UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Avaliação da atividade anti-hemostática e anti-complemento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de hospedeiros previamente imunizados pela picada do inseto

Isabella Góes Mantini da Cunha

Belo Horizonte
MINAS GERAIS – BRASIL

2021

Isabella Góes Mantini da Cunha

Avaliação da atividade anti-hemostática e anti-complemento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de hospedeiros previamente imunizados pela picada do inseto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Co-Orientador: Dr. Adalberto Alves Pereira Filho

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPEMIG

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia – ICB | UFMG

Dezembro/2021

Deus infinitamente bom, que o vosso nome seja bendito pelos benefícios que me concedestes; Bons espíritos, que fostes executores da vontade de Deus, e vós sobretudo, meu mentor espiritual, eu vos agradeço. Desviai de mim o pensamento de neles conceber o orgulho, e deles fazer um uso que não seja para o bem.

Eu vos agradeço, notadamente pelo auxílio na conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo apoio, especialmente minha mãe (Dona Sandra) e meu pai (Sr Hélio) por tudo que fizeram e fazem por mim. Meus pais são meu maior tesouro e tudo que conquistei em minha vida é dedicado a eles.

Agradeço aos amigos (quem é, sabe) e irmãos (Gio, Paty, Quel, Dei, Cris e Dri) por acreditarem em mim. Agradeço ao meu grande parceiro Gustavo por ter me acompanhado nessa jornada.

Agradeço aos meus amigos de quatro patas que são meu suporte emocional, em especial à Dona Tereza que nos deixou em 2020.

Agradeço aos amigos da biologia e da turma de mestrado de 2019 pela compreensão e parceria.

Agradeço ao PPG em Parasitologia pela oportunidade e às lindas Sumara e Sibele por serem compreensivas, eficientes e amigas.

Agradeço ao apoio das instituições financiadoras, CAPES e CNPq.

Agradeço aos amigos do LFIH pela orientação, parceria, compreensão, apoio e festanças. Obrigada Xandoca, Dona Cosso, Lidi, Nat, Dalbs, Jéssica, César, Denise, Daniel, Luccccas, Randolfo, Dani, Prof Nelder, Prof Marcos, Prof Grasi, Prof Maurício, Prof Léo, Prof Ricardo e todos os outros integrantes (desculpem se eu esqueci alguém).

Agradeço ao meu co, Adalbs, pelo apoio e compreensão. Conseguimos chegar ao final graças à sua ajuda!

Agradeço, do fundo do meu coração, ao meu orientador por tudo que fez por mim nos últimos anos. Sr Neldi, o senhor é um exemplo a ser seguido. O senhor é ótimo professor, orientador, pesquisador e conselheiro. Obrigada!

Resumo

Flebotomíneos são insetos dípteros, pertencentes à família Psychodidae e à sub-família Phlebotominae. As fêmeas desses insetos realizam repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados, e a ingestão de sangue é um processo importante para a maturação dos ovários. Durante o repasto esses insetos podem ser vetores de microrganismos, incluindo protozoários do gênero *Leishmania* sp. Os hábitos de vida, bem como as fontes alimentares, variam de acordo com a espécie do flebotomíneo. Os insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* podem realizar o repasto em variados hospedeiros tais como galinhas, raposas, cães domésticos, roedores e seres humanos. Essa espécie é a principal vetora de *Leishmania infantum* no Novo Mundo, o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA). Por esses motivos, *Lutzomyia longipalpis* é um inseto de grande interesse médico e veterinário. A hematofagia pode ser desafiadora para o inseto, por isso existem uma série de fatores em sua fisiologia que auxiliam na ingestão e digestão do sangue. Um dos artifícios usados por artrópodes hematófagos para facilitar tal processo é a saliva. A saliva é constituída por proteínas que possuem propriedades anti-hemostáticas e imunomodulatórias e, de forma geral, os hospedeiros vertebrados que têm contato com essa saliva produzem anticorpos anti-saliva. O objetivo deste trabalho foi investigar a funcionalidade da saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* na presença desses anticorpos, ou seja, avaliar se os anticorpos anti-saliva se ligavam a proteínas salivares, inibindo suas propriedades anti-hemostáticas e imunomodulatórias. Observou-se que, diante do método de imunização escolhido (picada dos insetos), o soro de camundongos produziu anticorpos e que esses anticorpos foram reativos a 3 bandas de proteínas salivares. Entretanto, nenhuma das funções salivares avaliadas foram afetadas. Isto significa que a maior parte das proteínas da saliva continuam funcionais quando *Lutzomyia longipalpis* se alimenta em animais previamente picados e imunizados permitindo que a hematofagia ocorra. Esse trabalho representa uma parcela dos dados que estão sendo produzidos por nosso grupo, e possui grande importância porque ajuda a elucidar fatores fisiológicos do inseto. A ideia é que, ao fim dos estudos, sejamos capazes de propor estratégias para produção de vacinas que prejudiquem a ingestão de sangue e diminuam o tempo de vida de insetos infectados.

Abstract

Phlebotomines are dipterans, belonging to the Psychodidae family and the Phlebotominae sub-family, whose females perform a blood meal for maturation of the ovaries. During the blood meal, these insects can be vectors of microorganisms, including the protozoa of the genus *Leishmania sp*. The habits of insects, as well as their vertebrate hosts, vary by species. Insects of the species *Lutzomyia longipalpis* feed on various hosts such as chickens, foxes, domestic dogs, rodents and humans. This species is the main vector of *Leishmania infantum* in the New World, the etiologic agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL). For this reason, it is an insect of great medical and veterinary interest. The hematophagy process can be challenging for the insect, so there are a number of factors in its physiology that aid in the ingestion and digestion of blood. One of the devices used by hematophagous arthropods to facilitate this process is their saliva. The saliva is constituted of proteins that have anti-hemostatic and immunomodulatory properties and, in general, vertebrate hosts that come in contact with this saliva produce anti-saliva antibodies. The main objective in this work was to investigate the functionality of female Lutzomyia longipalpis saliva in the presence of these antibodies, in other words, evaluate if the antibodies could bind to the saliva proteins, inhibiting its anti-hemostatic and immunomodulatory properties. It was observed that, given the method of immunization chosen (insect bites), the mouse serum produced antibodies and these antibodies were reactive to 3 salivary protein bands. However, none of the salivary functions evaluated were affected. This means that some of the saliva proteins remain functional when *Lutzomyia longipalpis* feeds on animals previously bitten and immunized, allowing hematophagy to occur. This work represents a portion of the data being produced by our group, and is of great importance because it helps to elucidate physiological factors of the insect. The goal is, at the end of the studies, to propose strategies for the production of vaccines that impair blood intake and reduce the life span of infected insects.

Índice de figuras

FIGURA 1 — Status de Endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo em 2019 (adaptado de WHO, 2019)

FIGURA 2a — Fêmea de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (foto de Nelder Gontijo)

FIGURA 2b — Macho de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (adaptado de Souza et al, 2017)

FIGURA 3 — Ciclo Biológico do vetor *Lutzomyia longipalpis* (adaptado de Sousa-Paula et al, 2020)

FIGURA 4 — Potes para realização de repasto sanguíneo de flebotomíneos em camundongos

FIGURA 5 — Placa de ELISA

FIGURA 6a — As proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* observadas em gel de poliacrilamida.

FIGURA 6b — Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* em gel de poliacrilamida corado com prata.

FIGURA 7 — O reconhecimento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* por anticorpos provenientes de soro de camundongo imune e soro de camundongo imune inativado observado através de ELISA

FIGURA 8a — O reconhecimento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* por anticorpos provenientes de soro de camundongo imune observado através de Western Blotting

FIGURA 8b — Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* observadas em gel de poliacrilamida.

FIGURA 9 — Atividade anticoagulante da saliva de *Lutzomyia longipalpis* mesmo na presença de soro contendo anticorpos anti-saliva.

FIGURA 10 — Inibição da via clássica do sistema complemento humano pela saliva de *Lutzomyia longipalpis* mesmo na presença de soro contendo anticorpos anti-saliva.

Lista de abreviaturas

ADP — Adenosina Difosfato

AMP — Adenosina Monofosfato

ATP — Adenosina Trifosfato

EDTA — Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)

EGS — Extrato de Glândula Salivar

EGTA — Ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (etilenoglicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N ′, N′-ácido tetracético)

ELISA — Enzymatic Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Enzimático)

GHB — Gelatina/HEPES/NaCl

L. infantum — *Leishmania infantum*

LVA — Leishmaniose Visceral Americana

PBS — Phosphate Buffer Solution (Solução Tampão Fosfato)

SDS — Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de sódio)

SDS-PAGE — Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese de Gel de Poliacrilamida)

Introdução **9**

Leishmanioses 9

Leishmaniose Visceral Americana 12

Flebotomíneos 13

Lutzomyia longipalpis *15*

A Hematofagia e a Saliva 18

A resposta imune contra proteínas salivares 19

Justificativa **20**

Objetivos **21**

Objetivo Geral 21

Objetivos Específicos 22

Metodologia **22**

Comitês de Ética 22

Criação dos insetos 23

Imunização de Camundongos (Vlkova et al, 2012 - com modificações) 23

Obtenção do soro de camundongos 24

Obtenção de soro humano de voluntários 24

Obtenção de glândulas salivares, preparo de solução salina contendo saliva e preparo de extrato de glândula salivar (EGS) (Bahia et al, 2007 e Ferreira et al, 2016 - com modificações) 25

Ensaio imunoenzimático | ELISA para avaliar a presença de anticorpos anti-saliva no soro de camundongos imunizados (Drahota et al, 2009). 26

Observação do padrão de bandas de proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* utilizando SDS-PAGE (Laemmli, 2011 - com modificações). 27

Western Blotting para avaliar a reatividade de proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva (VOLF e ROHOUSOVA, 2000 - com modificações). 27

Ensaio de coagulação (Costa et al, 2020 - com modificações). 28

Ensaios hemolíticos (via clássica) (Whaley & North, 1997 - com modificações). 29

Análises Estatísticas 30

Resultados **30**

Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* em gel de poliacrilamida corado com prata 31

Reatividade das proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) 32

Reatividade das proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva avaliada por Western Blotting 34

A atividade anticoagulante da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de camundongos contendo anticorpos anti-saliva 35

A atividade anti-complemento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de camundongos contendo anticorpos anti-saliva 36

Discussão **38**

As proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* reconhecidas pelos anticorpos produzidos de forma natural 38

A avaliação de algumas das funções salivares essenciais para a hematofagia diante de anticorpos anti-saliva 41

Próximos passos 43

Conclusões **45**

Bibliografia **46**

Anexos **62**

1. Introdução

1.1 Leishmanioses

Protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, são os agentes etiológicos das leishmanioses. A transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas que pertencem à ordem Diptera, à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae (Desjeux, 2001).

As leishmanioses estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmicas em 98 países e territórios distribuídos na Europa, África, Ásia e Américas. (Alvar et al, 2012). Considera-se que mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e correm o risco de se infectar com o parasito, e são estimados trinta mil novos casos de leishmaniose visceral (Figura 1) e mais de um milhão de novos casos de leishmaniose cutânea todos os anos no mundo (WHO, 2018). Essa parasitose é, atualmente, uma doença de caráter endêmico emergente, negligenciada e subnotificada, que afeta principalmente populações inseridas no ciclo da pobreza e da desigualdade social (Alvar et al., 2012).

As leishmanioses se apresentam com diversos padrões clínicos e epidemiológicos. As manifestações clínicas da doença variam desde úlceras de pele que se curam sozinhas até a forma visceral grave. A apresentação e a gravidade dos sintomas são definidas por fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado e ao parasito (Dantas-Torres, 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave e que sem tratamento pode levar o hospedeiro ao óbito. A leishmaniose cutânea (LC), apesar de mais branda, é a forma mais comum da doença e seu quadro pode evoluir para as formas muco-cutânea ou difusa (Desjeux, 2004).

