação da infecção na orelha foi observada tanto em camundongos susceptíveis quanto nos resistentes à infecção por *L. major*. Esta exacerbação está associada a um aumento inicial na epiderme da quantidade de células produtoras de citocinas tipo Th2. No mesmo modelo, uma pré-exposição do lisado de glândula salivar, induziu a produção de anticorpos anti-saliva capazes de neutralizar a capacidade do lisado em exacerbar a infecção.

Este artigo sugeriu pela primeira vez a possibilidade do início de uma resposta imune contra componentes da saliva, que de alguma forma poderiam contribuir para diminuição da lesão causada pela inoculação do parasita juntamente com a saliva (Figura 1).

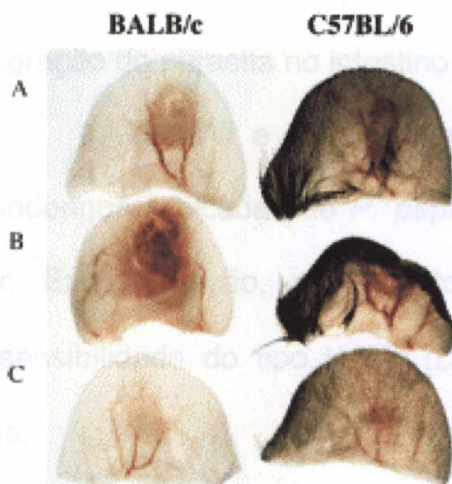


Figura 1. Orelhas de camundongos Balb/c e C57BL/6, 10 semanas após inoculação intradérmica de 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. major*. Somente *L. major* (A), *L. major* com 0.2 partes de lisado de glândula salivar (B) e *L. major* com 0.2 partes de lisado de glândula salivar em animais pré-sensibilizados com lisado de glândula salivar(C). BELKAID et al (1998).

Neste mesmo trabalho (BELKAID et al., 1998), os autores sugerem que, em áreas endêmicas, a intensidade de exposição a picadas de flebotomos não infectados pode influenciar a epidemiologia das leishmanioses cutâneas. Indivíduos provenientes de áreas não endêmicas correriam um risco maior de desenvolver as formas mais graves, uma vez que seriam imunologicamente “naive” não somente a *Leishmania*, mas também a saliva do flebótomo.

O efeito dos anticorpos anti-saliva também foi avaliado em hamsters expostos a *Phlebotomus argentipes*. Após a exposição, o soro apresentou altos títulos de anticorpos anti-componentes da saliva do vetor e foi relacionado com a mortalidade subsequente dos flebotomíneos que picaram o animal imunizado. Os resultados também revelaram que a alimentação das fêmeas, expresso pela porcentagem de engorgitamento, diminuiu gradualmente à medida que a mortalidade das mesmas aumentava durante as picadas subsequentes (GHOSH et al., 1998). Mortalidade similar foi mostrada quando os insetos se alimentaram do soro imune através de uma membrana artificial. Neste mesmo trabalho, quando os flebotomos se alimentaram de um preparado de sangue com parasita (*L. donovani*) contendo o soro com anticorpos anti-saliva, ocorreu a inibição do desenvolvimento e da migração do parasita no intestino do flebótomo (GHOSH et al., 1998).

KAMHAWI e colaboradores (2000) mostraram que a pré-exposição de camundongos à picadas de *P. papatasi* não infectados confere proteção contra *L. major*. Esta proteção, no entanto, foi associada com uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e com a produção de IFN- γ no local da picada.

VALENZUELA e colaboradores (2001), recentemente, caracterizaram nove proteínas da glândula salivar do *P. papatasi*. Uma destas proteínas, tendo um

peso molecular aparente de 15 kDa (SP-15), foi capaz de conferir proteção aos camundongos vacinados com SP-15 e desafiados com *L. major* mais saliva. A vacina produziu uma forte resposta humoral e DTH. Esta vacina protegeu camundongos deficientes de células B, sugerindo que a proteção é mediada por células T através da indução de DTH. Estes resultados mostram a importância de identificar-se componentes da glândula salivar do flebótomo, com a capacidade de gerar uma resposta imune capaz de diminuir ou combater a infecção pelo parasita.

Em seres humanos foi mostrado que indivíduos picados repetidamente por mosquitos produziam anticorpos anti-saliva dos insetos, permitindo a tipagem da classe e das subclasses destes anticorpos (SHAN et al., 1995; e PENG et al., 1997). A classe de anticorpo presente em maior quantidade nestes ensaios foi a do isotipo IgE e IgG4 (BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1994, 1997). Estes isotipos estão diretamente correlacionados com reações alérgicas desenvolvidas pelo hospedeiro.

Na leishmaniose visceral humana, crianças de uma área endêmica que mostram positividade para o teste cutâneo ao antígeno de *Leishmania*, apresentam anticorpos anti-glândula salivar do vetor *L. longipalpis*. O estudo sugere que, picadas repetidas pelo vetor podem resultar na produção de anticorpos anti-saliva (BARRAL et al., 2000).

Anticorpos humanos anti-saliva de flebótomo podem ser úteis na identificação da distribuição espacial dos flebótomos numa determinada área, podendo auxiliar no direcionamento do controle do vetor e da doença. No entanto, para uma avaliação em larga escala, em regiões endêmicas, o uso de produtos recombinantes clonados da glândula do vetor seria mais apropriado. Esta abordagem tem sido realizada utilizando produtos recombinantes da glândula de *L. longipalpis* e carrapato (*Ixodes scapularis*) para avaliar a produção de anticorpos

presentes no hospedeiro e correlacionar a exposição destes indivíduos aos vetores existentes na área (BARRAL et al., 2000; SANDERS et al., 1999).

Diante destas informações, a hipótese que se levanta agora é se indivíduos que residem numa área endêmica para LV, seriam capazes de desenvolver imunidade anti-saliva do vetor que fosse capaz de interferir na resposta imune contra a *L. chagasi*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o perfil de anticorpos anti-saliva do vetor *Lutzomyia longiplapis* em indivíduos residentes numa área endêmica de leishmaniose visceral, que alteram a sua resposta humoral e celular contra antígenos de *Leishmania*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a alteração de títulos de anticorpos IgG, anti-lisado de glândula salivar de *L. longipalpis* em indivíduos que num período de seis meses convertem a sua sorologia ou reação de hipersensibilidade cutânea tardia (Reação de Montenegro) contra antígenos de *Leishmania*;
- Avaliar a presença de isotipos IgG1, IgG3, IgG4 e de IgE anti-saliva nos mesmos indivíduos;
- Utilizar, como antígeno, glândula salivar de outros flebotomíneos para verificar a especificidade da resposta de anticorpos nos mesmos grupos;
- Avaliar o perfil de bandas reconhecidas pelo o soro destes indivíduos através da técnica de Western blot, tendo como antígeno, o lisado de glândula salivar.

3 JUSTIFICATIVA

Os resultados obtidos no modelo murino que mimetiza a transmissão natural das leishmanioses (BELKAID et al., 1998) e em humanos (BARRAL et al., 2000), sugerem que em áreas endêmicas, a intensidade de exposição a picadas de flebotomíneos não-infectados pode influenciar a epidemiologia das leishmanioses. Os indivíduos que residem nestas áreas, e que têm contato com insetos não-infectados, estariam desenvolvendo proteção pela produção de anticorpos anti-saliva, capazes de protegê-los quando em contato com o flebótomo infectado com a *Leishmania*. No entanto, não sabemos até o momento se os anticorpos anti-saliva são importantes na proteção, por não ter sido determinado, ainda, o seu mecanismo de ação. Em alguns trabalhos, a proteção observada foi atribuída ao DTH formado contra a saliva do flebótomo *Phlebotomus papatasi* (KAMHAWI et al., 2000; VALENZUELA et al., 2001) ou contra outros antígenos, como DNCB e BCG (MAUEL & ROWE., 1977).

Portanto, a avaliação do perfil de anticorpos, incluindo classes e subclasses, no soro de indivíduos expostos à picadas de *L. longipalpis* num determinado período de tempo e que alteraram sua sorologia ou DTH para *Leishmania*, será importante para uma posterior análise de seu papel na epidemiologia da leishmaniose visceral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soros utilizados no estudo

Os soros utilizados no estudo, são provenientes de uma área endêmica para Leishmaniose Visceral em São Luis, capital do Maranhão. Estes soros foram obtidos em colaboração com o Dr. Jackson Costa e Arlene Caldas, da Universidade Federal do Maranhão. Os mesmos foram coletados durante um estudo epidemiológico prospectivo em duas etapas: a primeira etapa no período de setembro a outubro de 1997 e a segunda, de abril a maio de 1998. Foram avaliadas crianças com idade de zero a cinco anos, residentes nas localidades de Vila Nova e Bom Viver no município de Raposa – Maranhão.

