

CAPÍTULO 12

1

A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores.

Paulo Filemon Paolucci Pimenta, Vanessa Cabreira de Freitas e Nágila Francinete Costa Secundino.

Laboratório de Entomologia Médica, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-MG. Av. Augusto de Lima, 1715 - CEP 30190-002 Belo Horizonte, M.G. Brazil. Correspondência eletrônica: pimenta@cpqrr.fiocruz.br; vanesfreitas@cpqrr.fiocruz.br e nagila@cpqrr.fiocruz.br

Copyright: © 2012 [Paulo Filemon Paolucci Pimenta, Vanessa Cabreira de Freitas e Nágila Francinete Costa Secundino] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais

Por que estudar a interação de patógenos com seus vetores ?

Vários artrópodes, tais como carrapatos, piolhos, barbeiros, flebotomíneos e mosquitos, são transmissores de patógenos causadores de doenças que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, atingem e matam milhões de pessoas (WHO, 2010). O desenvolvimento de novas tecnologias tem permitido um avanço significativo nos estudos de muitas doenças, entretanto, em regiões tropicais, vários agentes infecciosos continuam sendo transmitidos por insetos vetores. Algumas dessas doenças, antigamente restritas às áreas rurais, atualmente atingem grandes cidades. Exemplo clássico é a leishmaniose, doença com importante espectro clínico e grande diversidade epidemiológica, que ocorre em vários países, inclusive com ampla distribuição no Brasil.

Nos últimos anos, novos grupos de pesquisas do Brasil e de outros países têm focado no estudo de insetos vetores. Alguns deles têm se dedicado a uma área ainda pouco explorada: o conhecimento da biologia da interação dos patógenos com os seus respectivos vetores. O melhor conhecimento dos mecanismos de interação celular e molecular entre o patógeno e o seu vetor, assim como da transmissão do patógeno ao hospedeiro vertebrado, é necessário para sedimentar as bases de estudos de vacinas de bloqueio da transmissão e ao desenvolvimento de insetos transgênicos, os quais são considerados ferramentas importantes ao combate a patógenos causadores de doenças em humanos.

Neste capítulo são apresentadas informações sobre o conhecimento atual do processo da interação vetor-parasito dos protozoários causadores das leishmanioses e da transmissão desses patógenos ao hospedeiro vertebrado.

***Leishmania*: O Desenvolvimento no Inseto vetor e a Transmissão ao Hospedeiro Vertebrado.**

As leishmanioses - As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e estão presentes em 98 países ou territórios (WHO, 2010). Mais de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco e, a cada ano, 500 mil desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Ocorrências de mais de 90% dos casos são registradas nos países da África, Ásia e América Latina.

Os dados mais antigos sobre as leishmanioses nas Américas são possivelmente do Peru, da época dos Incas. Achados arqueológicos desse período já mostravam deformidades semelhantes às lesões destrutivas de narinas e lábios em humanos, sugerindo que foram causadas pelas

leishmanioses cutâneas. Portanto, a leishmaniose tegumentar americana é considerada autóctone do continente americano (Pessoa & Barreto, 1948; Azulay, 1952).

As infecções por *Leishmania* podem acarretar diferentes manifestações clínicas que dependem da espécie do protozoário e do status imunológico do hospedeiro. A doença ocorre sob duas formas principais: a cutânea, a qual inclui a forma difusa e a muco-cutânea; e a visceral (WHO, 2006). As formas cutâneas podem causar lesões desfigurantes na pele e mucosas e a forma visceral pode ser fatal se não for tratada, podendo causar milhares de mortes. No homem, vinte e uma espécies de *Leishmania* são agentes causadores das leishmanioses (Herwaldt, 1999; WHO, 2010). Até o momento, 30 flebotomíneos são vetores comprovados ou suspeitos na transmissão de *Leishmania*, apesar de existirem aproximadamente 1000 espécies já descritas (Desjeux, 2004).

3

O protozoário *Leishmania* - Durante o século XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Whright, Linderberg e Vianna, em pesquisas independentes, identificaram o protozoário como causador de leishmanioses, sendo que em 1903, Ronald Ross, um pesquisador militar inglês, deu o nome genérico *Leishmania* (WHO, 2010). Protozoários parasitos do gênero *Leishmania* são membros da família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida) que compreendem organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo e de uma organela rica em DNA, o cinetoplasto. A *Leishmania* possui duas formas principais: (a) os amastigotas intracelulares - células ovóides, imóveis e sem flagelo aparente encontradas em fagócitos mononucleados de mamíferos e (b) os promastigotas - células alongadas, flageladas e com grande mobilidade encontrada exclusivamente no intestino do vetor (Figura 1).