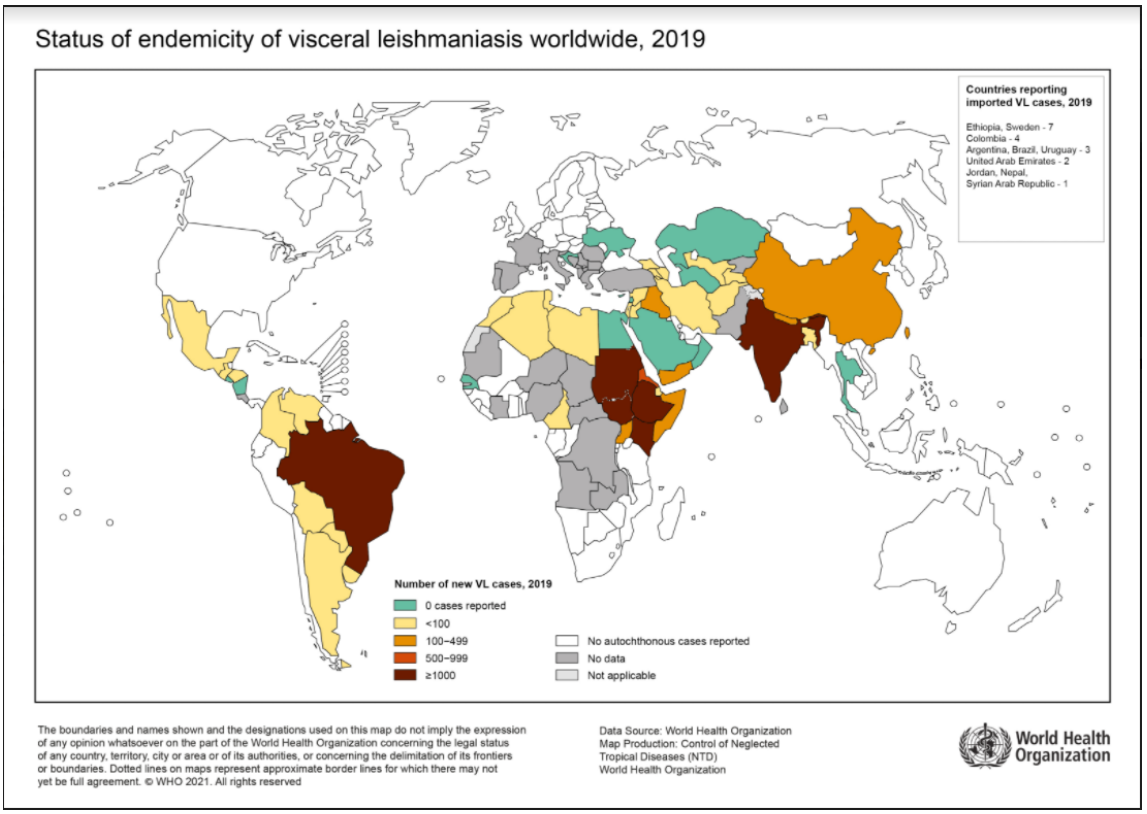


Figura 1. Status de Endemicidade da Leishmaniose Visceral no Mundo em 2019: O Brasil apresentou mais de 1000 novos casos de leishmaniose visceral no levantamento deste ano. (adaptado de WHO, 2019)

O hospedeiro que possui comorbidades, subnutrição, e está em extremos de idade (crianças e idosos), por exemplo, pode desenvolver as formas mais severas de leishmaniose uma vez que esses fatores estão relacionados à habilidade do sistema imune de responder adequadamente ao parasito (Conceição-Silva et al., 2018). Além disso, a ocorrência das leishmanioses está diretamente ligada à condição socioeconômica dos indivíduos e fatores como as más condições de moradia e saneamento ambiental e a falta de medidas de proteção individual podem aumentar o risco de infecção (WHO, 2018).

Durante seu ciclo de vida, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um estágio extracelular que ocorre no trato intestinal do hospedeiro invertebrado: fêmeas de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). Nestes dípteros os parasitos se desenvolvem em sua forma flagelada proeminente,

alongada e móvel, denominada promastigota. Aparecem vários tipos de promastigotas ao longo do desenvolvimento no inseto e estas culminam com o aparecimento da forma promastigota metacíclica que é infectante para os mamíferos. Já no hospedeiro vertebrado, representado por numerosas espécies de mamíferos, ocorre a diferenciação para a forma intracelular obrigatória, denominada amastigota, que é arredondada e não apresenta flagelo aparente (Ashford, 2000).

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para seres humanos, podendo elas ter caráter epidemiológico zoonótico, o qual inclui em seu ciclo um animal não humano como hospedeiro reservatório; ou antroponótico, em que o homem é a fonte de infecção para vetores como ocorre para a espécie *Leishmania (L.) donovani* com foco maior de incidência na Índia, Bangladesh, Nepal e Leste da África (Desjeux, 2004).

O controle da doença inclui estratégias para detecção e tratamento precoce de casos, bem como o manejo de reservatórios e vetores. São importantes também os estudos sobre a epidemiologia, a distribuição geográfica, as vias de transmissão, contextos socioeconômicos e ambientais (WHO, 2018).

1.2 Leishmaniose Visceral Americana

A leishmaniose visceral americana é uma doença causada, principalmente, por protozoários da espécie *Leishmania infantum* (Ready, 2014). A infecção ocorre após a inoculação de formas promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado por fêmeas de flebotomíneos infectadas. São reconhecidas duas espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão de *L. infantum* no território brasileiro, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal delas.

Fêmeas da espécie *Lutzomyia cruzi* mostraram-se vetores competentes de *Leishmania infantum* (Oliveira et al, 2017). No Brasil, essa espécie está distribuída em áreas de bioma do Cerrado e Pantanal, especialmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Oliveira et al, 2018).

As infecções ocorrem após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro pela picada da fêmea do flebotomíneo infectada. As promastigotas são capturadas por macrófagos onde se formam fagolisossomos e elas se transformam nas formas amastigotas. Em seguida,

os parasitos podem se disseminar e infectar células do sistema reticuloendotelial em vários tecidos, mas predominantemente no fígado, na medula óssea, baço e linfonodos (Griensven e Diro, 2012).

Atualmente discute-se a participação de neutrófilos durante o processo de infecção do parasito. Kupani e colaboradores (2020) reuniram uma série de dados que descrevem o mecanismo conhecido como Cavalo de Tróia. Nesse caso, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por neutrófilos, onde se transformam em formas amastigotas e multiplicam-se dentro de fagolisossomos. A partir daí, os neutrófilos infectados são induzidos e entram em processo apoptótico, e são então fagocitados por macrófagos. Os parasitos internalizados no macrófago podem criar um nicho favorável e se submeter a um ciclo de multiplicação para estabelecer uma infecção ativa. Alguns parasitos, dentro de corpos apoptóticos, são fagocitados por macrófagos ou outras células do sistema mononuclear fagocitário de onde são espalhados por diversos tecidos. (Kupani et al, 2020) Embora ainda não existam relatos desse mecanismo de ação para protozoários da espécie *Leishmania infantum*, acredita-se que essa forma de invasão celular seja a que melhor explica o contexto do ciclo de transmissão da parasitose.

A enfermidade em humanos é caracterizada pela presença de episódios febris, perda de peso, aumento de órgãos viscerais, tais como baço e fígado, e anemia severa. É considerada uma doença grave e, se não tratada, pode levar o paciente à morte (Desjeux, 2001).

Na maioria dos casos a infecção não progride para a doença, entretanto em algumas áreas endêmicas cerca de 30% de indivíduos da população podem ser assintomáticos (Griensven e Diro, 2012). A leishmaniose pode ser agravada a depender das condições de saúde do hospedeiro, como por exemplo, a existência de condições clínicas pré-existentes. A infecção por HIV aumenta centenas de vezes as chances de se desenvolver a leishmaniose e, ao mesmo tempo, a leishmaniose provoca a progressão clínica do HIV e o desenvolvimento da AIDS (WHO, 2018).

A vacinação seria a melhor forma de controle para doenças transmitidas por vetores, tais como a leishmaniose (Ready et al, 2014), por isso estudos relacionados ao desenvolvimento de novas tecnologias para a produção vacinal são de extrema importância.

São registrados cerca de 58 mil casos de LV no mundo anualmente, sendo que mais de 90% dos casos são registrados em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. (Alvar et al, 2012). Em 2019 e 2020 mais de 95% das mortes causadas por LV foram reportadas em apenas 10 países, entre eles o Brasil, que registrou 196 mortes em 2019 e 151 em 2020 (WHO).

1.3 Flebotomíneos

Flebotomíneos são insetos dípteros, pertencentes à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae. Possuem corpo pequeno, com comprimento entre 2-4 mm, recoberto densamente por cerdas. As asas são lanceoladas posicionadas sempre de forma semi-ereta sob o corpo, enquanto a cabeça forma um ângulo de 90° com o abdômen, dando ao inseto um aspecto corcunda (Young & Duncan, 1994).

Os flebotomíneos possuem ciclo vital holometábolo, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos. As larvas são terrestres e se alimentam de matéria orgânica em decomposição e microrganismos. São bastante ativas, se alimentando desde a eclosão dos ovos até a formação da pupa, fazendo pausas apenas nas mudas entre estádios larvais. (Sherlock, 2003).

Antes de se tornarem pupas, as larvas excretam todo conteúdo intestinal e migram para locais com menor umidade para se fixarem. A fase de pupa dura entre 7 e 12 dias, sendo que os machos costumam emergir primeiro do que as fêmeas (Young & Duncan, 1994).

Os insetos adultos de ambos os sexos se alimentam de carboidratos provenientes de plantas e secreções de afídeos. As fêmeas, por outro lado, precisam também de ingerir sangue para que os ovários se desenvolvam e produzam os ovócitos (Killick-Kendrick, 1999).

A glândula salivar dos flebotomíneos é composta por dois ácinos salivares, ductos, uma bomba salivar e um canal que desemboca numa das peças bucais. As glândulas podem ser heterogêneas ou homogêneas em seu tamanho e formato, a depender da espécie do inseto (Lestinova et al, 2017). A saliva contribui para o sucesso alimentar desses insetos e possui uma série de moléculas bioativas que facilitam a ingestão de sangue e carboidratos (Kamhawi, 2000).

Através do repasto sanguíneo as fêmeas podem ser vetoras naturais de bactérias do gênero *Bartonella*, diversos arbovírus e tripanossomatídeos, incluindo protozoários do gênero *Leishmania* (Sherlock, 2003). Existem aproximadamente 70 espécies de flebotomíneos suspeitas ou incriminadas como vetores naturais de *Leishmania*. Insetos do gênero *Phlebotomus* são os principais vetores na África, Ásia e Europa, enquanto o gênero *Lutzomyia* é principal vetor na América Central e do Sul (Bates, 2009).

Durante a hematofagia, as fêmeas desses insetos dilaceram a pele do vertebrado e formam um pequeno poço subcutâneo contendo saliva, sangue e restos de tecido, que são então ingeridos pelo inseto. As peças bucais são curtas e rígidas, portanto não são adequadas para canular vasos sanguíneos. Esse processo, conhecido como telmofagia, é crucial para a capacidade vetorial dos flebotomíneos em relação à transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania* (Bates, 2007).

Além da forma que o sangue é obtido, a frequência de alimentação estabelece fatores importantes no papel do inseto como vetor. Flebotomíneos, tal qual a maioria dos insetos vetores, realizam múltiplos repastos sanguíneos, fato que aumenta a capacidade vetorial do inseto, já que promove o contato com variados hospedeiros susceptíveis. Em estudo publicado recentemente os dados revelam que múltiplos repastos sanguíneos possuem papel fundamental no estabelecimento da infecção do inseto por protozoários do gênero *Leishmania*, bem como em sua infecciosidade (Serafim et al, 2018).

1.4 *Lutzomyia longipalpis*

Lutzomyia (lutzomyia) longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (FIGURA 2) é o principal vetor de *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral americana no Novo Mundo (Lainson et al, 1977). O ciclo de vida (FIGURA 3) de *Lutzomyia longipalpis* se assemelha ao dos demais flebotomíneos, mas por ser um grupo de insetos que apresenta grande dispersão e por ser mantido em colônias de diferentes centros de pesquisa, pode apresentar variações e peculiaridades (Soares & Turco, 2003).



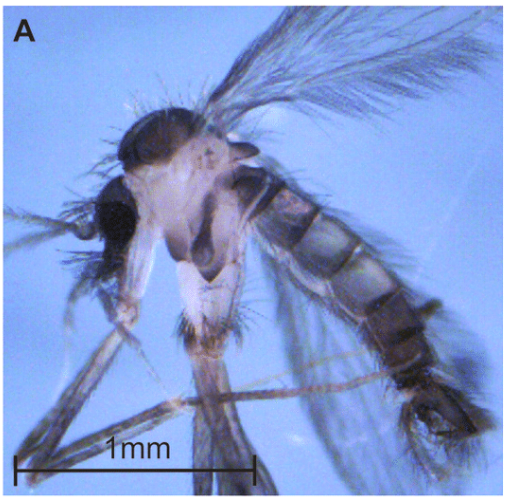


Figura 2a.Fêmea de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (foto de Nelder Gontijo). **Figura 2b**. Macho de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (adaptado de Souza et al, 2017).

O ciclo, desde a eclosão das larvas até a fase adulta do inseto, pode variar de 26 a 42 dias na natureza, dependendo especialmente da fonte alimentar (Rangel et al, 1986). A oviposição tem início após, aproximadamente, 5 dias do repasto sanguíneo. As fêmeas podem pôr de 24 a 52 ovos por repasto (Soares e Turco, 2003). O tipo de hospedeiro em que a fêmea realiza repasto sanguíneo pode afetar diretamente a produção de ovos. Desses ovos, são liberadas larvas cerca de 6 a 9 dias após a postura que têm seu desenvolvimento, desde o primeiro estádio até o quarto, por um período de 14 a 19 dias. Por fim, as pupas são formadas e, após 8-9 dias os adultos emergem (Rangel et al, 1986).

Lutzomyia longipalpis é considerado um complexo de espécies que estão distribuídas desde o México até a Argentina. São assim definidas com base em análises comportamentais, morfológicas e moleculares (Souza et al, 2017).

Dados moleculares atuais sobre a diversidade genética de insetos pertencentes ao complexo *Lutzomyia longipalpis* indicam a presença de dois clados. O primeiro composto por insetos de haplogrupos Brasileiros e Argentinos, e outro composto por populações da América Central e do norte da América do Sul. Entretanto, mesmo pertencendo ao mesmo clado, populações argentinas e

brasileiras apresentam polimorfismos genéticos distintos, resultando em populações separadas (sub-clados) (Rêgo & Soares, 2021).