Os soros das crianças coletados na primeira etapa foram testados contra antígeno de *Leishmania* para se avaliar a infecção pela técnica ELISA previamente descrita (BADARÓ et al., 1986). As mesmas crianças foram paralelamente submetidas ao teste cutâneo de Montenegro, para a avaliação de hipersensibilidade tardia (DTH) ao antígeno de *Leishmania* (REED et al., 1986). Nesta primeira fase, as crianças que reagiram positivamente a qualquer um dos testes, foram excluídas do estudo. As que resultaram em testes negativos foram mantidas e avaliadas novamente após seis meses. Decorrido este período, os indivíduos foram submetidos à nova avaliação e agrupados de acordo com a mudança da sua resposta anti-*Leishmania* nos grupos de conversão de sorologia e de conversão da reação de Montenegro.

Os soros utilizados como controle negativo são provenientes de indivíduos da mesma faixa etária residentes em área não endêmica para Leishmaniose Visceral, no município de Salinas no estado da Bahia.

4.2 Considerações éticas

Um termo de consentimento foi elaborado e apresentado aos responsáveis pelas crianças para a adesão ou não ao estudo. O termo, elaborado pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, esclarece os objetivos da pesquisa e a importância da participação das crianças.

4.3 Antígenos

O lisado de glândula salivar de *L. longipalpis* e as membranas para os ensaios de Western blot, foram fornecidos pelo Dr. José Marcos Ribeiro (NIH-USA). O lisado de glândula salivar foi ressuspenso em meio tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 9.6.

4.4 ELISA para detectar anticorpos (IgG total) anti-saliva de *L. longipalpis*, *P. papatasi* e *L. whitmani*.

As placas (Linbro/Titertek) foram sensibilizadas com 50µl do antígeno a 4°C durante a noite (1µg de proteína/ml). Após 4 lavagens com PBS Tween 0,05%, estas foram bloqueadas durante a noite a 4°C, com PBS Tween 0,1% . Novas lavagens (4 ciclos) foram realizadas e os soros diluídos (1/100 em PBS Tween 0,05% contendo 0,5% leite) foram adicionados e incubados durante a noite a 4°C. Novas lavagens foram realizadas e adicionada IgG anti-humana conjugada a fosfatase alcalina diluída em 1/1000. Incubaram-se então, as placas a 37°C durante 45 minutos. Após mais três ciclos de lavagens, adicionou-se o substrato (P-nitrofenilfosfato), diluído em tampão carbonato (1mg/ml), pH 9.6, para a revelação. A reação foi interrompida com adição de NaOH 3M. A leitura foi feita no espectrofotômetro, utilizando-se a luz visível no comprimento de onda de 405 nm.

4.5 ELISA para detectar subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) anti-saliva de *L. longipalpis*

As placas foram sensibilizadas com antígeno (15ug/ml para IgG4, 1ug/ml para IgG1 e IgG3) diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, durante 2 horas a 37°C e depois a 4°C durante a noite. Após três lavagens com PBS – Tween

0,05% (200ul/poço), as placas foram bloqueadas por duas horas a 37°C com PBS 0,1% (100ul/poço). Novas lavagens (3 ciclos) foram realizadas e adicionadas as amostras diluídas (1/40 para IgG4, 1/100 para IgG1 e 1/10 para IgG3) em PBS-Tween 0,05% por 02 horas a 37°C e depois a 4°C durante a noite. Depois das lavagens incubou-se durante a noite, a 4°C, o anticorpo específico anti-IgG1, anti-IgG3 (diluídos 1/1000) e anti-IgG4 (diluído 1/500). Após mais três ciclos de lavagens, incubou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo (conjugado com fosfatase alcalina e diluída em PBS – Tween 0,05% em 1/1000) por 45 minutos a 37°C. A revelação foi feita com P-nitrofenilfosfato e interrompida com NaOH 3M. A leitura foi feita no espectrofotômetro, utilizando-se a luz visível de comprimento de onda de 405 nm.

4.6 ELISA para detectar anticorpos do isotipo IgE anti-saliva de *L. longipalpis*

4.6.1 Preparo do RF

Para a dosagem do isotipo IgE é necessário depletar IgG afim de que se evite a competição pelo o mesmo sítio antigênico. Para este objetivo foi usado um produto contendo fator reumatóide (RF-Absorbent, Dade Behring) que se liga à IgG deixando livre o isotipo IgE. O RF liofilizado foi ressuscitado em 1,5 ml de água destilada estéril e dividido em alíquotas para o armazenamento (-20°C). As amostras de soro foram pré-diluídas em PBS pH 7,2 na diluição de 1:2. Esta mistura foi novamente diluída em RF (1:4) e deixada à temperatura ambiente por 15 minutos.

Após esta incubação, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm, durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de IgE.

4.6.2 ELISA para detecção de IgE

A placa foi sensibilizada (50µl/poço) com sonicação de glândula salivar de *L. longipalpis* na concentração de 15µg/ml, durante a noite a 4°C. Na etapa seguinte, a placa foi lavada 03 vezes com PBS Tween 0,05% e bloqueada com PBS Tween 0,1%. Em seguida, os soros (diluídos em 1/4) foram colocados (50 µl/poço) e incubados a 4°C durante a noite. Após 03 lavagens, o anticorpo anti-IgE conjugado a fosfatase alcalina (2º anticorpo) foi colocado (100µl/poço) e incubado por 02 horas à 37°C. Foram feitas mais 03 lavagens e colocado o substrato P-nitrofenilfosfato (100µl/poço). Após 30 minutos a reação foi parada com NaOH 3M. A leitura foi feita num espectrofotômetro utilizando-se luz visível no comprimento de onda de 405 nm.

4.7 Western blot

O gel de SDS-poliacrilamida com proteínas da glândula salivar de *L. longipalpis* (aproximadamente 40µg de proteínas) foi feito em 16% de Tris-glicina, juntamente com o peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas da glândula foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o tampão Tris-glicina mais 10% de metanol como tampão de transferência.

A membrana contendo antígenos de *L. longipalpis* foi bloqueada com PBS tween 0,05% mais 5% de leite desnatado durante a noite à temperatura de 4°C. Após 3 ciclos de lavagens com PBS tween 0,05% com duração de 05 minutos cada, os soros, diluídos em PBS Tween 0,05% (1/10), foram colocados sobre as membranas, sendo dispensado 600µl por canaleta (BIO-RAD). Os soros foram incubados durante a noite a 4°C. Foram feitas 03 lavagens e colocou-se o segundo anticorpo (anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina-SIGMA) na diluição de 1/500, durante uma hora a temperatura ambiente. Lavou-se 03 vezes e revelou-se a membrana com substrato para fosfatase alcalina (Western Blue – Promega).

4.8 Análise estatística

A análise dos dados deste trabalho foi realizado utilizando o programa GraphPad-Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As comparações dos títulos de anticorpos dos diversos grupos de indivíduos foram feitas utilizando o teste pareado e não-paramétrico de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação dos grupos controles.

Um grupo de indivíduos da faixa etária de 1-5 anos, residente em área não endêmica para Leishmaniose Visceral, foi utilizado como controle negativo para IgG contra lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*. O ponto de corte da técnica ELISA contra o lisado de glândula salivar foi estabelecido em 0,041 (Densidade Óptica) utilizando-se a média da soma destes indivíduos mais 2 desvios padrões (Figura 2).

5.2 IgG contra lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Cento e vinte soros (15 de cada grupo, da 1º e 2º coleta) de indivíduos residentes numa área endêmica de Leishmaniose Visceral, foram testados contra o antígeno da glândula salivar do vetor *Lutzomyia longipalpis*, para se avaliar a produção de anticorpos IgG. Os grupos de indivíduos da área endêmica estudada foram divididos de acordo com a resposta anti-*Leishmania* (DTH e ELISA). Na primeira coleta, os indivíduos que cujos testes foram negativos, submeteram-se novamente a outra avaliação após 6 meses e foram divididos em 4 grupos de acordo com a resposta anti-leishmania: DTH- SORO-, DTH+SORO-, DTH-SORO+ e DTH+SORO+. Observou-se um aumento na concentração de anticorpos IgG anti-saliva principalmente nos grupos que converteram o DTH anti-*Leishmania* (figuras

3A e 3C). Ao mesmo tempo, verificamos uma queda na produção de anticorpos IgG anti-saliva no grupo de crianças que converteram somente a sorologia anti-*Leishmania* (figura 3B). O grupo de crianças que mantém os testes anti-*Leishmania* (ELISA e DTH) negativos, em ambas as fases, apresentam uma alta produção de anticorpos IgG anti-saliva também em ambas as fases (figura 3D).

5.3 IgG1, IgG3 e IgG4 contra lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Com o objetivo de avaliar as subclasses de IgG predominantes na resposta contra a saliva de vetores, analisamos pela técnica de ELISA a produção dos isotipos IgG1, IgG3 e IgG4 contra o lisado de glândula salivar do *L. longipalpis*, em soros de 60 crianças (15 de cada grupo, da 1º e 2º coleta). Somente os grupos que converteram o DTH e sorologia (DTH+S+) anti-*Leishmania* ou somente a sorologia (DTH-S+), foram avaliados nesta fase do estudo. Na subclasse IgG1 anti-saliva ocorre um aumento significativo ($p = 0,002$) somente no grupo que converte o DTH anti-*Leishmania* (Figura 4A). Observa-se uma queda na produção de IgG1 no grupo que converte somente a sorologia (Figura 4B).

