

## PERFIL PROTEICO DA GLÂNDULA SALIVAR DE FLEBOTOMÍNEOS DA ESPÉCIE *Lutzomyia umbratilis* WARD & FRAIHA, 1977, AM-BRASIL

Antônio Jucélio Farias BARBOSA<sup>1</sup>  
Liliane Coelho da ROCHA<sup>2</sup>  
Glenda Dorval SENA<sup>3</sup>  
Antônia Maria Ramos FRANCO<sup>3</sup>  
Maricleide de Farias NAIFF<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Co-Orientador(a); <sup>3</sup>Colaborador(a); <sup>4</sup>Orientador(a)  
Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/INPA

### INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas que envolvem a saúde pública no Amazonas são as diversas doenças vetoriais, dentre elas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) destaca-se entre com significantes registros de casos (SINAN 2012).

O agente etiológico da Leishmaniose é um parasito unicelular do gênero *Leishmania* pertencente à família Trypanosomatidae, possuem como vetores os flebotomíneos, insetos de pequeno porte pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Young e Duncan 1994). O estabelecimento da infecção por *Leishmania spp.* ocorre após o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Pimenta *et al.* 2012). Como em todo cenário de transmissão de doenças vetoriais, somente as fêmeas possuem o hábito da hematofagia, necessitando realizar o repasto sanguíneo para suprir demandas nutricionais e principalmente para maturação dos ovários (Carrera 1991; Neves *et al.* 2005).

Durante a hematofagia esses insetos regurgitam junto com a saliva, formas infectantes de *Leishmania* na pele do hospedeiro. A obtenção do sucesso durante a alimentação, dispõe da colaboração de complexo grupo de componentes salivares farmacologicamente ativos que atuam principalmente com função anti-hemostática, anti-inflamatória e imunomoduladoras (Fontaine *et al.* 2011).

Estudos proteômicos sugerem que a presença desses compostos salivares é crucial no desenvolvimento da resposta imunológica (Kamhawi, 2000) e na exacerbação da infecção por *Leishmania* em hospedeiro vertebrado (Titus e Ribeiro 1988; Lerner *et al.* 1991).

A elucidação destes complexos é importante para a melhor compreensão da relação parasito/hospedeiro na leishmaniose tegumentar em nosso Estado já que estudos deste tipo com espécies da nossa região são quase inexistentes.

Com base nestes fatores, este estudo se propôs a analisar o perfil de proteínas da glândula salivar da espécie *Lutzomyia umbratilis* através da confecção e análise de géis SDS para o estudo do perfil de proteínas.

### MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em áreas de mata de terra firme ao longo na Rodovia AM 070 (Rodovia Manuel Urbano) situada à margem esquerda do Rio Solimões, especificamente, nas mediações do Ramal Nova esperança (03°14'51" S e 60°31'41" W) município de Manacapuru. Pode-se observar que a área têm sido alvo de ação antrópica com existência de um pequeno assentamento além de algumas clareiras oriundas da exploração de madeira. A captura dos insetos foi feita com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC (CDC "miniature" - Hausherr' Machine Works, New Jersey, EUA). Os insetos capturados foram acondicionados em gaiolas e mantidos em câmara úmida até sua dissecação para o isolamento da glândula salivar. A identificação da espécie foi realizada de acordo com a chave taxonômica de Young e Duncan (1994).

Após os procedimentos de triagem, as fêmeas ainda vivas, foram imobilizadas no freezer a -20°C por dois minutos, em seguida foram lavadas com solução de detergente e água destilada. Após esse processo foram colocadas, até o momento da dissecação, em um recipiente contendo solução de tampão fosfato salino (PBS 1x) em caixa de isopor com gelo (~0°C).