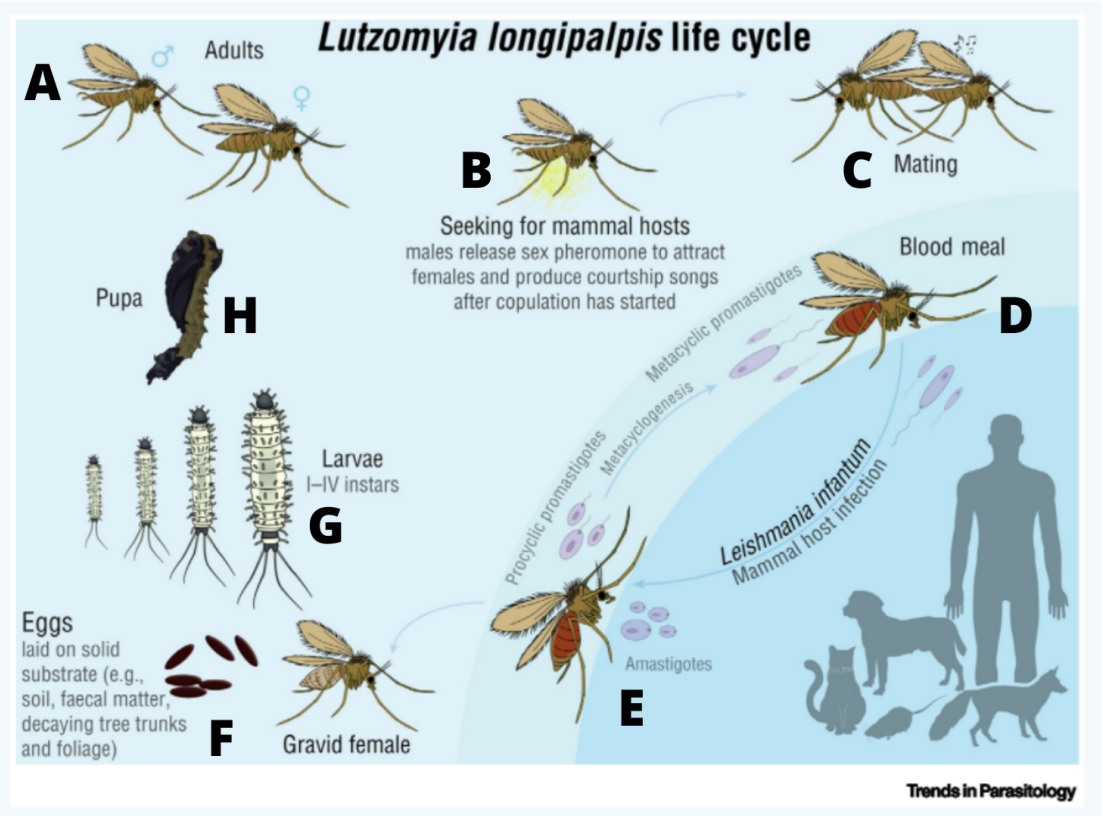


Figura 3. Ciclo Biológico do vetor *Lutzomyia longipalpis* (adaptado de Sousa-Paula et al, 2020): A. Insetos adultos, macho e fêmea, da espécie *Lutzomyia longipalpis*; B. Inseto macho adulto procurando por hospedeiros mamíferos. Os machos liberam feromônio sexual para atrair as fêmeas e produzem sons de acasalamento após o início da cópula; C. Insetos macho e fêmea copulando; D. A fêmea realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, momento em que pode se infectar com formas amastigotas do protozoário *Leishmania infantum*; E. A fêmea pode realizar mais de um repasto sanguíneo e, nesse momento, transmitir o parasito em sua forma promastigota para o hospedeiro vertebrado ou, ao picar um mamífero doente, ingerir a forma amastigota do parasito e se infectar; F. Após a digestão do sangue a fêmea grávida deposita seus ovos em substrato sólido; G. Larvas de 1º instar eclodem dos ovos e realizam mudas até o 4º estádio larval; H. Ocorre a formação da pupa que dará origem a novos adultos e o ciclo irá reiniciar.

No Brasil, esses insetos apresentam boa adaptação ao ambiente urbano e periurbano, com hábitos antropofílicos (Ferreira et al. 2013), apesar disso, estudos sobre seus hábitos alimentares mostram que aceitam um grande espectro de hospedeiros que podem sustentar o ciclo de vida do inseto em ambientes naturais. (Quinnell et al, 1992) .

Essa capacidade de manter um ciclo de vida ativo com sangue de diferentes hospedeiros vertebrados, especialmente em áreas periurbanas que possuem a presença de reservatórios naturais de *Leishmania*, faz com que os insetos dessa espécie sejam importantes transmissores dentro do ciclo de leishmaniose visceral americana no Brasil (Macedo-Silva et al, 2014).

1.5 A Hematofagia e a Saliva

A hematofagia é um processo alimentar que evoluiu separadamente em diversos grupos de artrópodes, em especial entre os insetos (Ribeiro, 1995). Existem diferenças entre as formas de obtenção de sangue. Em alguns grupos ambos machos e fêmeas realizam o repasto, como acontece com hemípteros hematófagos. Por outro lado, em alguns grupos apenas as fêmeas se alimentam de sangue, é o caso de mosquitos e flebotomíneos.

Outra diferença importante é a forma que o sangue é retirado do hospedeiro. O processo hematofágico pode ser através da solenofagia ou da telmofagia. Essa definição diz respeito à forma como as peças bucais do inseto entram em contato com o hospedeiro, bem como a anatomia dessas peças bucais (Lavoipierre, 1965).

Apesar das diferenças existentes, os artrópodes hematófagos fazem uso de artifícios que auxiliam na ingestão e digestão de sangue. Um dos principais fatores conhecidos é a saliva. A saliva possui em sua composição proteínas capazes de driblar os efeitos hemostáticos, inflamatórios e imunológicos presentes no sangue dos hospedeiros vertebrados (Ribeiro e Arcà, 2009).

A saliva de flebotomíneos é composta por proteínas e varia de acordo com as espécies, a distribuição geográfica e entre diferentes colônias de laboratórios. De forma geral, alguns compostos e funções são conservadas dentro do grupo (Volf et al, 2000).

Valenzuela e colaboradores (2004) isolaram e identificaram 35 clusters de proteínas salivares secretadas por fêmeas do *Lutzomyia longipalpi*s, dentre elas, 9 com funções já conhecidas e caracterizadas até aquele ano. Atualmente a espécie possui 10 proteínas identificadas - com a adição da SALO caracterizada em 2016 por Ferreira e colaboradores.

A hemostasia do hospedeiro vertebrado tem ação baseada em três pilares: a vasoconstrição, a coagulação e a agregação plaquetária. Essa resposta visa controlar a perda de sangue devido a injúria dos vasos sanguíneos. Os flebotomíneos apresentam elementos em sua saliva para atacar de forma redundante e colaborativa cada um desses fatores (Kamhawi, 2000).

Para driblar a vasoconstrição no local da picada, a saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* conta com um peptídeo denominado Maxadilan. Ele é o vasodilatador mais potente conhecido até o momento (Lerner et al, 1990).

Outra proteína conhecida de *Lutzomyia longipalpis* é a Lufaxin que faz parte de uma família de proteínas inibidoras de Fator Xa. O Fator Xa é uma enzima com papel importante na montagem do complexo da protrombinase que leva à amplificação da cascata de coagulação. Sendo assim, a Lufaxin tem função importante de impedir a coagulação do sangue no sítio de picada do inseto, permitindo, então, a formação do poço de alimentação. (Collin et al, 2012) Além de atuar como anticoagulante, a Lufaxin também tem a função de inibir a via alternativa do sistema complemento humano (Mendes-Sousa et al, 2017).

A agregação plaquetária é inibida pela enzima apirase presente na saliva do inseto. Essa enzima hidrolisa moléculas de ATP e ADP em AMP e fosfato inorgânico (Charlab et al, 2000). As moléculas de ADP são agonistas responsáveis por promover a ativação da cascata da agregação plaquetária no locus da picada, ou seja, no local em que ocorrem danos nos vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado (Lestinova et al, 2017).

As proteínas salivares podem ter mais de um mecanismo de ação. Algumas possuem, além das funções citadas acima, a capacidade de modulação do sistema imune do hospedeiro vertebrado. Um exemplo de proteína que inibe o sistema imunológico é a SALO. A SALO, caracterizada por Ferreira e colaboradores (2016), é capaz de inibir a via clássica do sistema complemento.

Além disso, existem também inibidores intestinais que impedem que a parede celular do trato digestivo do inseto seja danificada pela ação do soro presente no sangue ingerido. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* a presença de um inibidor intestinal solúvel da via clássica do sistema complemento (Saab et al, 2020).

1.6 A resposta imune contra proteínas salivares

Artrópodes hematófagos normalmente depositam saliva no local em que realizam o repasto, ou seja, na derme de seus hospedeiros vertebrados. (Andrade et al, 2005) Diversos grupos de pesquisa já observaram que essa saliva, ao entrar em contato com a pele do hospedeiro vertebrado, desencadeia resposta imunológica humoral e celular.

Cross e colaboradores (1993) observaram que camundongos imunizados com antígenos salivares de simulídeos desenvolveram anticorpos IgG, IgM e IgE. Reunala e colaboradores (1994), ao analisarem soro de seres humanos em diversas localizações geográficas, observaram a presença de anticorpos anti-saliva de mosquitos do gênero *Aedes* dos tipos IgE e IgG4. Posteriormente, Caljon e colaboradores (2006) viram que camundongos e seres humanos expostos a picadas de moscas Tsé-Tsé ou à saliva desses insetos produziram altos níveis de anticorpos do tipo IgG.

Essa resposta contra proteínas salivares também pode ser notada em hospedeiros vertebrados que tiveram contato com a saliva de flebotomíneos. Anticorpos anti-saliva podem ser observados no soro de hospedeiros vertebrados tanto após o contato com a saliva de forma experimental, por picadas induzidas (Vlkova et al, 2012), ou de forma natural em áreas endêmicas para o inseto (Batista et al, 2018).

2. Justificativa

Flebotomíneos são insetos cujas fêmeas possuem hábitos hematófagos, sendo a ingestão de sangue crucial para a maturação dos ovários. Além disso, no momento do repasto pode ocorrer a infecção ou transmissão de patógenos, especialmente protozoários do gênero *Leishmania*.

A saliva dos insetos hematófagos, inclusive dos flebotomíneos, possui propriedades anti-hemostáticas que lhes conferem a capacidade de se alimentar de sangue. Hospedeiros vertebrados, por sua vez, produzem anticorpos anti-saliva quando são expostos a picadas desses insetos.

Até o presente momento temos registros na literatura da produção desses anticorpos, mas sem algum relato sobre o efeito deles sobre a atividade das moléculas salivares do inseto.

Os anticorpos produzidos por hospedeiros vertebrados, se fossem capazes de alterar a ação salivar, poderiam ser ótimos aliados na produção de vacinas que visam o controle biológico de vetores de diferentes espécies de *Leishmania*.

Por outro lado, espera-se que tais anticorpos não interfiram no repasto sanguíneo. Os componentes imunomodulatórios podem ter surgido a partir de uma pressão seletiva sobre aqueles indivíduos que se alimentavam diversas vezes em um mesmo hospedeiro. Isto é, aqueles insetos que conseguiam se alimentar em hospedeiros que possuíam anticorpos anti-saliva sobreviviam e perpetuavam a existência de proteínas salivares que fossem menos imunogênicas.

Dessa forma, o presente estudo se faz importante para o esclarecimento da relação existente entre a saliva do inseto e os anticorpos produzidos por seus hospedeiros, preenchendo lacunas ainda vazias que são essenciais para o conhecimento aprofundado sobre a biologia de *Lutzomyia longipalpis* e para seu controle biológico, principalmente, em áreas endêmicas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Testar a capacidade anti-hemostática e imunomodulatória da saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* frente a anticorpos anti-saliva produzidos por camundongos imunizados de forma natural pela picada dos insetos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✔ Imunizar camundongos, de forma natural, com picadas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis.*
- ✔ Verificar a presença de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* no soro de camundongos imunizados de forma natural.
- ✔ Comparar o número de bandas de proteínas salivares identificadas em um gel de poliacrilamida com o número de bandas que são reativas a anticorpos presentes em soro de camundongos imunizados por picada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.
- ✔ Verificar a atividade anticoagulante da saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* quando em contato com anticorpos anti-saliva.
- ✔ Testar a ação anti-complemento (via clássica) da saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* quando em contato com anticorpos anti-saliva.

4. Metodologia

4.1 Comitês de Ética

Os experimentos realizados neste projeto foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS UFMG pelo protocolo CEUA: 67/2020 e pelo COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-UFMG) no parecer de número 4.512.912 e do CAAE: 38728320.2.0000.5149.

4.2 Criação dos insetos

Foram utilizados insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, oriundos de Teresina - Piauí | Brasil. Tais insetos são mantidos em colônia desde 2006 no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos - departamento de parasitologia - ICB/UFMG, sob condições de umidade e temperatura descritos por Modi e Tesh (1983).

4.3 Imunização de Camundongos (Vlkova et al, 2012 - com modificações)

Para obtenção de soro rico em anticorpos anti-saliva, selecionamos camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss* com idade de 6 semanas e aproximadamente 30g de peso corporal para realizar a imunização, bem como para montagem de um grupo controle. Os animais foram provenientes do biotério da CEBIO, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e foram mantidos no biotério do Laboratório de Insetos Hematófagos sob condições de temperatura e umidades controladas, em gaiolas protegidas com telas contra insetos ao longo de todo o processo de imunização.

Os camundongos foram divididos em 2 grupos de 6 machos/cada, sendo que um grupo foi o grupo teste (imunizado por picadas) e o outro o grupo controle (não imunizado). Para o processo de imunização cada animal do grupo teste foi anestesiado por via intraperitoneal com Ketamina (150 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) e submetido a picadas de 30 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* pelo tempo de 30

minutos (FIGURA 4). Este processo foi repetido 3 vezes com intervalo de 15 dias entre eles.

Quinze dias após a última sessão de picadas realizou-se a eutanásia dos animais de ambos os grupos para obtenção de soro.