Não existe aumento na produção de anticorpos com o isotipo IgG3 anti-saliva, em qualquer dos grupos, em ambas as fases (Figura 5A). Ocorre um discreto aumento, porém significativo ($p=0,02$), na produção de anticorpos com o isotipo IgG4 anti-saliva, somente no grupo de crianças que converte somente a sorologia anti-*Leishmania* (figura 5B).

5.4 IgE contra lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Os anticorpos da classe IgE tem sido detectados em resposta a antígenos da glândula salivar de vetores. Verificamos a produção destes anticorpos contra o lisado da glândula salivar de *L. longipalpis* nos mesmos grupos de crianças analisados para detectar as subclasses de IgG.

A produção de anticorpos da classe IgE foi detectado de maneira significativa ($P = 0.002$) no grupo que converte o DTH anti-*Leishmania* (Figura 5C). Não houve diferença significativa na produção de IgE em relação aos outros grupos.

5.5 IgG contra lisado de glândula salivar de *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia whitmani*.

Para avaliar a especificidade da resposta contra os produtos da glândula salivar de *L. longipalpis*, testamos pela técnica de ELISA a reatividade destes soros contra lisado de glândula salivar de outros vetores: *Phlebotomus papatasi* (flebótomo encontrado no Velho Mundo) e *Lutzomyia whitmani* (flebótomo encontrado no Novo Mundo, inclusive na área endêmica do estudo). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos analisados com a glândula salivar das duas espécies de flebotomíneos (Figura 6, A e B).

5.6 Western blottings indicando IgG contra antígenos da glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Foi avaliada pela técnica de Western blot a resposta contra diferentes componentes da mistura antigênica presente na glândula salivar do vetor *Lutzomyia longipalpis*, utilizando soros (5 de cada grupo) de indivíduos da área endêmica em estudo, que converteram o DTH e sorologia ou somente a sorologia anti-*Leishmania*. Os resultados mostram que existem pelo menos 10 antígenos na glândula salivar do vetor, que são reconhecidos pelos anticorpos IgG presentes nos soros dos indivíduos que converteram o DTH anti-*Leishmania* (figura 7A). Verificamos neste grupo uma maior heterogeneidade de resposta com bandas variando de peso molecular entre 4 a 50 kDa. A banda de aproximadamente 50 kDa está presente praticamente em todos os indivíduos e em ambos os grupos, inclusive no grupo que converte somente a sorologia anti-*Leishmania* (figura 7B).

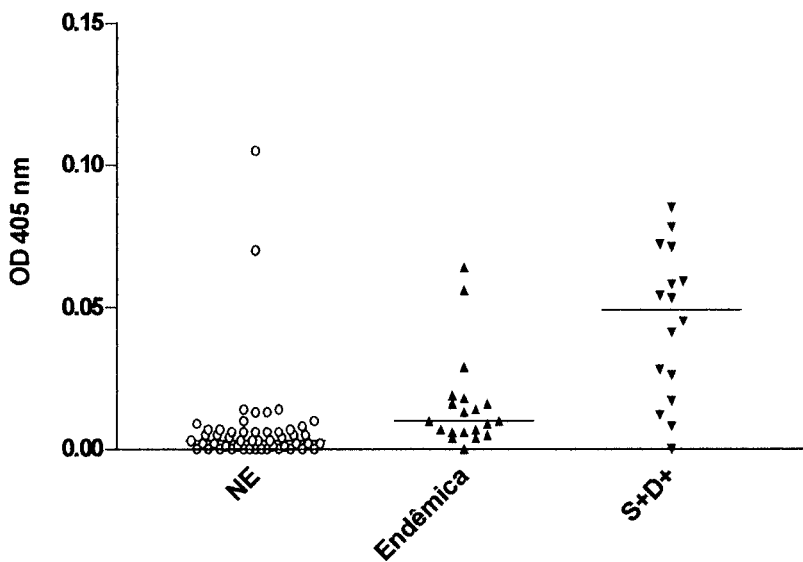


Figura 2. Anticorpos IgG contra a glândula salivar de *L. longipalpis* detectado por ELISA utilizando soros de indivíduos que residem em área não endêmica (NE) de Leishmaniose Visceral, endêmica e (S+DTH+) controles positivos. O ponto de corte foi construído utilizando-se a média mais 2 desvios padrões dos soros dos indivíduos da área não endêmica (limite de corte $\geq 0,041$).

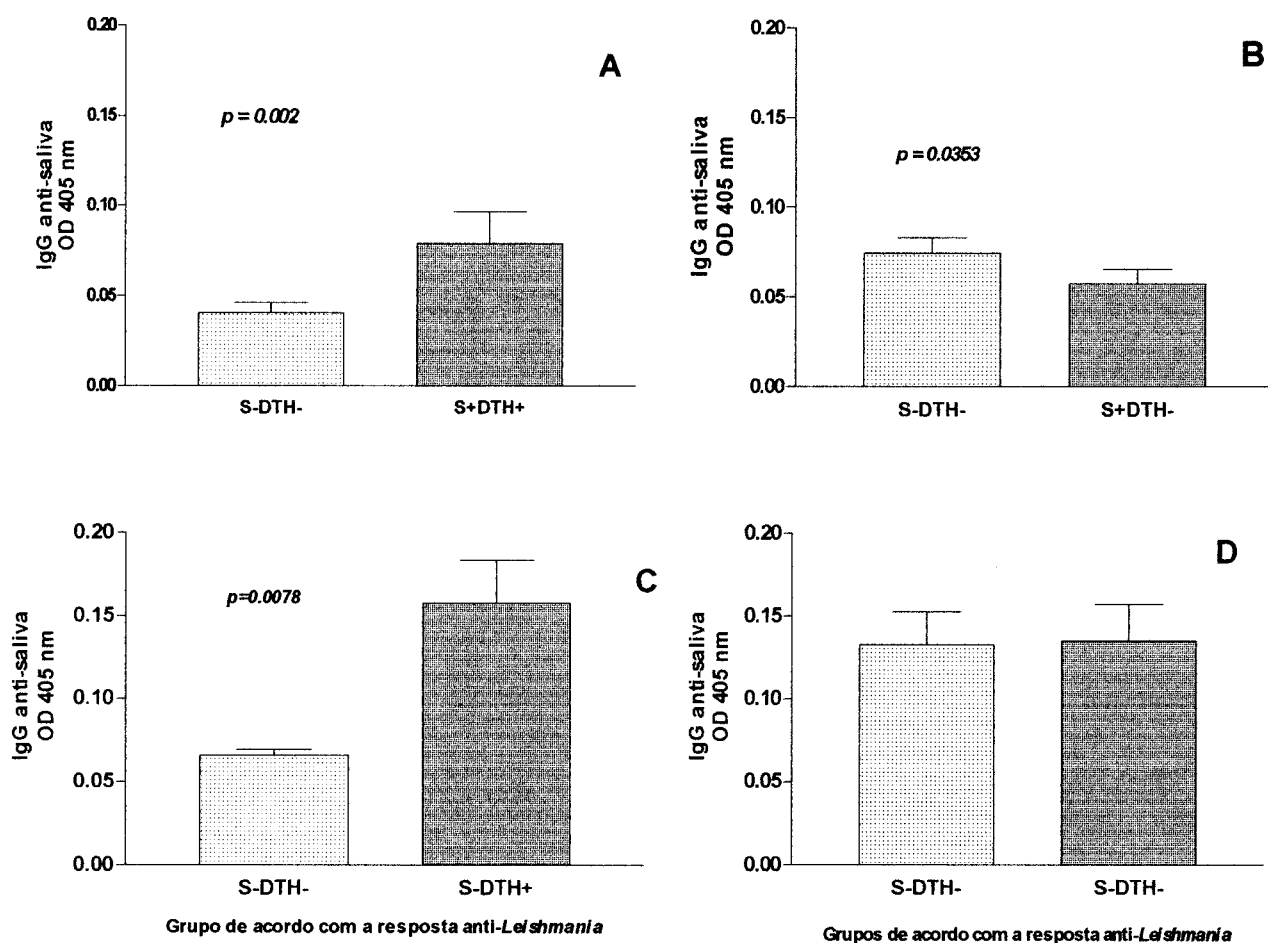


Figura 3. Anticorpos IgG contra glândula salivar de *L. longipalpis* detectado por ELISA. Os soros (15 de cada grupo) são provenientes de indivíduos de área endêmica de LV, coletados em momentos diferentes (seis meses de intervalo) e testados contra antígenos de *Leishmania* através do teste ELISA (sorologia) e teste de hipersensibilidade tardia (DTH). Os indivíduos que tiveram ELISA e DTH anti-*Leishmania* negativos (S-DTH-) foram testados novamente e agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania*: (A) S+DTH+, (B) S+DTH-, (C) S-DTH+ e (D) S-DTH-. O valor do eixo Y corresponde a densidade óptica (405 nm) anti-saliva de *L. longipalpis*. As barras mostram a mediana \pm 1 desvio padrão. Os valores foram considerados significantes a partir de $p < 0.05$.

