

Influência da Saliva de Flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana

Role of Sand Fly Saliva in Experimental and Human Leishmaniasis

Clarissa Teixeira^{1,2}, Regis Gomes^{1,2}, Manoel Barral-Netto^{1,2,3}, Aldina Barral^{1,2,3}, Cláudia Brodskyn^{1,2,3}
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ¹; Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA²; Instituto de
Investigação em Imunologia; Salvador, BA, Brasil

A leishmaniose é transmitida pela picada do vetor flebotomíneo infectado. A saliva deste flebótomo possui um repertório de moléculas que modulam as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro. Os eventos iniciais entre a leishmania e o sistema imune do hospedeiro estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da infecção ou à proteção contra o parasita. Os componentes da saliva influenciam diretamente essas interações. Estes componentes têm sido bastante explorados e vários trabalhos na literatura têm estudado estes aspectos. Nesta revisão, discutimos as contribuições da literatura, que procuram esclarecer a influência da saliva na resposta imune inicial anti-leishmania do hospedeiro e no estabelecimento da infecção, trazendo novas perspectivas para o tratamento, controle e profilaxia da doença.

Palavras-chave: Vetor, saliva, *Leishmania*, infecção.

Leishmaniasis are transmitted to their vertebrate host by infected phlebotomine sand fly. The saliva from these insects contains a repertoire of pharmacologically active molecules that are able to interfere with the host's haemostatic, inflammatory and immune responses. The initial events between Leishmania and the host's immune response are directly related to disease progression or protection against the parasite, and saliva contributes directly to these interactions. Recent work in the literature has described these aspects, and these interactions have been extensively investigated. In this literature review, we have identified reports that explain the role of saliva in the initial immune response against Leishmania in the host and against infection, bringing new perspectives for treatment, prophylaxis and disease control.

Key words: Vector, saliva, *Leishmania*, infection.

As leishmanioses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* constituem um problema sério de saúde pública em várias regiões do mundo. Os flebotomíneos, vetores das leishmanioses, ingerem os parasitas quando picam o hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas, que vivem de forma intracelular no hospedeiro vertebrado, transformam-

se em promastigotas no intestino do vetor, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas por volta de uma semana. A infecção por leishmania ocorre quando a fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo, necessário para maturação dos ovos, inocula o parasita no hospedeiro vertebrado⁽¹⁵⁾. Durante esse processo, o conteúdo da glândula salivar é depositado no local da picada, promovendo o bloqueio de mecanismos hemostáticos do hospedeiro que beneficiam o vetor na obtenção do alimento. Recentemente, a importância dos componentes da glândula salivar dos flebotomíneos em estabelecer uma infecção eficiente por leishmania, tem se tornado mais clara, trazendo novas perspectivas para o controle da doença.

Recebido em 22/02/2005 Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dra. Cláudia Brodskyn, R. Waldemar Falcão, 121, 40296-710 Salvador, BA, Brasil, Tel.: 55 71 3356 4320; FAX: 55 71 3356 4320, ramal: 261.

E-mail: brodskyn@cpqgm.fiocruz.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:18-23.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

Caracterização dos Componentes Salivares de Flebotomos

A obtenção de sangue como alimento para o vetor flebotomíneo tem como maior desafio enfrentar as dificuldades impostas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. A hemostasia, processo utilizado pelo hospedeiro para evitar a perda de sangue, é controlada por componentes anti-coagulantes, anti-agregação plaquetária e vasodilatadores da saliva^(13, 14, 18). Algumas dessas moléculas já foram caracterizadas, como a hialuronidase, que auxilia na difusão de outros componentes; a apirase, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaciclina, que bloqueiam a agregação plaquetária e promovem a dilatação sanguínea. Dentre as substâncias vasodilatadoras, o maxadilán, presente apenas na saliva de *L. longipalpis*, foi caracterizado como um potente vasodilatador⁽¹⁰⁾. Estas moléculas, com funções redundantes e sinérgicas, têm como objetivo principal a formação do “lago sanguíneo” para obtenção de alimento por parte dos flebotomos⁽¹³⁾.

Devido à importância da saliva no repasto sanguíneo dos flebotomíneos, na imunidade do hospedeiro e transmissão do patógeno, a caracterização dos componentes salivares responsáveis por essas atividades é necessária para compreender os mecanismos de ação bem como desenvolver novas estratégias para bloquear a transmissão do patógeno. A purificação dos componentes salivares tem sido um desafio devido à pequena quantidade de proteínas da glândula salivar. Muitas proteínas salivares com atividades anti-hemostáticas, inflamatórias e imunomodulatórias foram isoladas seguindo abordagens bioquímicas e da biologia molecular.