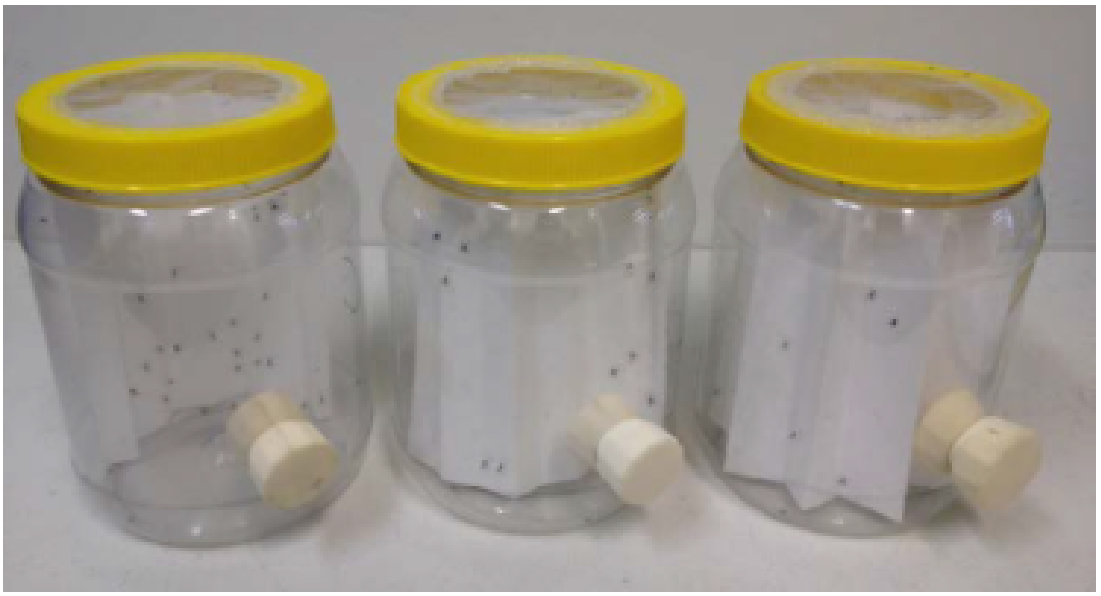


Figura 4. Potes para realização de repasto sanguíneo de flebotomíneos em camundongos: o pote possui uma abertura lateral para inserção do tubo contendo os insetos que irão realizar o repasto sanguíneo; na parte superior da tampa há uma abertura que é recoberta por uma rede com espessura suficiente para que o inseto passe sua probóscide e consiga alcançar a pele do hospedeiro que é posicionado, anestesiado, sobre o pote.

4.4 Obtenção do soro de camundongos

Os camundongos dos grupos teste e controle foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (150 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg), e, quando não se apresentavam mais sinais de reflexos, foram então decapitados e o sangue colhido com ajuda de tubos estéreis do tipo FALCON.

Os tubos contendo o sangue foram mantidos em repouso a temperatura ambiente durante três horas e, em seguida, foram centrifugados a 3.000 g por dez minutos. Os soros provenientes de animais do mesmo grupo foram misturados para a formação de um pool, e então aliquotados e armazenados a -20°C até o uso.

Em todos os experimentos, com exceção do ensaio imunoenzimático (ELISA para verificar a presença de anticorpos no soro imune, descrito no item 4.7), utilizou-se o soro de camundongos inativado pelo calor. A alíquota de cada soro (teste ou controle) foi, no dia do uso, aquecida em banho-maria por 30 minutos a 56º C. Esse processo mantém os anticorpos ativos, mas inativa o sistema complemento no soro.

4.5 Obtenção de soro humano de voluntários

Para a obtenção do soro humano foram coletados 5 mL de sangue de cinco voluntários saudáveis. Os tubos de vidro contendo o sangue foram mantidos em repouso a temperatura ambiente durante três horas e, em seguida, centrifugados a 3.000 g por dez minutos. O soro de cada tubo foi coletado e todos eles foram misturados para a formação de um pool de soros humanos, e então aliquotados e armazenados à -20°C até o uso em ensaios da via clássica do sistema complemento.

4.6 Obtenção de glândulas salivares, preparo de solução salina contendo saliva e preparo de extrato de glândula salivar (EGS) (Bahia et al, 2007 e Ferreira et al, 2016 - com modificações)

Para realização dos experimentos utilizamos a saliva de *Lutzomyia longipalpis* em duas preparações: a solução salina contendo saliva e o extrato de glândula salivar (EGS).

Foram utilizadas fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* com 3-5 dias de vida, alimentadas somente com solução de sacarose 30% em ambas as preparações.

Para obtenção de salina contendo saliva, as fêmeas tiveram suas glândulas dissecadas em solução salina 0,9% e lavadas. Em seguida, as glândulas foram transferidas em grupos de 10 ou 20 glândulas para um microtubo contendo 15 µL de salina 0,7%. Foram realizadas pipetagens sucessivas para facilitar o rompimento das glândulas e, posteriormente, a centrifugação por 5 minutos, a 10.000g e 4ºC. Retirou-se, então, todo o sobrenadante (onde se encontrava a saliva) e o sedimento

contendo as carcaças das glândulas foi descartado. Esse material foi utilizado para o experimento descrito no item 4.7.

Para se obter o EGS, as fêmeas tiveram suas glândulas dissecadas em tampão PBS ou HEPES/NaCl e transferidas para tubos contendo tampão adequado para cada tipo de experimento. Em seguida, os tubos foram colocados em um aparelho de ultrassom durante 30 segundos com intuito de romper as glândulas salivares. A quantidade de glândulas por tubo variou de acordo com os experimentos e essas informações estão contidas nos itens a seguir.

4.7 Ensaio imunoenzimático | ELISA para avaliar a presença de anticorpos anti-saliva no soro de camundongos imunizados (Drahota et al, 2009).

A produção de anticorpos anti-saliva no soro de animais imunizados foi investigada através do teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Uma solução contendo EGS de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* equivalente a 2 ácinos por poço, preparada de acordo com o item 3.6, foi colocada em poços de uma placa de ELISA.



Figura 5. Placa de ELISA: A reação do peróxido de hidrogênio com o anticorpo conjugado com peroxidase libera um composto de coloração amarela. A intensidade dessa cor é medida pelo leitor que fornece o valor de absorbância de cada poço.

Após 12 horas de incubação da placa em uma cuba úmida a 4ºC, a mesma foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em PBS-Tween 20 0,05% e

incubada com: a) soro de camundongo normal; b) soro de camundongo imunizado; c) soro de camundongo normal inativado pela temperatura (56ºC - 30 minutos); d) soro de camundongo imunizado inativado pelo calor (56ºC - 30 minutos). Os soros funcionaram, nesse ensaio, como anticorpo primário da reação e foram usados em uma diluição de 1:200 em PBS (pH 7,4). Poços controles foram preparados apenas com tampão carbonato/bicarbonato ($NaHCO_3$ 35mM / Na_2CO_3 15mM pH 9,6) (sem saliva).

Posteriormente a placa foi tratada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (anticorpo policlonal anti-mouse ABcam: ab6728) em uma diluição de 1:2000 de acordo com orientações do fabricante. A leitura foi feita em leitor de placas de ELISA VersaMax a 450 nm utilizando o programa SoftMax Pro 5.2.

Definiu-se, com base nos resultados desse experimento, que nos demais ensaios se usaria sempre o soro de camundongos inativado pelo calor (banho maria a 56 ºC por 30 minutos), pois a inativação não estava comprometendo o funcionamento dos anticorpos.

4.8 Observação do padrão de bandas de proteínas salivares de Lutzomyia longipalpis utilizando SDS-PAGE (Laemmli, 2011 - com modificações).

A visualização das bandas das proteínas presentes na saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata (SDS-PAGE).

Preparou-se solução salina contendo saliva, de acordo com o item 3.6, que em seguida foi misturada ao tampão da amostra contendo beta-mercaptoetanol e SDS. Os tubos foram fervidos por 10 minutos. A solução de cada tubo foi então aplicada a canaletas em gel de poliacrilamida 12,5%. Para separação de proteínas foi feita a corrida do gel a 100v. Após a corrida, o gel foi lavado e revelado pelo método de coloração pela prata, a qual tem a capacidade de corar proteínas inespecificamente.

Um gel semelhante foi utilizado para comparação do número de bandas reativas aos anticorpos anti-saliva presentes no soro de hospedeiros imunizados.

4.9 Western Blotting para avaliar a reatividade de proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva (VOLF e ROHOUSOVA, 2000 - com modificações).

A análise da reatividade de bandas de proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva produzidos por soro de hospedeiros imunizados foi feita por western blot.

Amostras de salina contendo saliva foram preparadas de acordo com o item 3.6 e submetidas a SDS-PAGE, em seguida foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando o equipamento Mini-protean II (BioRad®) durante duas horas a 100 V (~200 mA) em banho de gelo. Como controle utilizou-se o padrão de massa molecular Precision Plus Protein Standards (Bio Rad®). Os sítios de ligação livres da nitrocelulose foram bloqueados com PBS-Tween 20 0,05%, contendo 10% de leite em pó desnatado, por 2 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 10 minutos com PBS-Tween 20 0,05%, sob agitação. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com soros coletados de animais normais ou de animais imunizados, ambos inativados pelo calor e na diluição de 1:200 em PBS (pH 7,4), de acordo com o grupo a ser testado, por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. Nesse ensaio os soros também funcionaram como anticorpos primários.

Após 3 lavagens de 7 minutos com PBS-Tween 20 0,05%, sob agitação, foi feita a incubação da membrana por 1 hora com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (anticorpo policlonal anti-mouse ABcam: ab6728) em uma diluição de 1:2000 de acordo com orientações do fabricante. Após esse período, a membrana foi novamente lavada, 2 vezes, por 7 minutos, com PBS-Tween 20 0,05% e 1 vez com PBS (pH 7,4) e, então, revelada com os reagentes do kit DAB Substrate Kit for Peroxidase.

4.10 Ensaio de coagulação (Costa et al, 2020 - com modificações).

Foram realizados ensaios para avaliar a influência de anticorpos anti-saliva, proveniente do soro de animais imunizados, na atividade anticoagulante da saliva de *Lutzomyia longipalpis*. Para tanto, foi avaliado o tempo de recalcificação do plasma humano citratado na presença de saliva e anticorpos anti-saliva.

O plasma humano foi obtido a partir da centrifugação a 3000g por 15 minutos de um pool de sangue com anticoagulante (citrato de sódio 129 mM) coletado de pessoas voluntárias. Foram ensaiados três grupos: a) Plasma humano na presença de soro imune e EGS; b) Plasma humano na presença de soro não imune e EGS; c) Plasma humano sem soro e sem EGS. A saliva funcionou como um inibidor de coagulação, enquanto o grupo iii foi o grupo controle. As amostras foram depositadas em duplicata, em placas de 96 poços. Após incubação a 37ºC por 5 minutos, em cada poço foi adicionada uma solução de cloreto de cálcio para iniciar a coagulação. Imediatamente após a adição do cloreto de cálcio, foram iniciadas leituras sequenciais de absorbância no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA VersaMax utilizando o programa SoftMax Pro 5.2, também a 37ºC, a fim de captar a variação da turbidez gerada pela coagulação do plasma.

A análise do resultado foi feita pela da comparação do tempo que cada amostra gasta para coagular, considerando que o valor da leitura inicial somado a 0,025 representa uma amostra coagulada.

4.11 Ensaios hemolíticos (via clássica) (Whaley & North, 1997 - com modificações).

Para avaliar a atividade anti-complemento da saliva na presença de anticorpos anti-saliva, realizou-se ensaios de hemólise da via clássica com soro humano normal.

Foram coletados, por punção da veia jugular, 10 mL de sangue de carneiro com o uso de uma seringa estéril contendo 10 mL de solução conservadora de sangue autoclavada (glicose 113,8 mM, ácido cítrico 30 mM, NaCl 72 mM, pH 7,4).

Esse sangue foi então aliquotado em tubos de ensaio e mantido a 4º C por até quatro meses. As hemácias de carneiro precisam ser sensibilizadas antes do uso. Para a sensibilização das hemácias de carneiro, 500 µL de uma alíquota foram retirados e lavados por três vezes em tampão GHB-EDTA (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM, gelatina 0,1%, pH 7,4). Essa lavagem consiste em centrifugar as hemácias (470g a 4º C, por 5 minutos) e ressuspender o sedimento com 7 mL de GHB-EDTA. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 3 mL de GHB-EDTA e opsonizadas com anticorpo anti-hemácia de carneiro diluído a 1:1000

em NaCl 0,9%, por 30 minutos a 37 ºC, sob leve agitação. Após a sensibilização, as hemácias foram lavadas mais duas vezes com GHB-EDTA e uma vez com GHB^{2+} (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, $CaCl_2$ 0,15 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM e gelatina 0,1%). Em seguida a quantidade de hemácias na suspensão foi dosada em espectrofotômetro e a concentração foi ajustada para $2x10^8$ células/mL. Uma vez sensibilizadas, as hemácias de carneiro foram mantidas em geladeira e usadas por um período de até dois dias.

Para os testes de via clássica foram montados tubos com volume final de 125 µL contendo 25 µL de soro inativado de camundongos dos grupos teste ou controle (um tubo para cada grupo), 25 µL de soro humano normal diluído 1:60 em solução GHB^{2+}, 10 µL de EGS contendo 1 glândula salivar (2 ácinos) (preparado de acordo com o item 3.6) ou 10 µL de salina 0,9%, 50 µL de solução de hemácias de carneiro opsonizadas e GHB^{2+} até completar o volume final. Os tubos foram incubados a 37 ºC por 30 minutos e, em seguida, 500 µL de salina gelada foram acrescentados a cada tubo para parar a reação de hemólise. Em cada teste, foram utilizados dois controles: hemólise total, no qual foram acrescidos 500 µL de água destilada fria após a incubação e hemólise espontânea, sem adição de soro humano normal. As amostras foram centrifugadas a 1700g por 1 minuto e foram transferidos 200 µL do sobrenadante de cada tubo, em duplicata, para uma placa de 96 poços, para ser lida em leitor de ELISA VersaMax a 414 nm utilizando o programa SoftMax Pro 5.2.