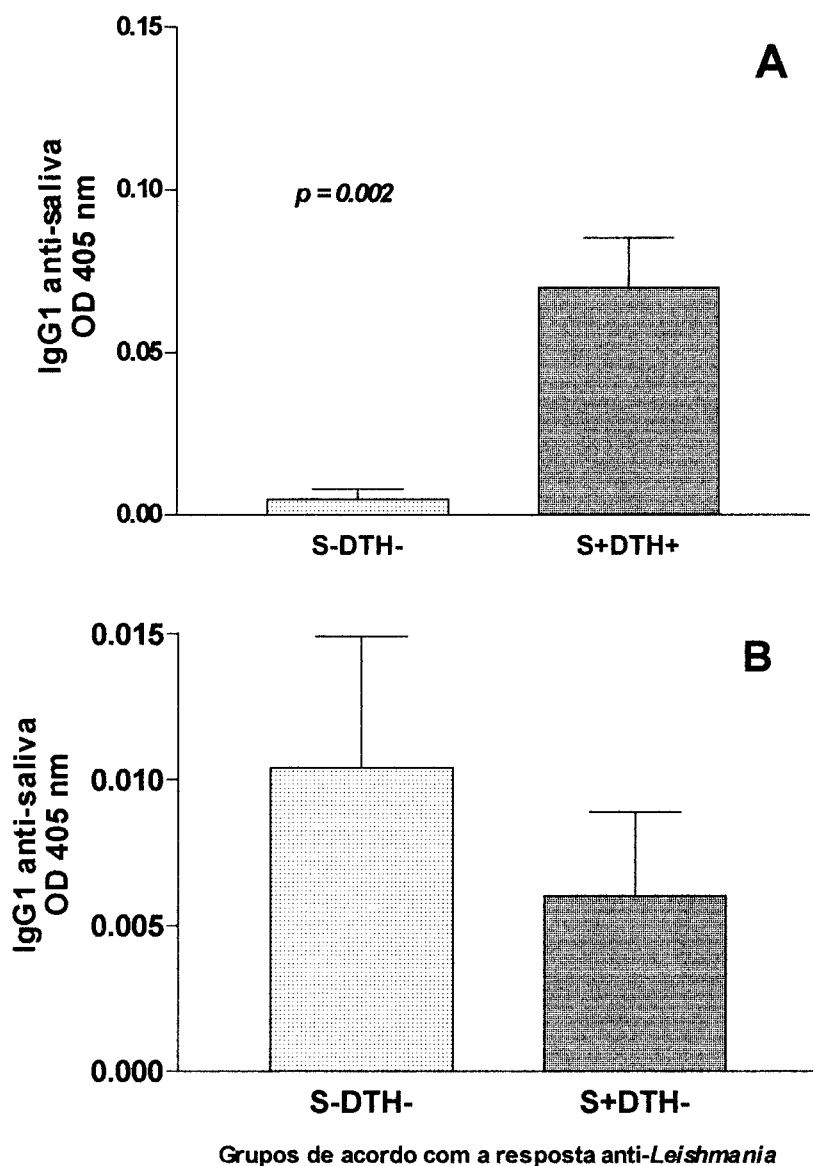


Figura 4. Anticorpos IgG1 contra glândula salivar de *L. longipalpis* detectado por ELISA. Os soros (15 de cada grupo) que tiveram ELISA e DTH anti-*Leishmania* negativos (S-DTH-) foram testados novamente e agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania*: (A) S+DTH+ e (B) S+DTH-. Os valores foram considerados significantes a partir de $p < 0.05$. As barras mostram a mediana ± 1 desvio padrão.

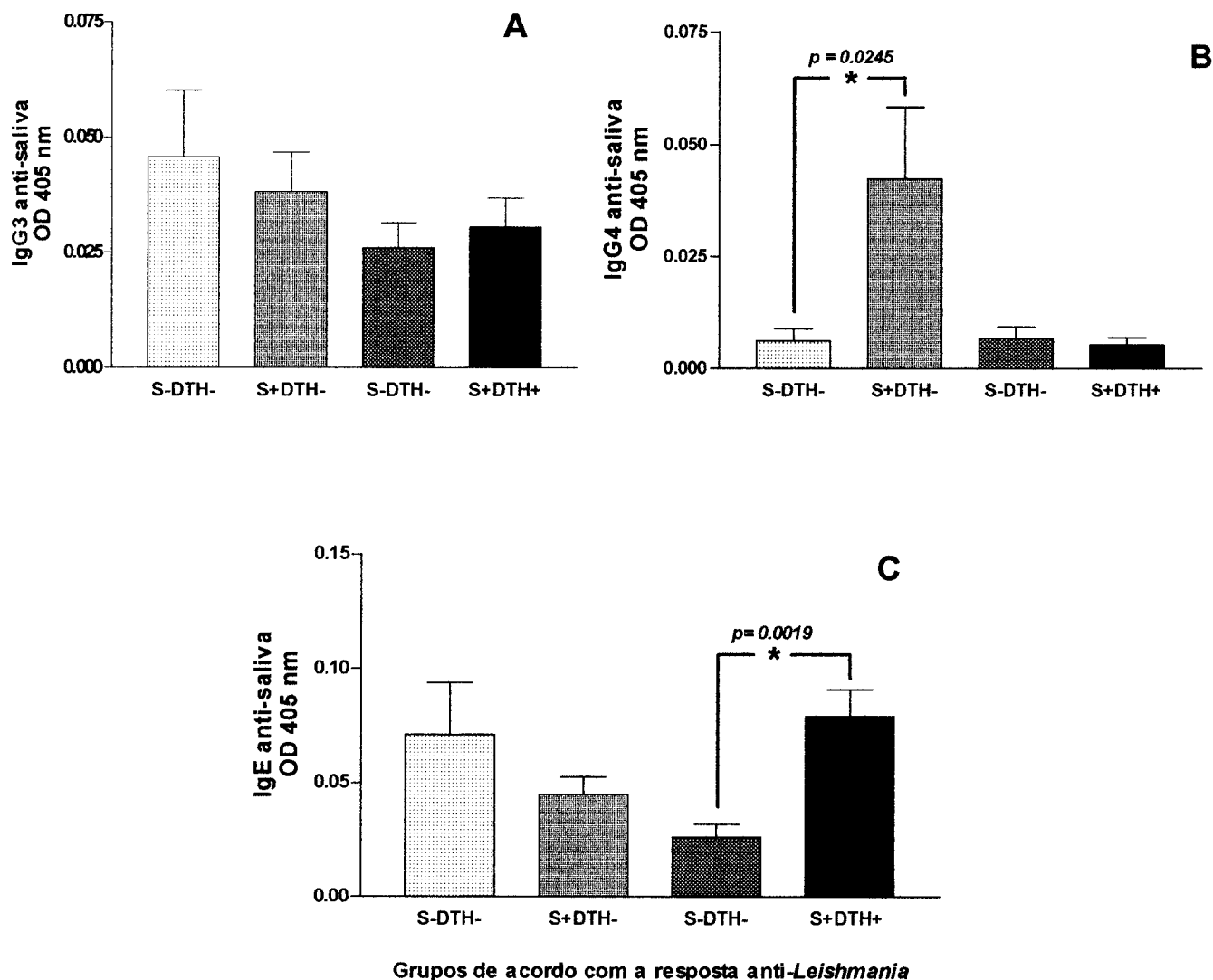


Figura 5. Anticorpos (A) IgG3, (B) IgG4 e (C) IgE contra a glândula salivara de *L. longipalpis* detectado por ELISA. Os soros (15 de cada grupo) que tiveram ELISA e DTH anti-*Leishmania* negativos (S-DTH-) foram testados novamente e agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania* (S+DTH- e S+DTH+). As barras mostram a mediana \pm 1 desvio padrão. Os valores foram considerados significantes a partir de $p < 0.05$.