Novas abordagens experimentais encontram-se em desenvolvimento, na tentativa de se caracterizar moléculas presentes nas glândulas salivares dos vetores. As abordagens experimentais têm mudado do estudo de uma única molécula presente na glândula salivar para o estudo do complexo total de genes e proteínas secretadas pelos artrópodes, usando uma abordagem de “alta performance” (high-throughput). A idéia é combinar um protocolo de seqüência massiva de bibliotecas de cDNA da glândula salivar, uma

abordagem proteômica para isolar um grande grupo de proteínas salivares e ensaios de alta performance funcionais e biológicos para analisar e testar as atividades biológicas destas novas moléculas^(20,22). Estudos de alta performance genômicos e proteômicos têm resultado na descoberta de genes e proteínas que não foram anteriormente descritas em artrópodes. Essas novas abordagens permitem não somente a caracterização de fatores salivares envolvidos em homeostase e inflamação, mas também a identificação de novas proteínas salivares, cujas funções biológicas ainda não são conhecidas.

Outra alternativa para a genômica funcional é o uso da vacinação de DNA. A obtenção de plasmídeos contendo um promotor e cDNAs selecionados que podem ser injetados no animal para a indução de uma resposta imune seria mais eficiente do que produzir grandes quantidades de uma proteína recombinante para injetar em animais para produção de anticorpos⁽²¹⁾.

O Papel da Saliva em Modelos Experimentais

As proteínas salivares do vetor têm capacidade de modificar a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro. Como consequência, o parasita que é inoculado na derme durante a alimentação é favorecido pela presença da saliva, já que a mesma é capaz de exacerbar a infecção por leishmanias em modelos murinos experimentais. A co-inoculação do sonicado de glândula salivar (SGS) de *Phlebotomus papatasi* com *Leishmania major* na pata e, mais recentemente, na derme da orelha de camundongos, resultou em uma exacerbação dramática da lesão^(3,19). A *Leishmania braziliensis*, que normalmente não leva à infecção mesmo em camundongos suscetíveis como BALB/c, quando co-inoculado com SGS de *Lu. longipalpis* resultou em lesões cutâneas progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados e persistência de granulócitos^(6,11,16).

Os componentes presentes na saliva dos flebotomíneos também apresentam atividade imunogênica, induzindo à produção de anticorpos contra diferentes proteínas. O exato papel desses

anticorpos na exacerbação ou proteção à infecção por leishmania ainda não está totalmente esclarecido. Estudos têm sugerido um possível mecanismo de bloqueio na transmissão da leishmania. Animais expostos a picadas de flebótomos ou inoculados com o SGS desenvolvem elevados níveis de anticorpos IgG anti-saliva^(3,7,9,21,23). Recentemente, nosso grupo mostrou que camundongos BALB/c expostos a repetidas picadas de *Lu. Longipalpis*, transmissor da *L. chagasi*, produz anticorpos anti-saliva, além de um intenso infiltrado inflamatório⁽¹⁷⁾. Neste estudo, observou-se um predomínio de IgG, particularmente IgG1, mas não de IgG2a e IgG2b anti-saliva (Figura 1). A IgG total presente nesses animais reagiu predominantemente com três bandas protéicas presentes no SGS de *L. longipalpis* (16, 44 e 45 kDa). A inoculação de soro proveniente desses animais picados por *L. longipalpis* e previamente incubado com SGS do mesmo vetor, provocou uma resposta inflamatória inicial com a presença quase que exclusiva de neutrófilos, sugerindo a participação de imunocomplexos em gerar uma resposta inflamatória (Figura 1). A pré-exposição a picadas de *P. papatasi* ou inoculação do SGS em camundongos foi capaz de bloquear o estabelecimento da infecção por *L. major*^(3,9,21). Ghosh & Mukhopadhyay (1998)⁽⁷⁾ atribuem aos anticorpos anti-saliva a dificuldade do *P. argentipes* em realizar um eficiente repasto sanguíneo em hamsters imunizados com picadas deste mesmo vetor. A percentagem de engorgitamento sanguíneo diminui e a mortalidade dos flebótomos aumenta à medida que os níveis de anticorpos anti-saliva aumentam nesses animais.