4.12 Análises Estatísticas

Foram feitas 5 replicatas biológicas de cada experimento. Os dados foram transferidos para planilhas do excel e a análise estatística dos dados foi realizada pelo programa Prisma ®.

Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, assumindo-se que os dados apresentavam distribuição normal quando $p > 0,05$. Dados normais foram avaliados por ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey, o qual comparou estatisticamente todos os grupos entre si. Foram consideradas diferenças significativas as análises com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* em gel de poliacrilamida corado com prata

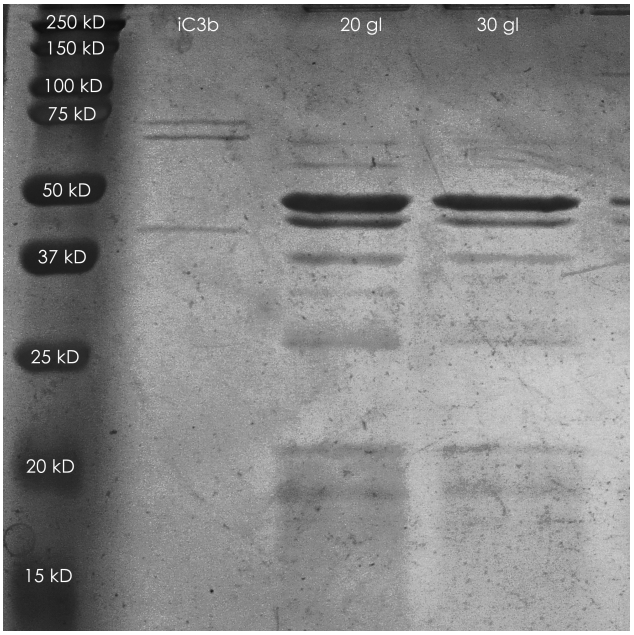
Foram observadas pelo menos 11 bandas de proteínas salivares no gel de poliacrilamida corado com prata (Figura 6a). Na primeira canaleta está o padrão de massa molecular que é uma referência e auxilia na identificação da massa molecular das amostras. A canaleta 2 foi preenchida com a proteína purificada iC3b (CompTech ®). Essa proteína apresenta 3 bandas de massa molecular conhecidos, uma banda de 75 kDa, outra de 68 kDa e outra de 43 kDa.

Na terceira e quarta canaletas foram colocadas amostras de solução salina contendo saliva, sendo a canaleta 3 preenchida com o equivalente a 20 glândulas (40 ácinos) e a canaleta 4 com 30 glândulas (60 ácinos).

Nascimento (2011), em sua dissertação de mestrado, quantificou as proteínas de glândulas salivares de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis.* As fêmeas com idade de 3 a 5 dias após emergência têm a concentração de proteínas de aproximadamente 2,2 µg por 10 ácinos salivares. Ou seja, uma canaleta do gel que contém 40 ácinos possui aproximadamente 9 µg de proteínas.

A quantidade de bandas observadas em ensaios como este podem variar por diversos fatores, dentre eles a espécie de flebotomíneo da qual a glândula foi retirada, a acuidade do profissional, a qualidade dos reagentes, o método de coloração do gel, etc.

Durante a padronização dos experimentos observamos que as bandas já poderiam ser vistas a partir de 5 glândulas por amostra (Figura 6b), mas optamos pela utilização de 20 glândulas salivares, já que essa quantidade produz um gel bem demarcado e de fácil visualização.



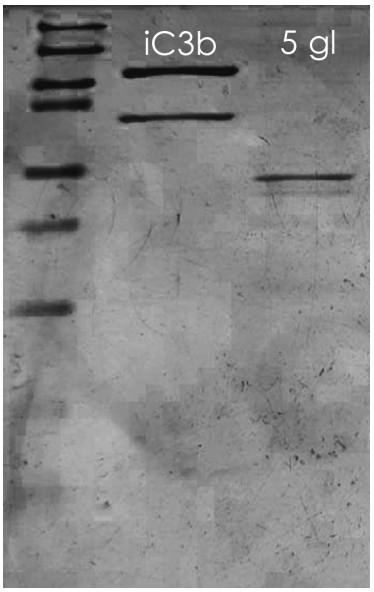


Figura 6a. Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* em gel de poliacrilamida corado com prata: Canaleta 1: Padrão de massa molecular Bio Rad®. Canaleta 2: Padrão de bandas da proteína iC3b. Canaletas 3 e 4: Padrão de bandas de proteínas salivares provenientes de 20 e 30 glândulas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* **Figura 6b. Proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* em gel de poliacrilamida corado com prata:** Canaleta 1: Padrão de massa molecular Bio Rad®. Canaleta 2: Padrão de bandas da proteína iC3b. Canaleta 3: Bandas de proteínas do conteúdo salivar de 5 glândulas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

5.2 Reatividade das proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio imunoenzimático teve dois objetivos: verificar se o soro de camundongos que foram picados por fêmeas de flebotomíneos foi capaz de produzir anticorpos que reconhecem a saliva e verificar se esses anticorpos, mesmo com o soro inativado pelo calor, continuavam a reconhecer a saliva.

O primeiro grupo do gráfico, denominado soro imune, representa o resultado dos poços que foram incubados com soro de camundongos imunizados. Em seguida, observa-se o resultado dos poços que foram incubados com soro de animais do grupo controle. O terceiro e quarto grupos do gráfico representam os dados de ensaios com soros que foram inativados pelo calor.

Os resultados desse ensaio mostraram que os anticorpos foram produzidos e continuavam a funcionar mesmo após a inativação do soro (Figura 7).

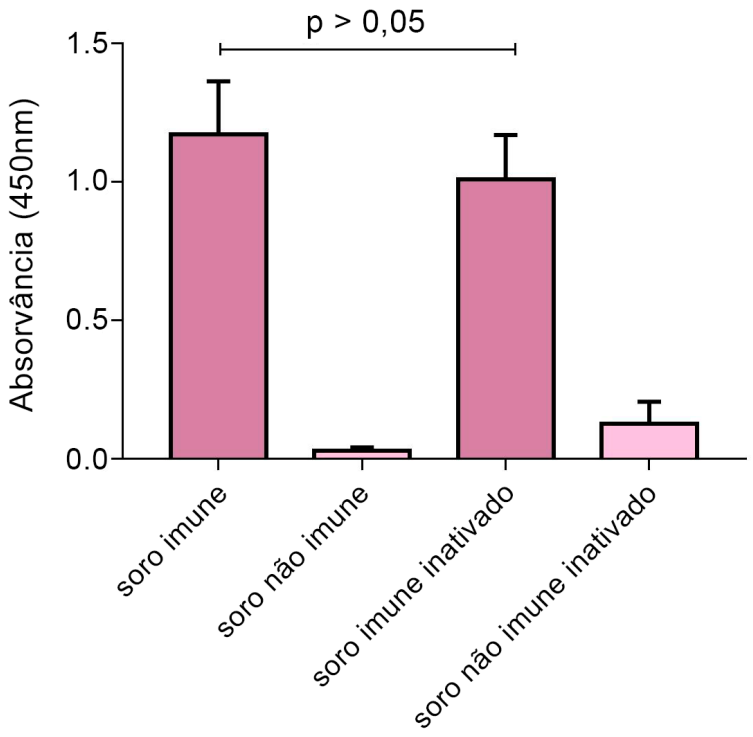


Figura 7. O reconhecimento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* por anticorpos provenientes de soro de camundongo imune e soro de camundongo imune inativado, observados através de ELISA: a. média e desvio padrão das absorvâncias observadas em poços sensibilizados com soro de camundongos imunizados; b média e desvio padrão das absorvâncias observadas em poços sensibilizados com soro de camundongos não imunizados; c. média e desvio padrão das absorvâncias observadas em poços sensibilizados com soro, inativado pelo calor, proveniente de camundongos imunizados; d. média e desvio padrão das absorvâncias observadas em poços sensibilizados com soro, inativado pelo calor, proveniente de camundongos não imunizados. Não há diferença significativa entre

os grupos **a** e **c**, e ambos são estatisticamente diferentes dos grupos **b** e **d**. (ANOVA seguido de Tukey 's p > 0,05)

5.3 Reatividade das proteínas salivares aos anticorpos anti-saliva avaliada por Western Blotting

A metodologia utilizada neste estudo permitiu a comprovação do reconhecimento de três proteínas salivares (Figura 8) por anticorpos produzidos de forma natural por camundongos. Essas proteínas têm massas moleculares de 41,3 kDa, 37,1 kDa e 34 kDa. A membrana controle foi incubada com soro proveniente de camundongos do grupo controle e, conforme esperado, não apresentou bandas.

Parece não haver relação entre as proteínas reconhecidas pelos anticorpos com aquelas observadas no gel de poliacrilamida, já que as bandas que foram demarcadas mais fortemente em cada um dos experimentos possuem massas moleculares distintas.

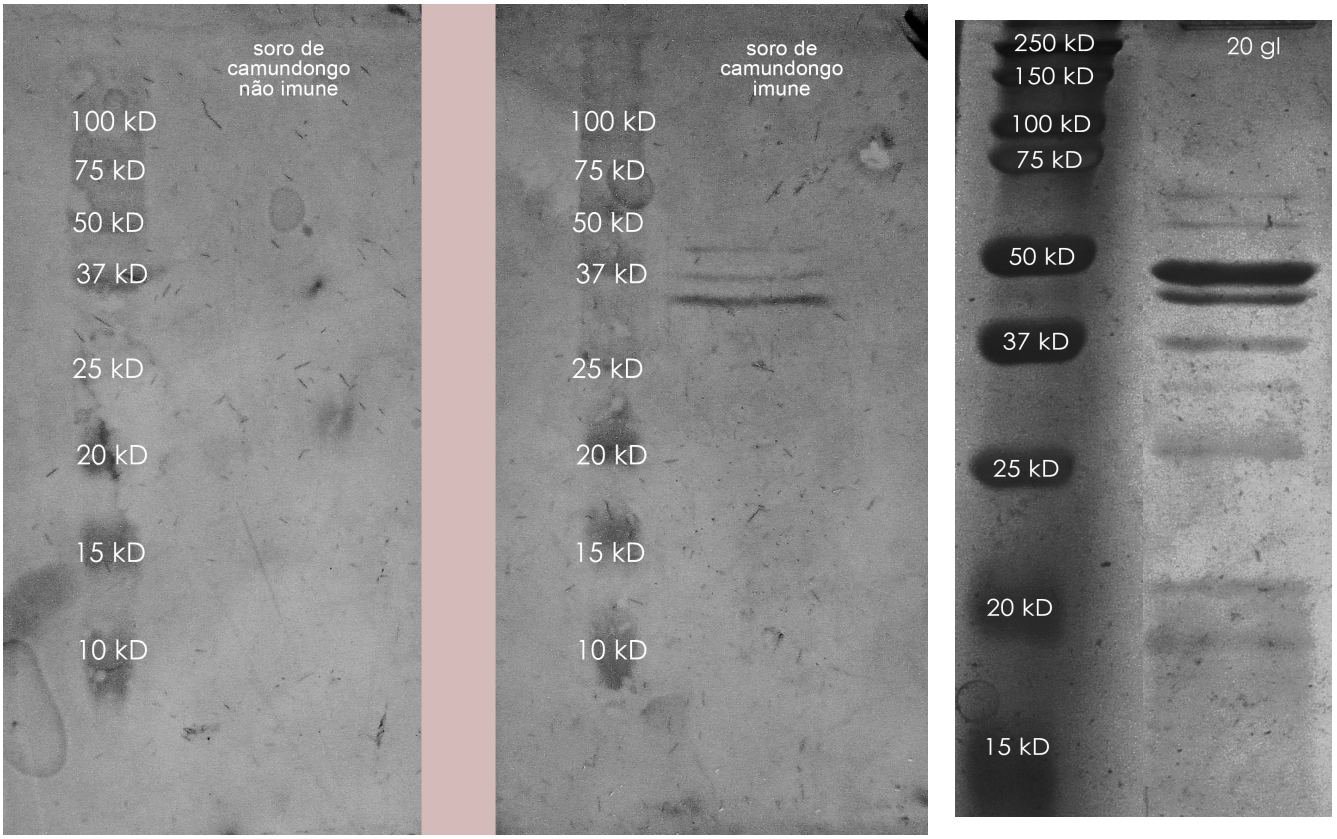


Figura 8a. O reconhecimento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* por anticorpos provenientes de soro de camundongo imune observado através de Western Blotting: Canaleta 1: Padrão de massa molecular Bio Rad®. Canaleta 2: Conteúdo salivar de 20 glândulas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Canaleta 3: Padrão de massa molecular Bio Rad®. Canaleta 4: Conteúdo salivar de 20 glândulas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. (As canaletas 1 e 2 foram incubadas com soro de camundongos não imunizados e as canaletas 3 e 4 foram incubadas com soro de camundongos imunizados) **Figura 8b. As proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* observadas em gel de poliacrilamida**: Canaleta 1: Padrão de massa molecular Bio Rad®. Canaleta 2: Bandas de proteínas do conteúdo salivar de 20 glândulas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

5.4 A atividade anticoagulante da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de camundongos contendo anticorpos anti-saliva

A atividade da saliva sob a cascata da coagulação na presença de anticorpos anti-saliva foi avaliada pelo ensaio de tempo de recalcificação do plasma humano citratado. A saliva apresentou atividade anticoagulante mesmo na presença do soro contendo anticorpos, e essa atividade foi observada pelo prolongamento do tempo de coagulação em comparação com o grupo controle sem saliva. (Figura 9).