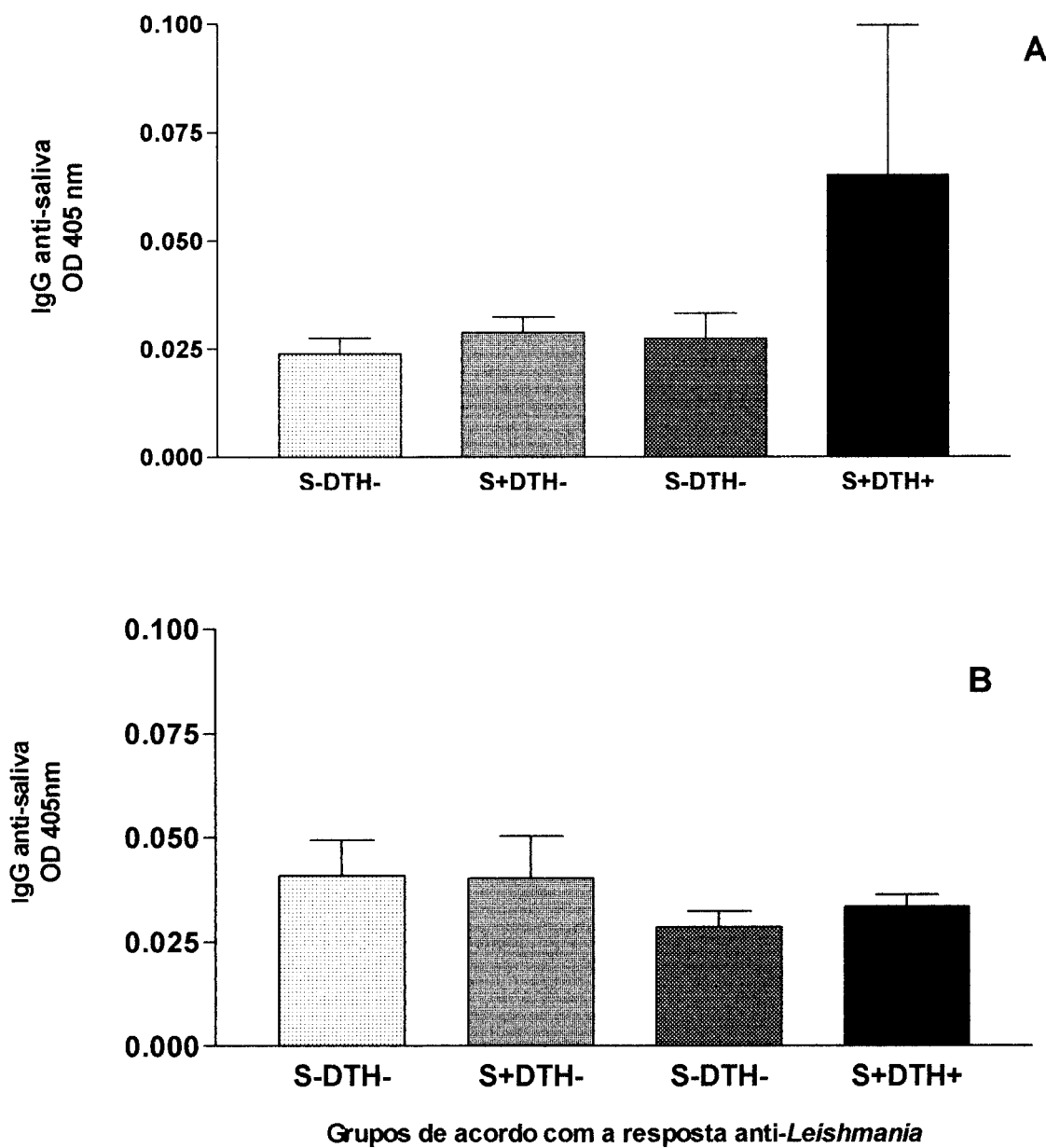


Figura 6. Anticorpos IgG contra a glândula salivar de (A) *Phlebotomus papatasi* e (B) *Lutzomyia whitmani* detectados por ELISA. Os soros (15 de cada grupo) que tiveram ELISA e DTH anti-*Leishmania* negativos (S-DTH-) foram testados novamente e agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania* (S+DTH- e S+DTH+). As barras mostram a mediana \pm 1 desvio padrão.

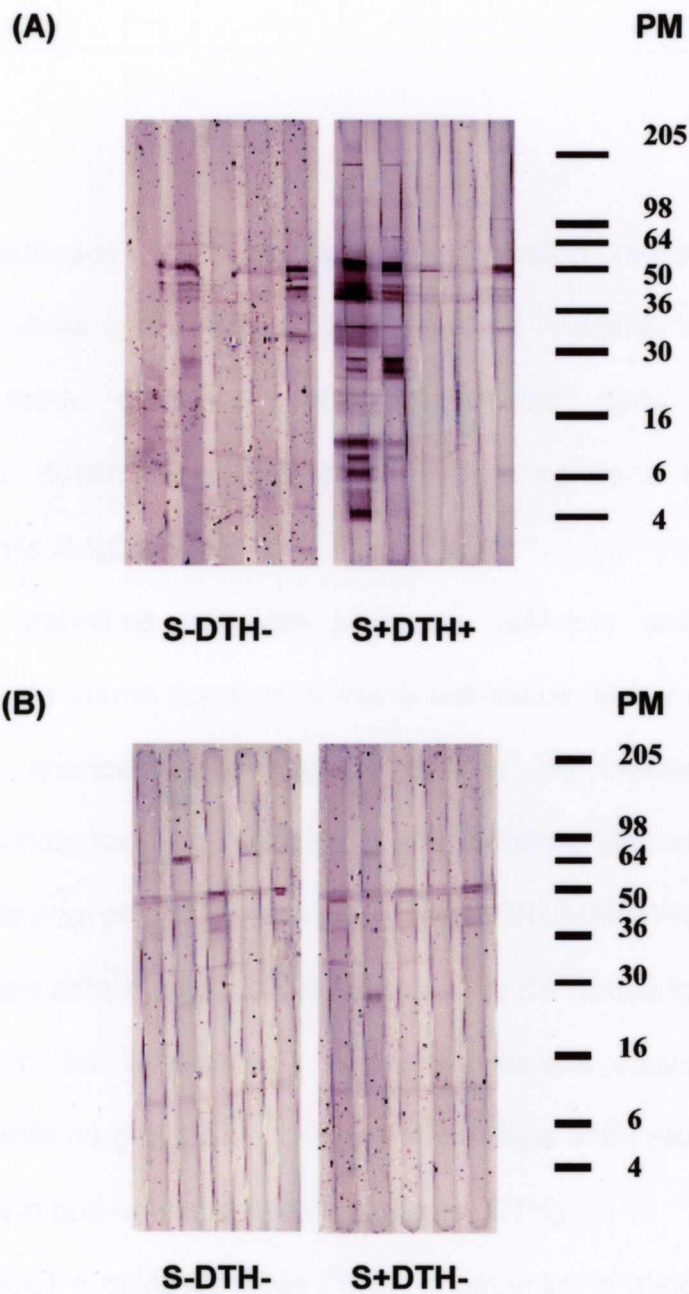


Figura 7. Western blot indicando IgG humano contra antígenos da glândula salivar de *L. longipalpis*. Cinco indivíduos que tiveram ELISA e DTH anti-*Leishmania* negativos foram testados novamente e agrupados de acordo com a resposta anti-*Leishmania*: (A) S+DTH+ e (B) S+DTH-. PM corresponde ao Peso Molecular.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que crianças residentes numa área endêmica de Leishmaniose Visceral e que apresentam conversão do teste cutâneo contra *Leishmania* após seis meses de acompanhamento, desenvolvem anticorpos séricos contra o lisado da glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.

Alguns trabalhos clássicos utilizando glândula salivar de mosquitos avaliaram a resposta imune humoral humana anti-saliva. Estes estudos mostraram que, adultos e crianças sensíveis a picadas de mosquitos, apresentam freqüentemente anticorpos circulantes IgE e IgG4 contra a glândula salivar de *Aedes communis* e *Aedes aegypti* (REUNALA et al., 1994; BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1994). No nosso estudo, foi observada elevação do isotipo IgE. O isotipo IgG4 anti-saliva também foi evidenciado de uma maneira muito discreta, porém significativo, somente no grupo que converte a sorologia anti-*Leishmania*, mantendo-se ausente no grupo que converte o teste cutâneo (DTH).

PALOSUO e colaboradores (1997) mostraram a elevação da subclasse IgG1, sendo a produção destes anticorpos mais evidente no período do ano em que a presença do mosquito é mais intensa, quando aumenta o grau de exposição das pessoas. Neste mesmo estudo, não foi evidenciada a presença das subclasses IgG2 e IgG3. Os nossos dados mostram uma elevação importante de IgG1 no grupo de crianças que converte o teste cutâneo (DTH) sugerindo uma maior exposição deste grupo ao vetor *L. longipalpis*. PUNNOVEN e colaboradores (1990) mostraram que a produção simultânea de anticorpos IgG4 e IgE anti-saliva é diretamente influenciada

pelo efeito das citocinas IL-4 e IL-13 nas células B. Estes dados indicam que uma exposição sazonal ao mosquito leva a um aumento da produção de anticorpos anti-saliva do mosquito.