Posteriormente, os insetos individualmente foram posicionados em uma lâmina de vidro contendo uma gota de PBS 1x e com a ajuda dos estiletos, foi realizada a separação da região torácica da região da cabeça e concomitantemente a identificação da espécie. Desta forma, as glândulas salivares foram expostas, isoladas e limpas. Após o isolamento, as glândulas retiradas foram acondicionadas em microtubos de polipropileno com capacidade para 1,5 mL contendo 10 µL de PBS1X combinadas em grupos de 20 pares para cada microtubo onde foram conservadas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas em freezer a -80° C até o momento de uso.

Para análise dos extratos proteicos, foram preparados dois géis unidimensionais de poli-acrilamida a 10%. As amostras foram solubilizadas em tampão da amostra (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol e 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubadas a 100 °C por 5 min. A corrida foi realizada a 200 V a temperatura ambiente e os géis corados por Comassie Coloidal Brilliant Blue G-250. Após esta etapa os géis foram digitalizados utilizando-se ImageScanner™III (GE Healthcare) e analisados pela comparação das bandas reveladas com a descrição da literatura, analisando-se as massas moleculares de cada banda expressa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as excursões foram coletados 700 flebotomíneos de várias espécies e 238 fêmeas de *L. umbratilis* foram dissecadas, identificadas e suas glândulas isoladas.

O perfil eletroforético da glândula salivar de *L. umbratilis* pode ser visualizado na figura 1. O gel mostra dez bandas proteicas de 14 a 97 kDa.



Figura1. Perfil proteico de glândula salivar de *Lutzomyia umbratilis* em gel de poli-acrilamida 12% corado com nitrato de prata. 1: homogeneizado de glândula salivar; MM: Padrão de Peso Molecular em kDa.

O papel das glândulas salivares dos flebotomíneos e de outros vetores de doenças tem se mostrado essencial em sua alimentação. O fluido salivar, que é rico em proteínas com diversas funções, incluindo moduladores de respostas fisiológicas e imunológicas do hospedeiro a picadas de insetos, facilita a invasão do parasito no hospedeiro e o estabelecimento da infecção. A variação na estrutura, expressão gênica e composição de proteínas de glândulas salivares refletem uma adaptação complexa da alimentação de flebotomíneos em vários hospedeiros e a transmissão de diferentes espécies de parasitos de *Leishmania* para os mamíferos. Devido a isso, as glândulas salivares se tornaram alvos importantes para o desenvolvimento de potenciais intervenções anti-leishmaniose (Valenzuela *et al.* 2001).

Estudos do perfil proteico de espécies de flebotomíneos vetores de leishmaniose visceral (LV) e LT tem despertado interesse de diversos grupos de pesquisa, inclusive nas Américas. Dentre os já descritos podemos destacar os do gênero *Phlebotomus* como *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti* e *P. langeroni* que apresentou uma variação no número de bandas de 8 a 14 com massa molecular de tamanho de 8-70 kDa (Wahba e Riera 2006) e de populações de *L. ovallesi* que apresentaram 11 bandas proteicas com destaque para bandas com peso molecular entre 16 e 99 kDa (Nieves *et al.* 2012) similares ao resultados de populações de *L. duboscqi* (Kato *et al.* 2006). Os resultados com *L. umbratilis* foram consistentes com os perfis já descritos com número aproximado de bandas e massa molecular semelhante.

Diversas proteínas têm sido identificadas na secreção salivar de alguns flebotomíneos vetores dentre elas, as com função conhecida temos em *L. longipapis*, vetor nas américas de *L. chagasi*, uma proteína salivar responsável pela inibição da via clássica do sistema do complemento humano identificada como sendo a LJM19, uma proteína recombinante de aproximadamente 11 kDa que é encontrada na saliva como um dímero de 22,3 kDa (Vale 2011). Outra importante substância da saliva desta espécie é o maxadilan (MAX) um peptídeo de 7kDa que funciona como

vasodilatador potente com propriedades imunomodulatórias (Lerner *et al.* 1991). Várias publicações implicaram-no como fator de promoção da infecção, desviando a resposta Th1 para Th2 e favorecendo a evolução da doença (Soares *et al.* 1998; Rogers e Titus 2003; Gillespie *et al.* 2000). Em vetores do gênero *Phlebotomus* foi identificada a proteína apirase de 35,7 kD que possui função de fatores antiplaquetários pela hidrólise do fator ativador de plaquetas adenosina difosfato (Kato *et al.* 2006).