A partir de tal resultado conclui-se que as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, ao se alimentarem em hospedeiros previamente picados por insetos da mesma espécie, ainda conseguiriam inibir a coagulação sanguínea e, portanto, ingerir sangue normalmente.

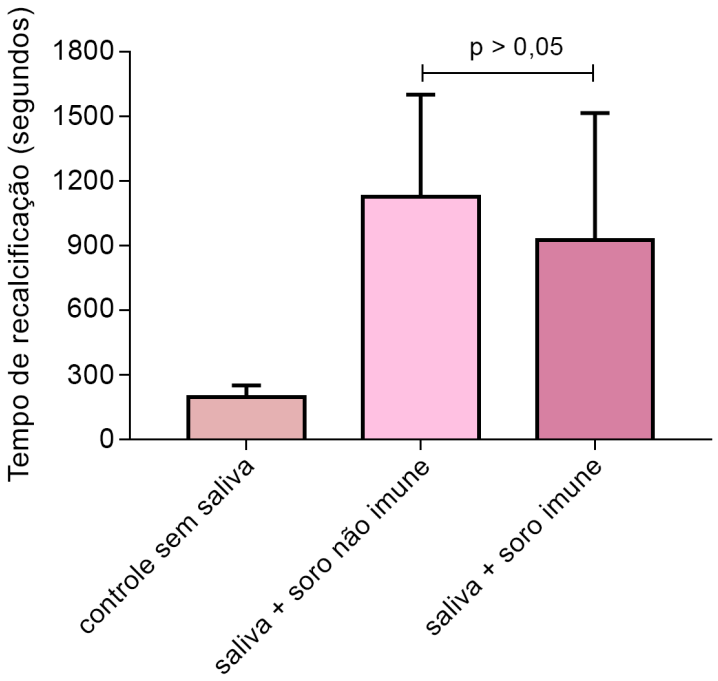


Figura 9. Atividade anticoagulante da saliva mesmo na presença de soro contendo anticorpos anti-saliva: a. média e desvio padrão da leitura dos poços de grupo controle com tempo de recalcificação padrão; b. média e desvio padrão da leitura dos poços contendo saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e soro de camundongos não imunizados; c. média e desvio padrão da leitura dos poços contendo saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e soro de camundongos imunizados. Não há diferença significativa entre os grupos **b** e **c**, e ambos são estatisticamente diferentes do grupo controle. (ANOVA seguido de Tukey 's p > 0,05)

5.5 A atividade anti-complemento da saliva de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro de camundongos contendo anticorpos anti-saliva

Os ensaios hemolíticos da via clássica (Figura 10) mostram que preparações com 1 glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* foram capazes de inibir a atividade hemolítica mesmo na presença de soro contendo anticorpos anti-saliva.

Ou seja, a importante função inibitória da via clássica do sistema complemento humano, realizada pela proteína SALO, continua intacta mesmo na presença de anticorpos anti-saliva.

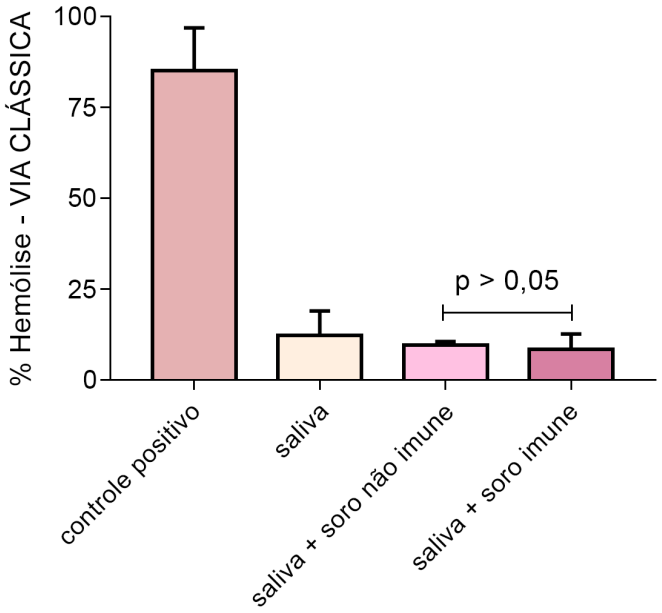


Figura 10. Inibição da via clássica do sistema complemento humano mesmo na presença de soro contendo anticorpos anti-saliva: a. controle positivo em que a hemólise é estimulada com a adição de água destilada; b. leitura dos ensaios contendo saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* no qual a hemólise é inibida pela ação salivar; c. leitura dos ensaios contendo saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e soro de camundongos não imunizados; d.leitura dos ensaios contendo saliva de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e soro de camundongos imunizados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos **b**, **c** e **d**.(ANOVA seguido de Tukey 's p > 0,05).

6. Discussão

6.1 As proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* reconhecidas pelos anticorpos produzidos de forma natural

Fêmeas de flebotomíneos realizam repasto sanguíneo. Durante esse processo, a saliva é inoculada na pele do hospedeiro vertebrado. Em nosso trabalho realizamos, então, a imunização natural de camundongos. Ou seja, expondo os animais a picadas de fêmeas de flebotomíneos, sem outras intervenções tais como o uso de adjuvantes. Essa imunização dos camundongos resultou na produção de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis*.

Nossas análises de reconhecimento de proteínas salivares por parte de tais anticorpos constataram, por meio de western blotting, a observação de três bandas. Essas bandas apresentam massa molecular aproximada de 41,3 kDa, 37,1 kDa e 34 kDa.

Em um estudo feito por Gomes e colaboradores (2006) o soro de cães que viviam em áreas endêmicas para leishmaniose visceral reconheceu 5 proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, com forte reação a proteínas com massa molecular de 44 kDa e 45 kDa. Nesse mesmo estudo, observou-se que o soro de raposas que viviam nessa área endêmica reconheceu uma proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis* com massa molecular de 44 kDa.

No mesmo ano Diana Bahia e colaboradores (2006) observaram que anticorpos presentes no soro de cães com leishmaniose visceral, que foram infectados naturalmente, reconheciam duas proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis*. Essas proteínas possuem massa molecular de 28,6 kDa e 47,3 kDa. A proteína de 28,6 kDa foi identificada pelos autores como LuLo-D7, uma proteína pertencente à subfamília D7 de proteínas salivares de dípteros hematófagos.

Enquanto a proteína de 47,3 kDa foi identificada como Lulo Yellow, que pertence à família de proteínas *Yellow* presente exclusivamente em insetos. Essas proteínas são assim denominadas porque, em estudos com drosófilas, quando havia a mutação de um gene específico era produzido um fenótipo amarelo nos insetos, indicando que o processo de melanização era interrompido e uma nova proteína era

produzida. Nesse caso, as proteínas possuem uma função estrutural na pigmentação (Ribeiro et al, 2010; Geyer et al, 1986).

Em flebotomíneos essas proteínas são encontradas em abundância no sialoma, produzindo bandas fortes em cromatogramas de extratos de glândulas salivares (Ribeiro et al, 2010), o que lhes confere boa capacidade para serem marcadores de exposição de vetores (Bahia et al, 2007). Outra função conhecida para as proteínas da família *Yellow* em flebotomíneos é a de serem kratagonistas. Proteínas kratagonistas são um grupo de proteínas de insetos hematófagos que possuem um mecanismo de ação comum: ligação e sequestro de agonistas farmacologicamente ativos tais como a adrenalina, a histamina e etc. Esses mediadores são liberados por plaquetas ativadas, mastócitos e neutrófilos ou após alguma lesão tecidual, e fazem parte de um potente sistema de *feedback* positivo que é induzido pouco tempo após a picada, sendo fundamental na auto ativação e propagação da resposta hemostática. (Arca e Ribeiro, 2018).

Proteínas do tipo *Yellow* também possuem similaridades com as proteínas da geléia real, que estão relacionadas ao desenvolvimento de abelhas, e, nesses insetos, envolve o metabolismo de catecolaminas. Existe a hipótese de que as proteínas da família *Yellow* possam catabolizar catecolaminas vasoconstritoras, possuindo assim função importante durante a hematofagia (Albert et al, 1999; Bahia et al, 2007).

Dentre as proteínas que foram reconhecidas pelos anticorpos em nossos experimentos, a que possui massa molecular de 43 kDa é a que mais se assemelha em massa molecular às proteínas da família *Yellow*, apesar de não serem idênticas.

Esse fato poderia ser explicado de duas formas: a primeira é que a eletroforese nos permite observar a massa molecular aproximada das bandas dos géis, mas essa medida não é exata e pode variar por inúmeros fatores, desde a qualidade do material até a acuidade do profissional que realiza os experimentos e as medidas. Muitas vezes os autores fazem apenas uma estimativa das massas moleculares sem realmente calcularem seus valores. A segunda é a variabilidade fenotípica existente entre as populações dentro do complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis* (Souza et al, 2017), que poderia gerar diferentes composições salivares.

Além disso, as proteínas salivares podem ser diferentes a depender da idade (em dias) da fêmea adulta e do seu tipo de alimentação (Prates et al, 2008).

A saliva de flebotomíneos possui ação imunomodulatória e além de inibir o sistema complemento, ela é capaz de lidar e subverter o sistema imune adaptativo de seus hospedeiros vertebrados.

A saliva de *Lutzomyia longipalpis* possui moléculas que têm a atividade quimiotática para macrófagos e, ao mesmo tempo, efeito inibitório na ativação de células T e macrófagos através da inibição da expressão de citocinas Th1 e indução da expressão de Th2 em macrófagos já ativados. Ainda nos macrófagos induz a formação de corpos lipídicos e prostaglandinas, ação que inibe o estímulo inflamatório no local da picada. Induz ainda a apoptose de neutrófilos e inibe a produção de quimiotáticos para essas células através da indução da produção de prostaglandinas e interleucinas em células dendríticas (Abdeladhim et al. 2015).

Em imunologia, considera-se que moléculas imunodominantes são aquelas que interagem com maior afinidade de ligação às células apresentadoras de antígenos, e que por isto produzem uma resposta imunológica mais forte. Por outro lado, observa-se que antígenos solúveis, tais quais as proteínas salivares, são geralmente muito pouco imunogênicos, exceto quando formuladas em adjuvantes apropriados. (Vogel e Bachmann, 2019).

Faz sentido que as proteínas com funções importantes para a hematofagia não sejam facilmente reconhecidas por anticorpos. Considerando que a saliva possui a capacidade de lidar com as diferentes vertentes do sistema imune de vertebrados e que grande parte das proteínas salivares não é reconhecida por anticorpos anti-saliva produzidos de forma natural, propõe-se que a saliva possui algumas proteínas mais imunogênicas que outras. As proteínas imunodominantes devem, certamente, ter o papel de desviarem a resposta imune para elas mesmas a fim de "protegerem" a atividade de outras moléculas salivares com função importante para o sucesso da hematofagia. Tais insetos, provavelmente, evoluíram de tal forma que aquelas proteínas salivares com funções importantes se tornaram menos imunogênicas e, portanto, antígenos ruins para produção de anticorpos.

Além da baixa imunogenicidade de grande parte das moléculas salivares, as proteínas imunomoduladoras presentes na saliva provavelmente têm o papel de

dificultar o aparecimento de alguma resposta imunológica contra as proteínas salivares. Inclusive contra aquelas que possuem funções importantes para que a hematofagia possa ocorrer.

6.2 A avaliação de algumas das funções salivares essenciais para a hematofagia diante de anticorpos anti-saliva

Nossos experimentos indicam que as atividades salivares de inibição da coagulação sanguínea e inibição da via clássica do sistema complemento humano, não são alteradas na presença de anticorpos anti-saliva. Entretanto, outros grupos de pesquisa já observaram como um inseto seria afetado ao se alimentar em um hospedeiro que já foi exposto à repetidas picadas.

Em 1988 Ghosh e Mukhopadhyay imunizaram hamsters com picadas de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Phlebotomus argentipes*. Enquanto em nossos ensaios fizemos 3 exposições a picadas, nesse estudo foram realizadas 6 exposições com intervalos de 15 dias entre elas, sendo cada hamster exposto de 90 a 150 insetos. A produção de anticorpos anti-saliva foi comprovada por ensaio de ELISA. Em um experimento paralelo, fêmeas eram colocadas para realização de repasto repetidas vezes em um mesmo animal, chegando a um total de 11 exposições. Em seguida foram contabilizados dados de mortalidade dos insetos e observou-se que fêmeas que se alimentavam em animais imunizados (11 exposições) morriam mais. Contudo, eles não avaliaram em seu estudo se a função das proteínas salivares havia sido afetada.

Vilela e colaboradores (2006) realizaram a imunização de coelhos, também de forma natural, com picadas de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. A produção de anticorpos também foi comprovada com ensaio de ELISA. Dentre os parâmetros avaliados, observou-se que o tempo de alimentação das fêmeas de flebotomíneos em animais imunizados era maior (1-2h) em relação ao grupo controle (30-40min), mas que a quantidade de sangue ingerida era equivalente.

Nesse caso, podemos supor que os anticorpos anti-saliva produzidos pelos coelhos foram capazes de interagir com a saliva dos insetos de forma que a obtenção de sangue foi, até certo ponto, dificultada. Ainda assim, os insetos conseguiram se alimentar bem. É difícil avaliar quais fatores influenciaram neste resultado. Pode ser que seja o somatório de diversos fatores. Quando um destes fatores é analisado separadamente sua influência pode não ser percebida.

Devemos considerar que animais diferentes podem responder de forma específica a antígenos. Se isto for aplicado aos antígenos salivares de *Lutzomyia longipalpis*, poderíamos especular que roedores respondem pior aos antígenos salivares do que os coelhos, e que por isso observamos resultados um pouco diferentes dos resultados dos autores acima citados.