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* tem sido encontrado durante todo o ano em áreas endêmicas e urbanas (DEANE & DEANE., 1962; SHERLOCK., 1969; COSTA et al., 1990). REBELO (2001) relata a presença anual do *Lutzomyia longipalpis* na ilha de São Luís, no estado do Maranhão, onde o vetor tem sido encontrado em alta frequência, em todos os meses do ano, tendendo a ser mais abundante no período chuvoso (57,2%) do que no seco (42,8%). Estas características da região aumentam as chances de exposição a picadas nos indivíduos que ali residem, entre elas os indivíduos que participaram do nosso estudo, provocando possivelmente um aumento no perfil de anticorpos anti-saliva do vetor. Contudo, observamos que a elevação dos anticorpos não acontece homogeneamente na população. Esta elevação foi mais importante nos indivíduos que converteram a sua resposta imuno celular contra *Leishmania*, evidenciando variações. É possível que subgrupos da população sejam mais expostos que outros e que a taxa de exposição seja relevante na possível proteção contra a leishmaniose.

A presença de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no nosso trabalho sugere a ocorrência de hipersensibilidade do tipo imediata provocada pela saliva do *L. longipalpis*. MELLANBY (1946) propôs experimentalmente o desenvolvimento de uma reação imune resultado de picadas repetidas por mosquitos. Após as picadas, a reação que ocorre na pele obedece a um padrão de desenvolvimento: primeiro, as picadas não causam reação (estágio 1); em seguida, uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio aparece (estágio 2); depois, aparecem ambos os

tipos de reação: imediata e do tipo tardio (estágio 3); novamente aparece uma reação do tipo imediata, nesse momento sozinha (estágio 4); e finalmente, não ocorre mais reações (estágio 5). A literatura clássica abordando este tema chama a atenção para o papel da saliva em induzir uma resposta alérgica no hospedeiro (WIKEL et al., 1982). Provavelmente, este perfil de resposta com anticorpos IgG1, IgG4 e IgE mostrado nos nossos resultados, pode estar acompanhando a progressão dos estágios de reação na pele.

A grande produção de IgG, IgG1 e IgE nos indivíduos com DTH anti-*Leishmania* positivo, pode ser resultado de uma intensa exposição ao antígeno da saliva. Como se sabe, imunoterapias favorecem a produção de IgG4 e IgG1 e que imunizações prolongadas levam a uma mudança na taxa de isotipos IgG4/IgG1 (AALBERSE et al., 1983; BIRKNER et al., 1990). O aumento da quantidade de anticorpos IgG1 seria resultado desta contínua exposição. Provavelmente este grupo estaria sendo mais exposto não só a saliva do vetor sem *Leishmania*, mas também ao vetor infectado, já que estas mesmas pessoas são capazes de produzir anticorpos anti-saliva e uma resposta celular contra o antígeno de *Leishmania*.

Outro achado nos nossos resultados que nos leva a acreditar em uma maior exposição deste grupo a picadas, é o reconhecimento de uma grande variedade de bandas pelo soro destes indivíduos quando foram analisados por imunoblotting utilizando antígeno da glândula de *L. longipalpis*. Os indivíduos deste grupo produzem anticorpos IgG anti-saliva capazes de reconhecer bandas com pesos moleculares de 4, 6, 30, 36 e 50 kDa. Apesar de acreditarmos que exista uma exposição semelhante ao vetor neste grupo, alguns indivíduos respondem diferentemente as proteínas da saliva do flebótomo. O soro destes indivíduos

reconhecem poucas bandas (praticamente só a de 50 kDa) quando avaliados por imunoblotting. Provavelmente os mais reativos desenvolvem proteção já que além de reconhecer uma maior variedade de bandas eles convertem o teste cutâneo anti-*Leishmania*. Para testarmos esta hipótese, seria necessário um estudo de cluster na área endêmica. O que nos gostaríamos de esclarecer é se os indivíduos de maior reatividade anti-saliva, ficam em alguma micro-região (dentro da área) que tenha características diferentes, como por exemplo, uma distribuição espacial de flebótomos diferente. Um ensaio com voluntários que está sendo desenvolvido no nosso laboratório, poderá nos fornecer alguns dados onde talvez possamos saber se a resposta imune anti-saliva depende de uma maior exposição ao vetor ou de uma resposta individual do hospedeiro.

Por outro lado, Indivíduos que ao longo deste acompanhamento convertem somente a sorologia anti-*Leishmania*, apresentam nos dois momentos de avaliação contra o antígeno de *Leishmania*, uma banda em comum de 50 kDa. A produção de anticorpos anti-saliva avaliado por ELISA neste grupo é baixa quando comparada com o grupo que converte o teste cutâneo anti-*Leishmania*. A banda evidenciada (50 kDa) neste grupo de indivíduos com uma resposta baixa de anticorpos anti-saliva pode ser provocada pela baixa exposição ao vetor. Esta banda poderia ser usada no diagnóstico de exposição. Outra hipótese seria a ocorrência de reação cruzada com outro vetor artrópode.

Alguns trabalhos relataram a ocorrência de reações cruzadas com antígenos da saliva de vetores. SCHWARTZ e colaboradores (1990), por exemplo, demonstraram que a produção de anticorpos anti-saliva de carrapato, vetor da doença de Lyme, correlacionava-se com o aumento dos títulos de anticorpos contra o agente etiológico *Borrelia burgdorferi*. No entanto, no mesmo material, foi possível

detectar anticorpos anti-saliva de *Dermacentor burgdorferi*, carrapato não vetor da doença de Lyme e anticorpos anti-saliva de *Aedes aegypti*. Observou-se também a ocorrência de reatividade cruzada quando se analisa anticorpos anti-saliva de *Aedes punctator* e *Aedes communis* (BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1997). Com o objetivo de utilizar proteínas específicas, uma proteína recombinante da glândula salivar do carrapato *Ixodes scapularis* tem sido utilizada atualmente como um marcador de exposição da doença de Lyme, onde a produção de anticorpos contra o antígeno recombinante da glândula salivar correlaciona-se com uma diminuição da taxa de alimentação do carrapato no homem (SANDERS et al., 1998; SANDERS et al., 1999). Por outro lado, VOLF & ROHOUSOVA (2001) encontraram diferenças importantes nos componentes do lisado da glândula salivar dos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*. Os anticorpos produzidos nos animais picados pelos flebótomos *Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus* e *P. halepensis*, reconhecem somente antígenos da glândula de cada espécie correspondente, não ocorrendo inclusive reações cruzadas.

Os nossos resultados mostram que quando avaliamos a produção de anticorpos IgG contra o lisado de glândula salivar de *Lutzomyia whitmani* e *Phlebotomus papatasi*, em todos os grupos de indivíduos, não ocorre produção de anticorpos anti-saliva contra nenhuma das duas espécies. Estes resultados nos mostram que a resposta de IgG contra o antígeno da glândula salivar de *L. longipalpis* não é devido a uma ativação policlonal inespecífica de IgG. Estes dados, no entanto, não excluem a possibilidade de reações cruzadas contra o antígeno da glândula de outros vetores. VOLF e colaboradores (2000) já haviam demonstrado que as proteínas da glândula salivar dos flebótomos do Velho Mundo possuem diferenças que se modificam com a idade do inseto quando comparados com os

flebotomos do Novo Mundo. WARBURG e colaboradores (1994) demonstraram que a composição da saliva de subespécies de *L. longipalpis*, com origens geográficas diferentes, varia consideravelmente. Além da composição, observa-se também uma variação nas funções imunomodulatória e anti-homeostática presentes na saliva destas subespécies de *L. longipalpis* (LANZARO et al., 1999).

BARRAL e colaboradores (2000) mostraram pela primeira vez que pessoas expostas à *Leishmania* reconhecem antígenos da glândula salivar do flebotomo ao mesmo tempo em que existe uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos IgG anti-saliva e a resposta ao antígeno de *Leishmania* por DTH. Acredita-se que neste grupo com DTH positivo estariam os indivíduos protegidos de uma possível infecção por sua capacidade de montar uma resposta imune recente contra antígenos de *Leishmania*. Apesar deste grupo apresentar uma maior concentração de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis*, o papel destes anticorpos contendo um possível efeito protetor em relação ao desenvolvimento da doença, ainda não foi esclarecido. É possível que os anticorpos neutralizem os produtos da saliva dos flebotomos, reduzindo a ação depressora sobre os macrófagos, o que favoreceria uma melhor apresentação de antígeno e o desenvolvimento da imunidade celular. Também é possível especular que a conseqüente redução da carga parasitária influencie no desenvolvimento mais eficiente da resposta imune.

Repetidas picadas pelos vetores demonstram resultar na produção de anticorpos anti-saliva (REUNALA et al., 1994; PENG et al., 1998). O estabelecimento de vários modelos animais tem não só demonstrado a produção de anticorpos anti-saliva, como também tem procurado elucidar o possível papel protetor destes anticorpos (CROSS et al., 1993; MATHEWS et al., 1996; GHOSH et al., 1998; BELKAID et al., 1998; KAMHAWI et al., 2000; VALENZUELA et al., 2001).