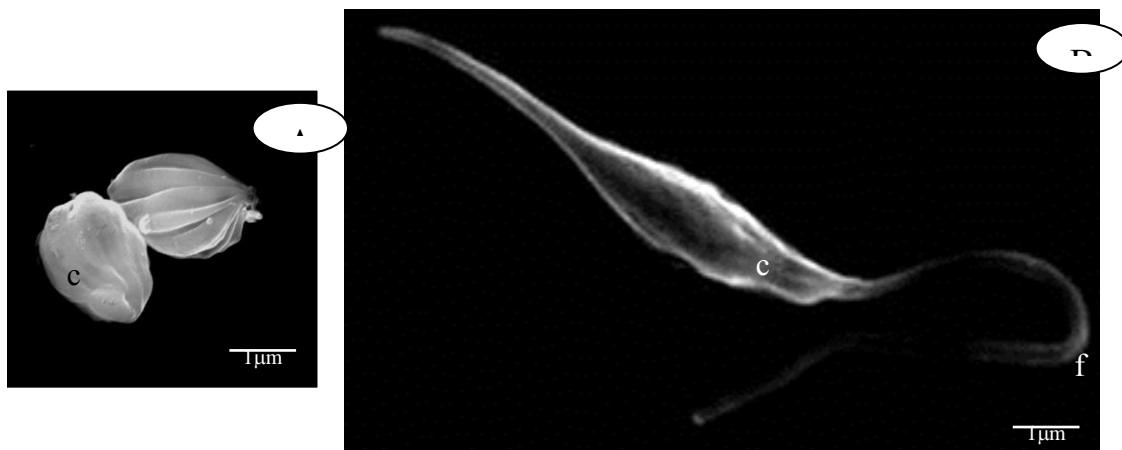


Figura 1: Amastigotas (A) e promastigotas (B) de *Leishmania infantum chagasi* observadas em microscópio eletrônico de varredura. C = corpo celular; f = flagelo. Observe que as figuras estão no mesmo aumento mostrando

a diferença no tamanho das duas formas do parasito (Fotos de Márcio Sobreira e Vanessa Freitas – Fiocruz-MG, CPqRR).

As formas genericamente denominadas “promastigotas” são facilmente cultiváveis e, portanto, as mais estudadas. Deve ser ressaltado que durante o ciclo de vida no inseto vetor, “morfotipos” distintos de promastigotas estão presentes como será discutido posteriormente. Quanto aos amastigotas, é também possível cultivá-los infectando macrófagos e outras células de mamíferos, entretanto, na ausência de células hospedeiras exige condições apropriadas dependente das espécies de *Leishmania*.

4

O inseto vetor - A associação de doenças em humanos com insetos é conhecida desde os tempos antigos. Registros históricos sugerem que eles são reconhecidos como transmissores das leishmanioses nas Américas desde 1764, quando habitantes dos Andes Peruvianos diziam que a doença era causada pela picada de um pequeno inseto chamado “Uta” (*apud* Herrer & Christensen, 1975). No Brasil, dependendo da região geográfica, eles são popularmente conhecidos como: “mosquito palha”, “birigui”, “flebotomo”, “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha” ou “provarinho”. Conjectura-se que a maioria destes nomes populares dados aos flebotomíneos tem relação com as suas características físicas ou comportamentais (por exemplo: mosquito palha = cor do inseto; cangalhinha = posição do tórax semelhante a uma “cangalha”; asa dura e asa branca = características das asas; “provarinho” = ato de “provar” a pele antes de picar os hospedeiros, etc...).

A primeira descrição científica de um flebotomíneo (Diptera, Insecta, Psychodidae, Phlebotominae) foi feita por Philippo Bonanni em 1691, em Roma (*apud* Beaty & Marguardt 1996). Entretanto, a evidência experimental da transmissão de protozoários do gênero *Leishmania* pela picada de uma fêmea só ocorreu por Shortt e colaboradores em 1931. Desde então, eles são considerados os únicos insetos comprovadamente capazes de transmitir a doença. Atualmente, é possível encontrar na literatura informações escassas sobre o possível papel de outros artrópodes na transmissão de leishmanioses, mas nada ainda é conclusivo.