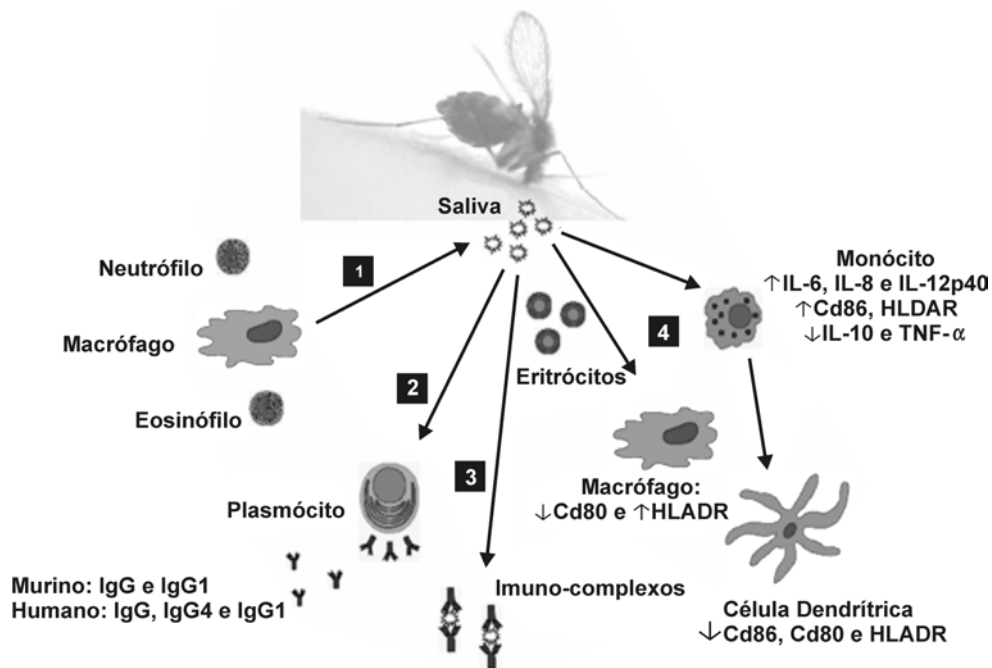
Exposições repetidas à saliva do flebótomo também levam ao desenvolvimento de imunidade celular no hospedeiro contra os produtos salivares, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tardia (RHT) com a presença de células inflamatórias recrutadas para o local da picada. Este recrutamento é um fator importante no estabelecimento da infecção por leishmania, já que este evento facilitaria a penetração e crescimento do parasita no interior destas células. O desenvolvimento de RHT facilitaria também a alimentação do flebótomo. Observou-se que fêmeas

alimentam-se mais rapidamente em hospedeiros que desenvolvem reação de hipersensibilidade tardia; o que pode refletir uma adaptação do vetor à resposta imune do hospedeiro^(4,9).

A saliva também está envolvida no processo inflamatório inicial no hospedeiro. Utilizando o modelo do bolsão de ar inflamatório, temos observado que a saliva de *L. longipalpis* induz a um maior recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e, principalmente, macrófagos, quando comparados à salina ou LPS (dados não publicados). O aumento significativo no recrutamento de macrófagos na presença da saliva está relacionado à presença de CCL2/MCP-1, quimiocina recrutadora de macrófagos. Entretanto, este efeito é bloqueado pela pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH em animais previamente expostos a picadas de *L. longipalpis*. Utilizando este mesmo modelo, observamos um aumento no número de células recrutadas na presença de *L. chagasi*, ou *L. chagasi* mais saliva (dados não publicados). Estes resultados indicam que a saliva contribuiria para uma intensa reação inflamatória no local da picada, atraindo um maior número de possíveis células hospedeiras para a entrada do parasita. Esta atividade pró-inflamatória da saliva também já havia sido observada na saliva de *P. duboscqi* e *P. papatasi*^(1,25). O recrutamento de macrófagos resulta em benefício ao hospedeiro ou à leishmania que dependerá da predominância de macrófagos ativados ou moléculas que causem desativação.