Embora *Lutzomyia longipalpis* seja um inseto eclético em relação aos hospedeiros nos quais se alimenta, pode ser que existam alguns hospedeiros que se tornaram preferenciais justamente por não apresentarem boa resposta imunológica contra a saliva desta espécie de inseto.

Os ensaios para testar a inibição da atividade salivar de *Lutzomyia longipalpis* na presença de soro contendo anticorpos não apresentaram alterações significativas, ou seja, a saliva continuava a inibir a via clássica do sistema complemento humano.

Por outro lado, Cavalcante e colaboradores (2003), em um ensaio semelhante ao nosso, porém com o uso de soro de hamsters imunizados, viram que existia uma tendência da inibição do efeito da saliva, apesar de os resultados não serem estatisticamente significantes. Provavelmente, nesse caso, havia alguma interação entre os anticorpos anti-saliva e o inibidor salivar da via clássica do sistema complemento.

Ainda que a inibição da via clássica do sistema complemento falhasse em nível salivar, estes insetos, muito provavelmente, poderiam completar o repasto e a digestão sanguínea graças aos inibidores do sistema complemento solúveis presente no intestino de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e a capacidade desta espécie captar fator H (um fator regulador negativo do complemento) na superfície dos enterócitos (Saab et al, 2020).

Além do ensaio de hemólise, realizamos ensaio para avaliar a capacidade da saliva de inibir a coagulação. Essa função não foi alterada pela presença de anticorpos. Valenzuela e colaboradores (2004) encontraram seis clusters de proteínas salivares com potencial ação anticoagulante: LJL91, LJL15, LJL18, LJM10, LJS142 e LJM06. Além da proteína Lufaxin (LJL143 - 32.4 kDa), caracterizada posteriormente por Collin e colaboradores (2012), com ação anticoagulante comprovada. Todas essas proteínas possuem massa molecular distinta daquelas reconhecidas pelos anticorpos produzidos em nossos experimentos.

Essa divergência é um dos fatores que explica o porquê de a função anticoagulante não ter sido afetada. Além disso, mesmo que os anticorpos reconheçam a Lufaxin e a inibam, por exemplo, a redundância da ação anticoagulante da saliva garante que o sangue não coagule e que o repasto seja concluído com sucesso pelo inseto.

É de se esperar que insetos hematófagos bem sucedidos, como os flebotomíneos, não tenham sua alimentação bloqueada tão facilmente pela resposta imunológica de seus hospedeiros, caso contrário a obtenção de sangue não seria adequada e deixaria de ser uma vantagem evolutiva. A hematofagia é uma rede entrelaçada composta por estratégias advindas do espoliador, dos patógenos envolvidos e do hospedeiro vertebrado, que reúne vários detalhes mínimos e importantes em seu conjunto, necessários para sua sustentação.

6.3 Próximos passos

Apesar dos esforços para realizarmos o maior número possível de experimentos, enfrentamos algumas adversidades por causa da pandemia do vírus Sars-Cov-2 e alguns testes precisaram ser reagendados.

Realizaremos ensaios para a via alternativa do sistema complemento, usando anticorpos provenientes de soro de animais imunes. Para complementar o teste da inibição da via alternativa propomos também a realização de ensaio de deposição de proteínas do complemento.

A saliva possui também a função de inibir a agregação plaquetária. Para testar essa função realizaremos o teste da atividade da enzima apirase presente na saliva. Essa enzima hidrolisa moléculas de ATP e ADP em AMP no local da picada, inibindo assim a agregação plaquetária. O princípio do teste é a quantificação de moléculas de íon fosfato liberadas em uma amostra contendo a enzima, ADP, a saliva e os anticorpos. Os resultados preliminares indicam que essa função salivar também não será afetada, mas mais testes precisam ser realizados.

Em nosso planejamento também pretendemos realizar experimentos in vivo de inibição da vasodilatação pelo peptídeo Maxadilan em camundongos *hairless*. Em breve novos animais serão imunizados e os testes serão feitos. Certamente, pela grande potência da proteína Maxadilan, essa função não será afetada.

Além disso, pretendemos realizar os mesmos testes com soro de animais imunizados com um número maior de exposição a picadas de insetos (seis sessões de exposição às picadas).

Por fim, os trabalhos de imunização deverão se estender em seres humanos tão logo as atividades na universidade estejam regularizadas e seja segura a convocação de voluntários.

7. Conclusões

- Picadas de fêmeas de flebotomíneos são capazes de induzir a produção de anticorpos IgG anti-saliva em hospedeiros murinos (camundongos linhagem Swiss).
- Os anticorpos produzidos de forma natural pelos camundongos reconhecem somente 3 entre aproximadamente 35 proteínas salivares principais de *Lutzomyia longipalpis.* Se outras proteínas são reconhecidas, os níveis de anticorpos são tão baixos que as bandas não foram visualizadas.
- As proteínas reconhecidas pelos anticorpos aparentam possuir caráter de imunodominância e, em estudos epidemiológicos, poderiam ser usadas como marcadores de exposição aos insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, caso tal função seja testada e comprovada.
- A imunodominância pode estar relacionada também com uma estratégia de escape do sistema imune de hospedeiros, fato que será investigado em estudos futuros.
- A presença de anticorpos anti-saliva não foi capaz de alterar as funções salivares dentro dos parâmetros avaliados: inibição da via clássica do sistema complemento e inibição da coagulação sanguínea.

8. Bibliografia

Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG 2014. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infection, Genetics and Evolution* 28: 691–703.

Albert S, Bhattacharya D, Klaudiny J, Schmitzová J, Simúth J 1999. The Family of Major Royal Jelly Proteins and Its Evolution. *J Mol Evol* 49: 290–297.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M den, the WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence (M Kirk, Ed.). *PLoS ONE* 7: e35671.

Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 77: 665–693.

Aquino DMC, Barral-Netto M, Caldas AJM, Barral A, Miranda JC, Silva AAM 2010. Epidemiological Study of the Association between Anti-Lutzomyia longipalpis Saliva Antibodies and Development of Delayed-Type Hypersensitivity to Leishmania Antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 825–827.

Arcà B, Ribeiro JM 2018. Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. *Current Opinion in Insect Science* 29: 102–109.

Ashford RW 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology 30: 1269–1281.

Bahia D, Gontijo NF, León IR, Perales J, Pereira MH, Oliveira G, Corrêa-Oliveira R, Reis AB 2006. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of Lutzomyia longipalpis. *Parasitol Res* 100: 449–454.

Bahia D, Gontijo NF, León IR, Perales J, Pereira MH, Oliveira G, Corrêa-Oliveira R, Reis AB 2006. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of Lutzomyia longipalpis. *Parasitol Res* 100: 449–454.

Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The Role of Salivary and Intestinal Complement System Inhibitors in the Midgut Protection of Triatomines and Mosquitoes (P Bozza, Ed.). *PLoS ONE* 4: e6047.

Bates PA 2008. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology* 11: 340–344.

Bates PA, Depaquit J, Galati EA, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, Picado A, Ready PD, Salomón OD, Shaw JJ, Traub-Csekö YM, Warburg A 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites Vectors* 8: 131.

Batista LF da S, Matta VLR da, Tomokane TY, Pacheco AD, Silveira FT, Rossi CN, Marcondes M, Laurenti MD 2016. Canine antibody response to

Lutzomyia longipalpis saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49: 361–364.

Brummer-Korvenkontio H, Lappalainen P, Reunala T, Palosuo T 1994. Detection of mosquito saliva–specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93: 551–555.

Buezo Montero S, Gabrieli P, Montarsi F, Borean A, Capelli S, De Silvestro G, Forneris F, Pombi M, Breda A, Capelli G, Arcà B 2020. IgG Antibody Responses to the Aedes albopictus 34k2 Salivary Protein as Novel Candidate Marker of Human Exposure to the Tiger Mosquito. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10: 377.

Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.

Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.

CDC - DPDx - Leishmaniasis

Charlab R, Rowton ED, Ribeiro JMC 2000. The Salivary Adenosine Deaminase from the Sand Fly Lutzomyia longipalpis. *Experimental Parasitology* 95: 45–53.

Collin N, Assumpção TCF, Mizurini DM, Gilmore DC, Dutra-Oliveira A, Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Teixeira C, Ribeiro JMC, Monteiro RQ, Valenzuela JG, Francischetti IMB 2012. Lufaxin, a Novel Factor Xa Inhibitor From the Salivary Gland of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Blocks Protease-Activated Receptor 2 Activation and Inhibits Inflammation and Thrombosis In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2185–2198.

Collin N, Assumpção TCF, Mizurini DM, Gilmore DC, Dutra-Oliveira A, Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Teixeira C, Ribeiro JMC, Monteiro RQ, Valenzuela JG, Francischetti IMB 2012. Lufaxin, a Novel Factor Xa Inhibitor From the Salivary Gland of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Blocks Protease-Activated Receptor 2 Activation and Inhibits Inflammation and Thrombosis In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32: 2185–2198.

Conceição-Silva F, Morgado FN 2019. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9: 330.

Coutinho-Abreu IV, Valenzuela JG 2018. Comparative Evolution of Sand Fly Salivary Protein Families and Implications for Biomarkers of Vector Exposure and Salivary Vaccine Candidates. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8: 290.

Dantas-Torres F 2007. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Veterinary Parasitology* 149: 139–146.

Diaz LA, Prisayanh P, Qaqish B, Temple BR, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Friedman H, Karetnick M, Herbert SM, Valenzuela JG 2020. A Lutzomyia

longipalpis Salivary Protein Induces Cross-Reactive Antibodies to Pemphigus Autoantigen Desmoglein 1. *Journal of Investigative Dermatology* 140: 2332-2342.e10.

Drahota J, Lipoldová M, Volf P, Rohoušová I 2009. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunology* 31: 766–770.

Falcão de Oliveira E, Galati EAB, Oliveira AG de, Rangel EF, Carvalho BM de 2018. Ecological niche modelling and predicted geographic distribution of Lutzomyia cruzi, vector of Leishmania infantum in South America (MS Carvalho, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006684.

Ferreira VP, Fazito Vale V, Pangburn MK, Abdeladhim M, Ferreira Mendes-Sousa A, Coutinho-Abreu IV, Rasouli M, Brandt EA, Meneses C, Lima KF, Nascimento Araújo R, Horácio Pereira M, Kotsyfakis M, Oliveira F, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Gontijo NF, Collin N, Valenzuela JG 2016. SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly Lutzomyia longipalpis. *Sci Rep* 6: 19300.

Fraga TL, Fernandes MF, Pontes ERJC, Levay APS, Almeida da Cunha EB, França A de O, Dorval MEC 2016. Antissaliva Antibodies of Lutzomyia Longipalpis in area of Visceral Leishmaniasis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 35: 805–807.

Geraci NS, Mukbel RM, Kemp MT, Wadsworth MN, Lesho E, Stayback GM, Champion MM, Bernard MA, Abo-Shehada M, Coutinho-Abreu IV,

Ramalho-Ortigão M, Hanafi HA, Fawaz EY, El-Hossary SS, Wortmann G, Hoel DF, McDowell MA 2014. Profiling of Human Acquired Immunity Against the Salivary Proteins of Phlebotomus papatasi Reveals Clusters of Differential Immunoreactivity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 923–938.

Geyer PK, Spana C, Corces VG 1986. On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of Drosophila melanogaster. *The EMBO Journal* 5: 2657–2662.

Ghosh K 1998. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on Phlebotomus argentipes and Leishmania donovani. *International Journal for Parasitology* 28: 275–281.

Gillespie, Mbow, Titus RG 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22: 319–331.

Gomes R, Oliveira F 2012. The Immune Response to Sand Fly Salivary Proteins and Its Influence on Leishmania Immunity. *Front. Immun.* 3.

Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MSP, Barral A, Costa CHN 2007. Antibodies against Lutzomyia longipalpis saliva in the fox Cerdocyon thous and the sylvatic cycle of Leishmania chagasi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 127–133.

Griensven J van, Diro E 2012. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26: 309–322.

Guilpin VO, Swardson-Olver C, Nosbisch L, Titus RG 2002. Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from Lutzomyia longipalpis sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24: 437–446.

He F 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *BIO-PROTOCOL* 1.

Hostomska J, Rohousova I, Volfova V, Stanneck D, Mencke N, Volf P 2008. Kinetics of Canine Antibody Response to Saliva of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8: 443–450.

Kamhawi S 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections. *Microbes and Infection* 2: 1765–1773.

Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279–289.

Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, Andersen JF, Francischetti IMB, Chavakis T, Kopecký J, Pedra JHF, Kotsyfakis M, Chmelař J 2015. Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics* 128: 58–68.

Kupani M, Pandey RK, Mehrotra S 2021. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross‐talks with macrophages and dendritic cells. *J Cell Physiol* 236: 2255–2267.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ 1977. Experimental transmission of Leishmania chagasi, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Nature* 266: 628–630.

Laurenti MD, Santos Silveira VM dos, Costa Secundino NF, Corbett CEP, Pimenta PPF 2009. Saliva of laboratory-reared Lutzomyia longipalpis exacerbates Leishmania (Leishmania) amazonensis infection more potently than saliva of wild-caught Lutzomyia longipalpis. *Parasitology International* 58: 220–226.

Lavoipierre MMJ 1965. Feeding Mechanism of Blood-sucking Arthropods. *Nature* 208: 302–303.

Leishmaniasis

Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. *Journal of Biological Chemistry* 266: 11234–11236.

Lestinova T, Rohousova I, Sima M, Oliveira CI de, Volf P 2017. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania (G Milon, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005600.

Mans BJ 2011. Evolution of Vertebrate Hemostatic and Inflammatory Control Mechanisms in Blood-Feeding Arthropods. *J Innate Immun* 3: 41–51.

Martín-Martín I, Molina R, Jiménez M 2015. Kinetics of Anti-Phlebotomus perniciosus Saliva Antibodies in Experimentally Bitten Mice and Rabbits (S Rafati, Ed.). *PLoS ONE* 10: e0140722.