Os flebotomíneos são distribuídos em dois gêneros de acordo com a sua morfologia e a sua distribuição geográfica: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). A maioria das espécies está presente nas regiões tropicais e subtropicais sendo poucas encontradas em regiões temperadas. Os insetos ocupam uma variedade de nichos ambientais, tais como silvestres, desérticos e florestais. O crescente desmatamento e o avanço da urbanização em áreas florestais os estimularam a se adaptarem aos ambientes peri-domésticos, introduzindo as leishmanioses nas cidades, modificando o perfil essencialmente rural da doença. Atualmente, elas nas suas formas cutâneas e visceral podem ser encontradas em cidades de médio e grande porte, inclusive

nas capitais estaduais como Belo Horizonte, São Luis, São Paulo e Rio de Janeiro (<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3632&bd=1&pg=1>).

5

O ciclo de vida dos Flebotomíneos - Os flebotomíneos são insetos holometábolos, isto é, o seu desenvolvimento ocorre a partir dos ovos que originam as larvas, pupas e adultos (Figura 2). Diferente dos mosquitos, a sua fêmea põe seus ovos no solo das florestas ou em ambientes modificados pela ação humana. Todavia, seus criadouros são de difícil localização na natureza. Os ovos são pequenos, quase microscópicos, e uma vez eclodidos, geram larvas, que são de difícil visualização a olho nu. As larvas alimentam-se da matéria orgânica presente no solo e passam por quatro estádios (fases), que no decorrer do desenvolvimento aumentam seu metabolismo e tamanho. Posteriormente, elas se transformam em pupas, que se fixam no substrato e não se alimentam. Começa então a fase da metamorfose que resultará no inseto adulto (detalhes em <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=354&sid=6>).

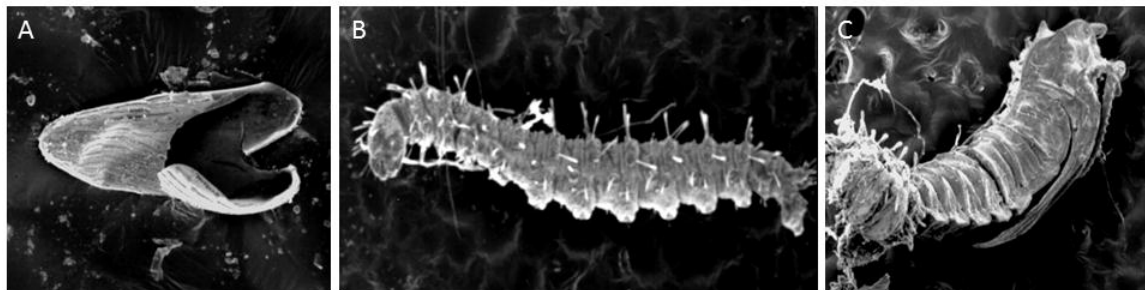


Figura 2. Ovo recém-eclodido (A), larva (B) e pupa (C) de *L. longipalpis* visualizados através da microscopia eletrônica de varredura. Fotos de Nágila Secundino, CPqRR-Fiocruz, MG.

Os flebotomíneos adultos apresentam uma cabeça pequena de forma alongada e voltada para baixo, um aparelho bucal do tipo sugador-picador, asas lanceoladas e corpo com coloração castanho-escura e totalmente revestido por inúmeras cerdas (Figura 3).