Como pode ser visto a maior parte dos estudos sobre proteínas se concentra em espécies que não circulam no Brasil e que transmitem a LV. Por isso, o estudo com *L. umbratilis* é relevante para a região Norte, pois a identificação e conhecimento da função destas proteínas são essenciais para se entender a sua participação na transmissão e estabelecimento da infecção na LT no hospedeiro humano, proporcionando assim condições de estabelecer bloqueios do processo de transmissão.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelam as primeiras bandas de proteínas da glândula salivar desta espécie a serem descritas, e esse perfil proteico serve como base para a continuidade dos estudos na identificação das proteínas e investigação da função de cada uma na transmissão e estabelecimento da infecção por *L. guyanensis*. O conhecimento a respeito destes processos pode permitir o desenvolvimento de estratégias para o controle de doença como a transmitida por essa espécie de flebotomíneo.

## REFERÊNCIAS

- Carrera, M. 1991. Insetos de interesse médico e veterinário. Ed da UFPR. Curitiba, Paraná. 228pp.
- Nieves, E.; Sánchez, Y.; Sánchez, H.; Rondón, M.; González, N.; Carrero, J. 2012. Sandfly saliva of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a possible marker for the transmission of *Leishmania* in Venezuela Andes region. *J Vector Borne Dis*, 49: 8–14.
- Fontaine, A.; Pascual, A.; Diouf, I.; Bakkali, N.; Bourdon, S.; Fusai, T.; Rogier, C.; Almeras, L. 2011. Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. *Parasit Vectors*, 4: 33.
- Gillespie, R.D.; Mbow, M.L.; Titus, R.G. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*, 22: 319-31.
- Kamhawi, S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infec*, 2(14): 1765-73.
- Kato, H.; Anderson, J.; Kamhawi, S.; Oliveira, F.; Lawyer, P.; Pham, V. 2006. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscai* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics*; 7: 205–26.
- Lerner, E.A.; Ribeiro, J.M.; Nelson, R.J.; Lerner, M.R. 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.
- Neves, D.; Melo, A.; Linardi, P.; Vitor, R. 2005. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo. Atheneu. 47p.
- Nieves, E.; Sánchez, Y.; Sánchez, H.; Rondón, M.; González N.; Carrero, J. 2012. Sandfly saliva of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a possible marker for the transmission of *Leishmania* in Venezuela Andes region. *Journal of Vector Borne Diseases*, 49: 8–14.
- Ready, P.D.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ward, R.D. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 76(01): 21-40.
- Ribeiro, J.M. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32:463-78.
- Rogers, K.A.; Titus, R.G. 2003. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite Immunology*, 25: 127-34.
- SINAN. 2014. Sistema de Informações de Agravos de Notificação. (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>). Acesso em 20/06/2014.
- Soares, M.B.; Titus, R.G.; Shoemaker, C.B.; David, J.R.; Bozza, M. 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sandfly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *The Journal of Immunology*, 160: 1811-6.
- Titus, R.G.; Ribeiro, J.M. 1988. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239(4845): 1306-1308.
- Vale, V.F. 2011. *Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 105p.
- Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Garfield, M.K. 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 194: 331–42.

Vale, V.F. 2011. Estudo da atividade inibidora do sistema do complemento humano presente na saliva e conteúdo intestinal de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 105p.

Wahba, M.; Riera, C. 2006. Salivary gland composition of some Old World vector sand fly. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 36(1):289–96.

Young, D.G.; Duncan, M.A. 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Florida, Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers, 881p.