WIKEL e colaboradores (1997) demonstraram a produção de anticorpos circulantes anti-saliva de carrapato em camundongos e gado. Os autores verificaram que estes anticorpos promovem uma resistência no hospedeiro mediada por complemento. Esta resposta tem sido utilizada como uma forma de controlar o vetor. MATHEWS e colaboradores (1996) mostraram a capacidade dos anticorpos anti-saliva em neutralizar a bioatividade dos componentes da glândula salivar do mosquito *Anopheles stephensis*, em camundongos imunizados por picadas repetidas. Os anticorpos resultados desta imunização atuam contra a apirase, uma enzima pertencente à composição da glândula salivar deste mosquito.

O primeiro estudo experimental avaliando o efeito dos anticorpos anti-saliva de flebótomos em animais expostos a picadas foi desenvolvido por GHOSH e colaboradores (1998). Hamsters expostos a picadas de *Phlebotomus argentipes*, desenvolvem altos títulos de anticorpos aparentemente relacionados com o aumento da mortalidade destes insetos quando se alimentam nestes animais imunizados.

BELKAID e colaboradores (1998) foram, no entanto, os primeiros a demonstrarem o papel protetor dos anticorpos anti-saliva, em camundongos, resultados de uma pré-exposição ao lisado da glândula salivar do *Phlebotomus papatasi*. A exacerbação da infecção observada em camundongos BALB/C e C57BL/6 inoculados com *Leishmania major* mais o lisado da glândula salivar do *P. papatasi* foi revertida nos animais pré-expostos ao lisado da glândula.

Na mesma linha de investigação, experimentos envolvendo a transmissão de *L. major* para camundongos através da picada natural de *P. papatasi* infectados, mostraram que animais previamente expostos a picadas de flebótomos apresentaram uma redução significativa das lesões, quando comparadas com camundongos não expostos (KAMHAWI et al., 2000). Como exemplo de proteção

promovida pela pré-exposição a picadas dos flebótomos, o camundongo C57BL/6 mostrou, além da redução das lesões e da carga parasitária, uma diminuição na habilidade de infectar flebótomos quando alimentados nestes animais. A proteção montada pelos camundongos estaria diretamente relacionada a uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), provocada pelas picadas ou inoculação de saliva previamente. A presença de IFN- γ e IL-12 no local da picada também foi associada à proteção adquirida pelos animais pré-expostos.

Recentemente, BELKAID e colaboradores (2000) mostraram que, a pré-exposição à saliva de flebótomos pode modificar o comportamento alimentar destes insetos devido a uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) localizada. Os autores relatam que o *P. papatasi* alimenta-se com uma maior facilidade no local da picada onde ocorre DTH, beneficiando-se do aumento do fluxo sanguíneo. Em outro estudo recente, conduzido por VALENZUELA e colaboradores (2001), os autores testaram a imunogenicidade de um dos componentes da glândula salivar do *P. papatasi*. Uma proteína da glândula com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, foi capaz de conferir proteção em camundongos imunizados e posteriormente desafiados com parasita mais saliva. Esta proteína produz, ao mesmo tempo, uma forte resposta imune humoral e DTH. A proteção adquirida pelos camundongos foi atribuída ao DTH. O argumento contra o papel dos anticorpos produzidos contra a proteína baseia-se na observação de que camundongos deficientes de células B também apresentaram proteção.

Como nas avaliações de experimentos com material humano, os modelos animais não elucidam o papel dos anticorpos produzidos pelas picadas ou inoculações de saliva de flebotomíneo. Os nossos resultados mostram que indivíduos que residem em área endêmica e que convertem o DTH anti-*Leishmania*

(resolução espontânea da infecção com resposta imune recente), são capazes de produzir anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis*. Estes dados estariam de acordo com a hipótese de outros autores (BELKAID et al., 1998; GHOSH et al., 1998) sugerindo que a imunidade desenvolvida contra a saliva dos flebótomos pode influenciar a resposta imune contra a *Leishmania*, resultando em proteção contra a infecção. No entanto, um papel protetor destes anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* ainda não foi estabelecido no homem. O esclarecimento desta função poderá ter implicações na epidemiologia das leishmanioses e num possível desenvolvimento de novas vacinas anti-*Leishmania*.

7 CONCLUSÕES:

Baseados nos achados de:

- Indivíduos residentes numa área endêmica para LV e que convertem o DTH anti-*Leishmania* num período de seis meses, apresentam aumento na produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgE (mas não de IgG3) contra a glândula salivar de *L. longipalpis*;
- Apesar da diferença encontrada na produção de IgG4 no grupo de indivíduos apresentando sorologia positiva, a produção desta subclasse foi bastante reduzida, sugerindo que este isotipo, assim como IgG3, não deve ser importante numa resposta anti-saliva de *L. longipalpis*;
- Não existiu produção de anticorpos IgG contra a glândula salivar de *P. papatasi* e *L. whitmani* nos indivíduos testados, reforçando a especificidade da resposta anti-*L. longipalpis*;
- O soro dos indivíduos da área endêmica reconhecem diferentes componentes da saliva de *L. longipalpis*, o que pode orientar na estratégia da escolha de antígenos para diagnóstico de exposição ao fleblótomo ou numa futura vacina.

Concluimos que:

Os indivíduos que desenvolvem títulos elevados de anticorpos contra saliva do flebótomo são os mesmos que desenvolvem resposta imuno celular contra *Leishmania*, reforçando a hipótese que a resposta anti-saliva do vetor influencia no desenvolvimento da resposta imune contra o parasita.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C.; GRAAG, R. van der; LEEUWEN, J. Van. Serologic aspects of IgG4 antibodies. 1. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. **J. Immunol.**, **130**:722-726, 1983.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. **Publ. Méd.**, **196**: 71-85, 1956.

ALENCAR, J. E.. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **3**: 175-180, 1961.

ANJILI, C. O.; MBATI, P. A. The Chemotactic Effect of *Phlebotomus duboscqui* (Diptera: Psychodidae) Salivary Gland Lysates to Murine Monocytes. **Acta Trop.**, **60**: 97-100, 1995.

BACELLAR, O.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **24**:791-795, 1991.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **175**: 1515-1518, 1996.

BADARÓ, R. Progressos nas pesquisas de Leishmaniose Visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. Editorial. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, **21**: 159-164, 1988.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; REED, S.; G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **154**:1003-1011, 1986.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M. C. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **19**: 173-191, 1986.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human_leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**: 149-155, 1998.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E. D.; VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; BARRA-NETTO, M.; RIBEIRO, J. M. C. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **62**:740-745, 2000.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. **J. Exp. Med.**, **188**:19-53, 1998.

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D. L.; RIBEIRO, J. M. C. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptative response induced by the fly ?. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **97**:6704-6709, 2000.

BIRKNER, T.; RUMPOLD, H.; JARLIM, E.; EBNER, H.; BREITENBACH, M.; SKVARIL, F.; SCHEINER, O.; KRAFT, D. Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. **Allergy.**, **45**:418-426, 1990.

BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; LAPPALAINEN, P. Detection of Mosquito Saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **93**: 551-555, 1994.

BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOSUO, K. Detection of Mosquito Saliva - specific IgE antibodies by capture ELISA. **Allergy.**, **52**:342-345, 1997.

CALDAS, A. J. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, A. A. M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Pillip. Trans. R. Soc. Lond.**, **95**: 1-8, 2001.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **16**:35-41, 1983.

CARVALHO, E. M.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Absence of gamma-IFN and interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Investig.**, **76**:2066-2069, 1985.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C. E.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **152**:5949-5956, 1994.

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

CERF, B. J.; JONES, T. C.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **156**: 1030-1033, 1987.

COSTA, C. H. N.; GOMES, R. B. B.; SILVA, M. R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K. S.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **182**:997-1000, 2000.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil. **Rev Saúde Públ.**, **24**: 361-372, 1990.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N.; SILVA, A. R. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad. Saúde Públ.**, **11**. 321-324, 1995.

CROSS, M. L.; CUPP, M. S.; CUPP, E. W.; RAMBERG, F. B.; ENRIQUEZ, F. J. Antibody responses of Balb/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (diptera: simuliidae). **J. Med. Entomol.**, **30**:725-734, 1993.

DEANE, L.M. Epidemiologia e Profilaxia do Calazar Americano. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **10**: 431-449, 1958

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital.**, **48**: 61-76, 1955^a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Sobre a biológica do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em área endêmica do Estado do Ceará. I. Distribuição, predominância e variação estacionai. **Rev. Bras. Biol.**, **15**: 83-95, (1955b).

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **4**: 198-212, 1962.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I. A .B.; VASCONCELOS, A . W.; QUEIROZ SOUSA, A .; OLIVEIRA LIMA, J. W.; PERSON, R. D. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, **166**: 1124-1132, 1992

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. **Ed. Edgard Blucher LTDA. vol.4**
1973.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B-cell activation, circulating immune complexes, and autoimmunity in human visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **56**:58-66, 1984.