Outro aspecto relevante relacionado ao desenvolvimento de uma RHT é a proteção contra a leishmania em animais que desenvolvem preferencialmente essa reação. Assim, a RHT tornaria o local um ambiente inóspito para o estabelecimento da infecção pela leishmania, ou modificaria o micro-ambiente, contribuindo para o desenvolvimento dos eventos iniciais que iriam influenciar a resposta imune do hospedeiro contra a leishmania. Usando uma abordagem de alta performance, Valenzuela et al. (2001)⁽²¹⁾ isolaram um grande número de proteínas salivares e genes do vetor *Phlebotomus papatasi* e encontraram uma proteína de 15 KDa, denominada PsSP115, capaz de bloquear a transmissão da *L.*

Figura 1. Efeitos da saliva de *Lutzomyia longipalpis* no hospedeiro vertebrado. (1) Infiltrado inflamatório, (2) resposta imune humoral, (3) formação de imuno-complexos e (4) regulação da expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas nas células apresentadoras de antígenos.



major. Assim, animais imunizados com a proteína ou o plasmídeo contendo a seqüência SP15, tornaram-se resistentes a um desafio posterior constituído de parasita mais saliva. Os animais imunizados apresentaram uma intensa resposta celular RHT e alta produção de anticorpos. Os autores verificaram ainda que camundongos, mesmo deficientes de células B, quando imunizados com o plasmídeo, mostraram proteção contra um desafio posterior, sugerindo que a resposta imune celular, caracterizada por RHT, recruta células inflamatórias para o sítio da infecção, como, por exemplo, macrófagos ativados, produzindo NO, radicais livres de oxigênio e IL-12, criando um ambiente inóspito para a leishmania.

A caracterização de um grande número de proteínas salivares e seus respectivos cDNAs permitem-nos testar grande quantidade de candidatos em um sistema determinado. Outra vantagem refere-se à utilização da vacinação de DNA para a busca de candidatos à

vacina, através da produção de proteínas nativas no animal injetado *versus* o uso de proteínas recombinantes. A quantidade de DNA requerida para vacinação é muito menor do que aquela capaz de induzir a uma resposta imune quando da utilização de proteínas recombinantes. Assim, esse tipo de abordagem está acelerando o estudo de proteínas salivares dos vetores transmissores de patógenos. Genes funcionais, previamente não relatados na saliva dos artrópodes, estão agora sendo descritos. Esse tipo de modelo experimental deve contribuir no desenvolvimento de vacinas para doenças transmitidas por vetores.

Dados preliminares do nosso laboratório mostraram que, construções de cDNAs provenientes da glândula salivar de *L. longipalpis*, foram capazes de induzir a uma resposta imune celular e/ou humoral contra antígenos da glândula de *Lu. longipalpis* em hamsters e BALB/c. Além disso, algumas construções de cDNA

foram capazes de proteger animais desafiados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Essas construções de cDNA, que resultaram em proteção, também foram capazes de induzir à reação de RTH nos animais imunizados (dados não publicados).

O Papel dos Componentes Salivares no Homem

Estudos em nosso laboratório sugerem que, em áreas endêmicas para leishmaniose, a exposição a picadas de flebótomos não infectados pode influenciar na epidemiologia da doença. Indivíduos provenientes de áreas não endêmicas correriam um maior risco de desenvolver formas mais graves de leishmaniose, uma vez que seriam imunologicamente “naives”, não somente à leishmania, mas também à saliva do flebótomo. Recentemente, Barral et al. (2000)⁽²⁾ e Gomes et al. (2002)⁽⁸⁾, desenvolvendo estudos em uma área endêmica para leishmaniose visceral (LV), demonstraram a presença de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* em soros de crianças que residem no mesmo local (Figura 1). Uma forte correlação foi encontrada entre altos níveis de anticorpos IgG anti-saliva e uma resposta de hipersensibilidade tardia (RHT) anti-leishmania⁽²⁾, sugerindo que anticorpos anti-saliva de flebótomos no homem podem servir como marcadores importantes na exposição a vetores das leishmanioses nessas áreas. Estas informações podem ser utilizadas de diversas formas, uma delas seria na identificação da distribuição espacial dos flebótomos em uma determinada área, auxiliando no direcionamento do controle do vetor e da doença. Outra forma seria como marcador de proteção. Indivíduos residentes em uma área para LV que são RTH positivos para antígenos de leishmania e, portanto, estariam protegidos contra a infecção, desenvolvem uma resposta de anticorpos IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*. Por outro lado, indivíduos da mesma área que possuem somente resposta sorológica positiva para antígenos de leishmania, RHT anti-leishmania negativo (não protegidos), apresentam baixos níveis de anticorpos anti-saliva. No soro das crianças que convertem o RHT para leishmania, foram detectadas,

principalmente, as subclasses IgG1 e IgE⁽⁸⁾. A IgG1 tem sido relacionada a uma resposta Th1 no homem, enquanto que o aumento de IgE sugere o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade imediata, já que é considerada como marcador de resposta do tipo Th2. Esse tipo de resposta mista (Th1/Th2) tem sido relatado em indivíduos expostos a picadas de outros vetores. A reação se inicia com RHT, seguida de uma reação de hipersensibilidade imediata, sendo finalizada com dessensibilização⁽¹²⁾. Os antígenos salivares reconhecidos pelos anticorpos anti-saliva presentes nos soros dos indivíduos da área endêmica estão dispostos respectivamente em um grupo de proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 45, 44, 43, 35, 27 e 16 kDa⁽⁸⁾.