Marzouki S, Abdeladhim M, Abdessalem CB, Oliveira F, Ferjani B, Gilmore D, Louzir H, Valenzuela JG, Ahmed MB 2012. Salivary Antigen SP32 Is the

Immunodominant Target of the Antibody Response to Phlebotomus papatasi Bites in Humans (PA Bates, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1911.

Mendes-Sousa AF, Nascimento AAS, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2013. Different Host Complement Systems and Their Interactions with Saliva from Lutzomyia longipalpis (Diptera, Psychodidae) and Leishmania infantum Promastigotes (J Sturtevant, Ed.). *PLoS ONE* 8: e79787.

Mendes-Sousa AF, Vale VF do, Silva NCS, Guimaraes-Costa AB, Pereira MH, Sant'Anna MRV, Oliveira F, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Andersen JF, Valenzuela JG, Araujo RN 2017. The Sand Fly Salivary Protein Lufaxin Inhibits the Early Steps of the Alternative Pathway of Complement by Direct Binding to the Proconvertase C3b-B. Front. Immunol. 8: 1065.

Mendes-Sousa AF, Vale VF, Queiroz DC, Pereira-Filho AA, Silva NCS da, Koerich LB, Moreira LA, Pereira MH, Sant'Anna MR, Araújo RN, Andersen J, Valenzuela JG, Gontijo NF 2018. Inhibition of the complement system by saliva of Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 92: 12–20.

Modi GB, Tesh RB 1983. A Simple Technique for Mass Rearing Lutzomyia Longipalpis and Phlebotomus Papatasi (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory1. *Journal of Medical Entomology* 20: 568–569.

Mondragon-Shem K, Wongtrakul-Kish K, Kozak RP, Yan S, Wilson IBH, Paschinger K, Rogers ME, Spencer DIR, Acosta-Serrano A 2020. Insights

into the salivary N-glycome of Lutzomyia longipalpis, vector of visceral leishmaniasis. *Sci Rep* 10: 12903.

Mukbel RM, Khasharmeh RH, Hijjawi NS, Khalifeh MS, Hatmal MM, McDowell MA 2016. Human immune response to salivary proteins of wild-caught Phlebotomus papatasi. *Parasitol Res* 115: 3345–3355.

Nepomuceno DB, Paim RMM, Araújo RN, Pereira MH, Pessoa GCD, Koerich LB, Sant'Anna MRV, Gontijo NF 2020. The role of LuloPAT amino acid/proton symporters in midgut alkalinization in the sandfly Lutzomyia longipalpis (Diptera – Psychodidae). *Journal of Insect Physiology* 120: 103973.

Oliveira EF de, Oshiro ET, Fernandes WS, Ferreira AMT, Oliveira AG de, Galati EAB 2017. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 96: 178–181.

Oliveira F, Giorgobiani E, Guimarães-Costa AB, Abdeladhim M, Oristian J, Tskhvaradze L, Tsertsvadze N, Zakalashvili M, Valenzuela JG, Kamhawi S 2020. Immunity to vector saliva is compromised by short sand fly seasons in endemic regions with temperate climates. *Sci Rep* 10: 7990.

Pereira A, Cristóvão JM, Vilhena H, Martins Â, Cachola P, Henriques J, Coimbra M, Catarino A, Lestinova T, Spitzova T, Volf P, Campino L, Maia C 2019. Antibody response to Phlebotomus perniciosus saliva in cats naturally

exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with Leishmania infection. *Parasites Vectors* 12: 128.

Pollard EJM, Patterson C, Russell TL, Apairamo A, Oscar J, Arcà B, Drakeley C, Burkot TR 2019. Human exposure to Anopheles farauti bites in the Solomon Islands is not associated with IgG antibody response to the gSG6 salivary protein of Anopheles gambiae. *Malaria Journal* 18: 334.

Prates DB, Araújo-Santos T, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, Borges VM 2012. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research* 2012: 1–11.

Prates DB, Santos LD, Miranda JC, Souza APA, Palma MS, Barral-netto M, Barral A 2008. Changes in Amounts of Total Salivary Gland Proteins of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) According to Age and Diet. *Journal of Medical Entomology* 45: 409–413.

Quinnell RJ, Soremekun S, Bates PA, Rogers ME, Garcez LM, Courtenay O 2018. Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with Leishmania infantum. *Parasites Vectors* 11: 7.

Rangel EF, Lainson R (Eds.) 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

Ready P 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *CLEP*: 147.

Rêgo FD, Soares RP 2021. Lutzomyia longipalpis: an update on this sand fly vector. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 93: e20200254.

Rêgo FD, Soares RP 2021. Lutzomyia longipalpis: an update on this sand fly vector. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 93: e20200254.

Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyanij M, Ruiz-Maldonado R, Löve A, François G, Palosuo T 1994. Frequent Occurrence of IgE and lgG4 Antibodies against Saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* Mosquitoes in Children. *Int Arch Allergy Immunol* 104: 366–371.

Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 73–88.

Ribeiro JMC, Mans BJ, Arcà B 2010. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 767–784.

Risueño J, Spitzová T, Bernal LJ, Muñoz C, López MC, Thomas MC, Infante JJ, Volf P, Berriatua E 2019. Longitudinal monitoring of anti‐saliva antibodies as markers of repellent efficacy against *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus papatasi* in dogs. *Med Vet Entomol* 33: 99–109.

Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130: 493–499.

Saab NAA, Nascimento AAS, Queiroz DC, Cunha IGM da, Filho AAP, D'Ávila Pessoa GC, Koerich LB, Pereira MH, Sant'Anna MRV, Araújo RN, Gontijo

NF 2020. How Lutzomyia longipalpis deals with the complement system present in the ingested blood: The role of soluble inhibitors and the adsorption of factor H by midgut. *Journal of Insect Physiology* 120: 103992.

Salomon OD 2021. Lutzomyia longipalpis, Gone with the Wind and Other Variables. *Neotrop Entomol* 50: 161–171.

Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MM dos S, Rangel EF 2015. Lutzomyia longipalpis urbanisation and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 831–846.

Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG 2018. Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol* 3: 548–555.

Serafim TD, Iniguez E, Oliveira F 2020. Leishmania infantum. *Trends in Parasitology* 36: 80–81.

Silva NCS, Vale VF, Franco PF, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, Sant'Anna MRV, Rodrigues DS, Lima WS, Fux B, Araujo RN 2016. Saliva of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasites Vectors* 9: 445.

Silva R da, Sacks DL 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 55: 2802–2806.

Sima M, Novotny M, Pravda L, Sumova P, Rohousova I, Volf P 2016. The Diversity of Yellow-Related Proteins in Sand Flies (Diptera: Psychodidae) (YM Traub-Csekö, Ed.). *PLoS ONE* 11: e0166191.

Soares RPP, Turco SJ 2003. Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75: 301–330.

Solcà M da S, Arruda MR, Leite BMM, Mota TF, Rebouças MF, Jesus MS de, Amorim LDAF, Borges VM, Valenzuela J, Kamhawi S, Veras PST, Fraga DBM, Brodskyn CI 2021. Immune response dynamics and Lutzomyia longipalpis exposure characterize a biosignature of visceral leishmaniasis susceptibility in a canine cohort (CA Petersen, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 15: e0009137.

Sousa‐Paula LC de, Otranto D, Dantas-Torres F 2020. Lutzomyia longipalpis (Sand Fly). *Trends in Parasitology* 36: 796–797.

Souza AP, Andrade BB, Aquino D, Entringer P, Miranda JC, Alcantara R, Ruiz D, Soto M, Teixeira CR, Valenzuela JG, Oliveira CI de, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A 2010. Using Recombinant Proteins from Lutzomyia longipalpis Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4: e649.

Souza NA, Brazil RP, Araki AS 2017. The current status of the Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112: 161–174.

Spitzova T, Sumova P, Volfova V, Polanska N, Poctova L, Volf P 2020. Interactions between host biogenic amines and sand fly salivary yellow-related proteins. *Parasites Vectors* 13: 237.

The Weekly Epidemiological Record (WER)

Titus RG, Ribeiro JMC 1988. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. *Science* 239: 1306–1308.

Valenzuela JG, Garfield M, Rowton ED, Pham VM 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* , vector of *Leishmania chagasi*. *Journal of Experimental Biology* 207: 3717–3729.

Vilela ML, Souza NA, Oliveira SMP, Costa-Pinto D, Cabello PH, Rangel EF, Traub-Cseko YM 2006. Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Braz. J. Biol.* 66: 175–183.

Vinhas V, Andrade BB, Paes F, Bomura A, Clarencio J, Miranda JC, Báfica A, Barral A, Barral-Netto M 2007. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector,Lutzomyia longipalpis. *Eur. J. Immunol.* 37: 3111–3121.

Vlkova M, Rohousova I, Drahota J, Stanneck D, Kruedewagen EM, Mencke N, Otranto D, Volf P 2011. Canine Antibody Response to Phlebotomus

perniciosus Bites Negatively Correlates with the Risk of Leishmania infantum Transmission (PA Bates, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1344.

Vlkova M, Rohousova I, Hostomska J, Pohankova L, Zidkova L, Drahota J, Valenzuela JG, Volf P 2012. Kinetics of Antibody Response in BALB/c and C57BL/6 Mice Bitten by Phlebotomus papatasi (H Louzir, Ed.). *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1719.

Vogel M, Bachmann MF 2019. Immunogenicity and Immunodominance in Antibody Responses. In: Hangartner L, Burton DR (Eds.), *Vaccination Strategies Against Highly Variable Pathogens*, Springer International Publishing, Cham, pp. 89–102.

Volf P, ROHOUšOVÁ I 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37–41.

Volf P, Tesarova P, Nohynkova E 2000. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* 14: 251–256.

Volf P, Volfova V 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36: S1–S9.

Young DG, Duncan MA 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Associated Publ, Gainesville, Fla.

.

9. Anexos

Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade anti-hemostática e anti-complemento da saliva de Lutzomyia longipalpis na presença de soro de hospedeiros previamente imunizados contra proteínas salivares

Pesquisador: Nelder de Figueiredo Gontijo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38728320.2.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.512.912

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental que requer material humano (sangue) para fonte de reagente para ensaios laboratoriais. O objetivo da pesquisa é testar a funcionalidade da saliva (capacidade de impedir a coagulação sanguínea, impedir a agregação plaquetária e inibir as vias clássica e alternativa do complemento) do mosquito Lutzomyia longipalpis na presença de anticorpos anti-saliva produzidos por camundongos ou seres humanos que foram imunizados experimentalmente por picadas. No que diz respeito à pesquisa envolvendo seres humanos, pretende-se realizar testes com o soro de seres humanos. 1 - Serão imunizadas por picadas três pessoas (3 membros voluntários do grupo de pesquisa do pesquisador principal) para realização de um pool com esses soros. 2 - Também será coletado sangue de outros três voluntários que não serão imunizados por picadas para obtenção de um pool de soro controle. 3 - Numa segunda etapa, para obtenção de plasma enriquecido de plaquetas, sangue de um único voluntário será coletado. 4 – Para testes de complemento, soro humano normal e ativo serão coletados de 5 novos voluntários não imunizados com saliva do inseto (o complemento nos demais voluntários terá sido inativado pelo calor). Serão coletados 5 ml de sangue de cada indivíduo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é testar a funcionalidade da saliva (capacidade de impedir a coagulação sanguínea, impedir a agregação plaquetária e inibir as vias clássica e alternativa do complemento)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2_coleta_de_sangue_e_imunizacao_CORRECAO_DEZ_2020.docx	08/01/2021 09:31:32	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_1_coleta_de_sangue_CORRECAO_DEZ_2020.docx	08/01/2021 09:30:56	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Nelder_COMPLETO_carimbo.pdf	08/01/2021 09:30:40	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
Outros	Carta_comite_de_etica.pdf	01/10/2020 08:34:54	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
Outros	Parecer_consubstanciado_nelder_gontijo.pdf	01/10/2020 08:33:59	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Isabella_Goes.pdf	18/07/2020 09:44:13	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_Biorrepositorio_ISABELLA_Nelder.pdf	18/07/2020 09:43:08	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Nelder_Gontijo.pdf	18/07/2020 09:41:06	Nelder de Figueiredo Gontijo	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BELO HORIZONTE, 27 de Janeiro de 2021

Assinado por:
Crissia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Certificado do CEUA

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-hemostática e anti-complemento da saliva de Lutzomyia longipalpis na presença de soro de hospedeiros previamente imunizados contra proteínas salivares ", protocolo do CEUA: 67/2020 sob a responsabilidade de Nelder de Figueiredo Gontijo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 25/05/2020.

Vigência da Autorização	25/05/2020 a 24/05/2025
Finalidade	Pesquisa
***Espécie/linhagem**	Camundongo heterogênico / Mus musculus/Swiss
Nº de animais	6
Peso/Idade	30g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	CEBIO/UFMG
***Espécie/linhagem**	Camundongo heterogênico / Mus musculus/Swiss
Nº de animais	6
Peso/Idade	30g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	CEBIO/UFMG
***Espécie/linhagem**	Camundongo heterogênico / Mus musculus/Hairless
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos/ ICB-UFMG
***Espécie/linhagem**	Camundongo heterogênico / Mus musculus/Hairless
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos/ICB-UFMG
***Espécie/linhagem**	Ovino / Carneiro (qualquer um) só precisamos de um pouquinho de sangue (5 mL) p/ fazer todos os exp.
Nº de animais	1
Peso/Idade	70kg / 3(anos)
Sexo	masculino
Origem	Escola veterinária

Considerações posteriores:

25/05/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 25/05/2020. Validade: 25/05/2020 à 24/05/2025.

Belo Horizonte, 26/05/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br