GUERREIRO, J.; RIBEIRO, S.; CARVALHO, E. M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H. Infecção bacteriana em pacientes portadores de Leishmaniose Visceral. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **80**: 447-452. 1985

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SHEIKY, Y.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL HASSAM, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Investig.**, **92**:324-329, 1993.

GHALIB, H. W.; WHITLE, J. A.; KUBIM, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAM, B. M.; GRABSTEIN G.; TRINCHIER, G.; REED, S. G. Interleukin-12 enhances Th1 type immune response in human *Leishmania donovani* infection. **J. Immunol.**, **154**:4623-4629, 1995

GHOSH, K. N.; MUKHOPADHYAY, J. The Effect of Anti-Sand Fly Antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **Int. J. Parasitoi.**, **28**:275-281, 1998.

HALL, L. R.; TITUS, R. G. Sand Fly Saliva Selectively Modulates Macrophage Functions That Inhibit Killing of *Leishmania major* and Nitric Oxide Production. **J. Immunol.**, **155**: 3501-3506, 1995.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **80**:7011-7015, 1991.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK, R. (Eds.) **The Leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press., v.1 p.1-120, 1987.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature.**, **266**:628-630, 1977.

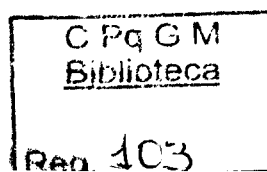
LANZARO, G. C.; LOPES, A. H. C. S.; RIBEIRO, J. M. C.; SHOEMAKER, C. B.; SOARES, M.; TITUS, R. G. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Insect Mol. Biol.**, **8**:267-275, 1999.

LAW, J. H.; RIBEIRO, J. M. C.; WELLS, M. A. Biochemical insights derived from insect diversity. **Annu. Rev. Biochem.**, **61**: 87-111, 1992.

LAURENTI, M.D.; CORBETT, C. E. P.; CHEBABO, R.; TAKAKURA, C. F. H.; BRAZIL, B. G.; SOTTO, M. N. Inflammatory response at the subcutaneous inoculation sites in *L. (L.) chagasi* infection with *Lutzomyia longipalpis* salivary gland lysates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **87**: 110, 1992.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M. C.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry.**, **266**: 11234-11236, 1991.

LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Effects of Sandy Fly Vector Saliva on Development of Cutaneous Lesions and Immune Response to *Leishmania braziliensis* in Balb/c Mice. **Infect. Immun.**, **64**: 5442-5445, 1996.



MATHEWS, G. V.; SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. P. Inhibition of Mosquito Salivary Gland Apyrase Activity by Produced in Mice Immunized by Bites of *Anopheles stephensi* Mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:417-423, 1996.

MAUEL, R. B.; ROWE, D. S. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. III. Inhibition of leishmanial lesion in the guinea-pig by delayed hypersensitivity reaction to unrelated antigens. **Clin. Exp. Immunol.**, **29**:320-325, 1977.

MAUEL, J. Recent advances in the immunology of leishmanial infections (with particular reference to the problem of vaccination). **Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia.**, **47**: 91-112, 1982.

MBOW, M. L.; BLEYENBERG, J. A. ; HALL, L. R.; TITUS, R. G. *Phlebotomus papatasi* Sand Fly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, But Up-Regulates a Th2, Responses in Mice Infected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **161**: 5571-5577, 1998.

MELLANBY, K. Man's reactions to mosquito bites. **Nature.**, **158**:554, 1946.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Investig.**, **72**: 1506-1510, 1983.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/html/leis.html>> Acesso em 02 de novembro de 2001.

PENNA, H. A. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina.**, **48**: 949-950, 1934.

PEARSON, R.; EVANS, T.; WHEELER, D.A.; NAIDU, T. G.; ALENCAR, J. E.; DAVIS, J. S. Humoral factors during South American visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **80**: 465-468, 1986.

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

PEARSON, R.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Leishmania species: visceral (Kalaazar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Eds.) **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, p.2428-2442, 1994.

PEARSON, R.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, **22**:1-13, 1996.

PENG, Z.; SIMONS, F. E. A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **101**:284, 1998.

PENG, Z.; SIMONS, F. E. Cross-reactivity of Skin and Serum specific IgE responses and Allergen Analysis for Three Mosquito species with worldwide distribution. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **100**:192-198, 1997.

PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B.; MCKENZIE, A.; MENON, S.; ZURAWSKI, G.; DE WAAL MALEFYT, R.; DE VRIES, J.. Interleukin-13 induces interleukin-4 independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**:3730-3734, 1990.

REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, **17**: 221-227, 2001.

REUNALA, T.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOSUO, K.; MIYANJI, M.; RUIZ- MALDONADO, R.; LOVE, A.; FRANCOIS, G.; PALOSUO, T. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **104**:366-371, 1994.

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

RIBEIRO, J. M. C.; GONZALES, R.; MARINOTTI, O. A salivary vasodilator in the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 932-936, 1990.

RIBEIRO, J. M. C.; HAZZARD, J. M. H.; NUSSENZVEIG, R. H.; CHAMPAGNE, D.; WALKER, F. A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary nitrosylhemeprotein from the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Science.**, **260**:539-541, 1993.

RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, **161**: 332-344, 1985.

RIBEIRO, J. M. C.; MODI, G. B.; RESH, R. B. Salivary apyrase activity of some old world phlebotomine sand flies. **Insect. Biochem.**, **19**: 409-412, 1989.

RIBEIRO, J. M. C.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Blood finding strategy of a capillary feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **83 A**:683-686, 1986.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann. Rev. Entomol.**, **32**: 463-478, 1987.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. **Science.**, **223**: 1417-1419, 1984.

REED, S.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E.; LORENCO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. J.; JONES, T. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, **35**: 79-85, 1986.

SACKS, D. L.; SCOTT, P. A.; ASOFSKY, R.; SHER, F. A. Cutaneous Leishmaniasis in the anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B-cell-dependent t-cell involved in the suppressor pathway. **J. of Immunology.**, **132**: 2072-2077, 1984.

SANDERS, M. L.; GLASS, G. E.; NADELMAN, R. B.; WORMSER, G. P.; SCOTT, A. L.; RAHA, S.; RITCHIE, B. C.; JAWORSKI, D. C.; SCHWARTZ, B. S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in human after exposure to *Ixodes scapularis* (say) and are correlated with tick engorgement indices. **Am. J. Epidemiol.**, **149**:777-784, 1999.

SANDERS, M. L.; JAWORSKI, D. C.; SANCHEZ, J. L.; DEFRITES, R. F.; GLASS, G. E.; SCOTT, A. L.; RAHA, S.; RITCHIE, B. C.; NEEDHAM, G. R.; SCHWARTZ, B. S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **59**:279-285, 1998.

SCHWARTZ, B. S.; RIBEIRO, J. M. C.; GOLDSTEIN, M. D. Anti-tick antibodies: na epidemiological tool in Lyme disease research. **Am. J. Epidemiol.**, **132**: 58-66, 1990.

SCOTT, P. Interferon gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**:3149-3155, 1991.

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

SHAN, E.; TANIGUCHI, Y.; SHIMIZU, M.; ANDO, K.; CHINZEI, Y.; SUTO, C.; OHTAKI, T.; OHTAKI, N. Immunoglobulins specific to mosquito salivary gland proteins in the sera of persons with common or hypersensitive reactions to mosquito bites. **J. Dermatol.**, **22**:411-418, 1995.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Observações sobre calazar em jacobina, Bahia. IV. Variação horária e estacional de *Phlebotomus longipalpis*. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **21**:715-727, 1969.

SOARES, M. B. P.; TITUS, R. G.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J. R.; BOZZA, M. The Vasoactive Peptide Maxadilan from Sand Fly Saliva Inhibits TNF- α and Induces IL-6 by Mouse Macrophages Through Interaction with the PACAP Receptor. **J. Immunol.**, **160**:1811, 1998.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M. C.; TITUS, R. G. Analysis of the Enhancing Effect of Sand Fly Saliva on Infection with *Leishmania* in Mice. **Infect. Immun.**, **59**: 1592-1598, 1991.

THEODOS, C. M.; TITUS, R. G. Salivary Gland Material from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* has an Inhibitory effect on Macrophage Function in vitro. **Parasite Immunol.**, **15**:481-487, 1993.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. The Role of Vector Saliva In Transmission Of Arthropod-Borne Disease. **Parasitol. Today.**, **6**:157-160, 1990.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C.. Salivary Gland Lysates from the Sandy Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. **Science.**, **239**: 1306-1308, 1988.

VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C. Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipteran *Cimex lectularius*. **J. Exp. Biol.**, **201**: 2659-2664, 1998.

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

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

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

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philipp. Trans. R. Soc. Lond.**, **345**: 223-270, 1994.

WHO. World Health Organization. AIDS, leishmaniasis dangers of clash highlighted. **TDR news**, **36**: 1-11, 1991.

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

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K.; BURKOT, T. R.; PIESMAN, J.. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. **Infect. Immun.**, **65**:335, 1997.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Gainesville, FL: Associated Publishers.** 1994