A saliva também exerce um efeito direto sobre células apresentadoras de antígenos. O SGS de *Lu. longipalpis* foi capaz de inibir a produção de IL-10 e TNF- α e elevar a produção de IL-6, IL-8 e IL-12p40 por monócitos e células dendríticas humanas estimuladas com LPS (Figura 1). A expressão de moléculas co-estimulatórias, importantes na ativação e manutenção da resposta de linfócitos T, também foi alterada em monócitos (elevação de CD86 e HLA-DR) e macrófagos (redução de CD80 e elevação de HLA-DR). A redução na expressão dessas moléculas foi observada na diferenciação de células dendríticas e na maturação induzida por CD40L. A pré-incubação da saliva com anticorpos anti-SGH bloqueou os efeitos da saliva anteriormente descritos, evidenciando a importância dos anticorpos na neutralização dos possíveis efeitos deletérios da saliva ao sistema imune do hospedeiro⁽⁵⁾.

Em conclusão, o estudo da saliva em modelos experimentais ou *in vitro* tem trazido novos esclarecimentos com relação ao estabelecimento da infecção. Estes novos aspectos também abrem novas perspectivas quanto a possíveis novos candidatos para a construção de uma vacina eficaz. A utilização de vacinas de DNA poderá ser uma excelente alternativa na indução de uma resposta imune eficaz contra produtos da saliva destes vetores, bloqueando conseqüentemente a transmissão da leishmania veiculadas por estes insetos.

Referências Bibliográficas

1. Anjili C, Mbatia P, Mwangi R, Githure J, Olobo J, Robert L, Koech D. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60: 10097-10100, 1995.
2. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton E, Valenzuela J, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro J. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62: 740-745, 2000.
3. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks D. 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. *The Journal of Experimental Medicine* 16: 1941-1953, 1998.
4. Belkaid Y, Valenzuela J, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 97: 6704-6709, 2000.
5. Costa D, Favali C, Clarêncio J, Afonso L, Conceição V, Miranda J, Titus R, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72: 1298-1305, 2004.
6. Donnelly K, Lima H, Titus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *Journal of Parasitology* 84: 97-103, 1998.
7. Ghosh K, Mukhopadhyay J. The effect of anti-sand fly antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 28: 275-281, 1998.
8. Gomes R, Brodskyn C, Oliveira C, Costa J, Miranda J, Caldas A, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1530-1532, 2002.
9. Kamhawi S, Yasmine B, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354, 2000.
10. Lerner E, Ribeiro J, Nelson R, Lerner M. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266: 11234-11236, 1991.
11. Lima H, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64: 5442-5445, 1996.
12. Mellanby K. Natural history of vertebrate host response to insect bites. *Nature* 158: 554-555, 1946.
13. Ribeiro J. Blood-feeding arthropod: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143-152, 1995.
14. Ribeiro J. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Annu Rev Entomol* 32: 463-478, 1987.
15. Sacks D, Perkins P. Identification of an infective stage of leishmania promastigotes. *Science*: 1417-1419, 1984.
16. Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173: 49-54, 1991.
17. Silva F, Gomes R, Prates D, Miranda J, Andrade B, Barral-Netto M, Barral A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72: 94-98, 2005.
18. Stark K, James A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 273: 20802-20809, 1998.
19. Titus R, Ribeiro J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. *Science* 239: 1306-1308, 1988.
20. Valenzuela J. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1199-1209, 2002.
21. Valenzuela J, Belkaid Y, Garfield M, Mendez S, Kamhawi S, Rowton E, Sacks D, Ribeiro J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342, 2001.
22. Valenzuela J, Garfield M, Rowton E, Pham V. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3717-3729, 2004.
23. Volf P, Rohousova I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37-41, 2001.
24. Vries J, Carballido J, Sornasse T, Yssel H. Antagonizing the differentiation and functions of human T helper type 2 cells. *Curr Opin Immunol* 7: 771-778, 1995.
25. Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 31: 810-814, 2001.