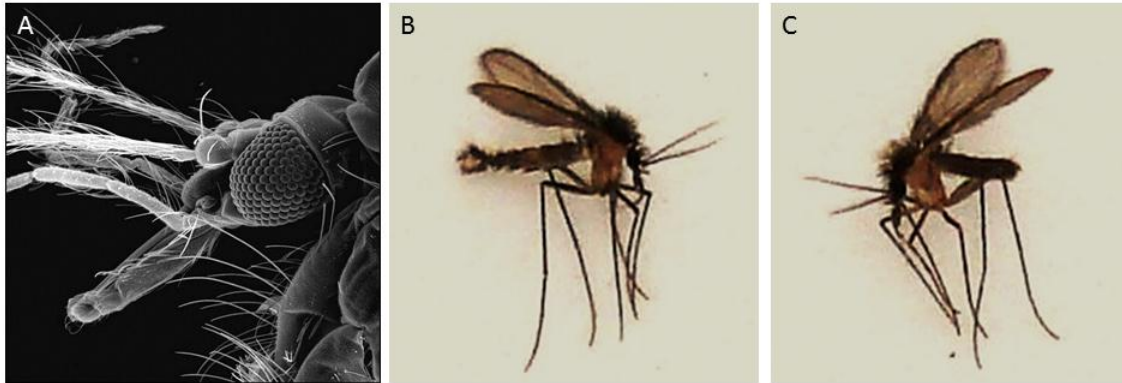


Figura 3: Cabeça de um *L. longipalpis* adulto visualizada através de microscopia eletrônica de varredura. (A) Macho (B) e fêmea (C) do inseto vetor. (Foto A de Nágila Secundino e fotos B e C de Vanessa Freitas, CPqRR, Fiocruz-MG).

Os flebotomíneos adultos estão adaptados a viver em abrigos úmidos e escuros, como os observados nas florestas tropicais e se alimentam de fontes naturais de açúcar (como por ex. seiva de plantas e secreções de afídeos). As fêmeas necessitam também de alimentação sanguínea para a ovogênese (Adler, 1964; Schlein & Warburg, 1986; Young & Lawyer, 1987; Killick-Kendrick, 1999), embora algumas poucas espécies produzam ovos no seu primeiro ciclo gonotrófico sem a necessidade de sangue (Johnson, 1961; Brazil & Oliveira, 1999). Eles saem à procura de alimentação sanguínea geralmente no período noturno e a escolha pelo hospedeiro vertebrado é um processo pouco compreendido. A escolha pode variar entre as distintas espécies tendo algumas preferências limitadas a poucos hospedeiros animais, enquanto outras demonstram um comportamento "oportunista" (Tesh e cols., 1971; Quinnell e cols., 1992; Missawa e cols., 2008). Provavelmente, os flebotomíneos "oportunistas" possuem maior capacidade vetorial para transmissão de patógenos, visto que estão expostos a uma variedade de hospedeiros potencialmente infectados (Sacks e cols., 2008).

O estabelecimento de colônias de flebotomíneos em laboratório é essencial para o estudo da sua biologia e sua interação com *Leishmania*. Várias técnicas para a criação desses insetos em laboratório têm sido descritas ao longo dos anos (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1991; Modi, 1997). Porém, poucas espécies são mantidas com sucesso e em número suficiente para fins experimentais. Existem poucos laboratórios dedicados a esta laboriosa tarefa necessária para os estudos de interação vetor-parasito. A colonização e a manutenção das espécies *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* em laboratório são consideradas as mais "fáceis" e esse é o motivo principal pelo qual a maioria dos trabalhos sobre interação vetor-*Leishmania* as utiliza. Um recente estudo de Volf e Volfova (2011) compara os principais parâmetros necessários para a padronização e manutenção de colônias de flebotomíneos.

O Ciclo de Vida do Parasito no Vetor

Nas Américas, algumas espécies de *Leishmania* são transmitidas por mais de um flebotomíneo vetor, como por exemplo, a *Leishmania brasiliensis*; contudo, a forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral americana é exclusivamente transmitida pelo *Lutzomyia longipalpis*. Na tabela abaixo se observa algumas combinações de flebotomíneos com as espécies de *Leishmania* que naturalmente eles transmitem. Como já dito no parágrafo anterior, é importante ressaltar que devido as dificuldades de colonização e manutenção de vetores em laboratórios, o *Lutzomyia longipalpis*, cepa Lapinha originário da Gruta da Lapinha em Minas Gerais, é considerado de “mais fácil manutenção” e vem sendo utilizado como modelo de interação em estudos com distintas espécies de *Leishmania* (Molyneux e cols. 1975; Killick-Kendrick e cols. 1977; Walters 1993; Titus e cols. 1999; Rogers e cols. 2002; Myskova e cols. 2007; El Sawaf e cols. 2008; Laurenti e cols. 2009a and 2009b). Este fato permitiu o melhor conhecimento do processo de interação e inclusive do papel da saliva do vetor no processo infeccioso (a ser discutido abaixo). Porém, é importante sempre considerar que são informações obtidas em laboratórios e que o inseto somente é “permissivo” às infecções experimentais, pois na natureza ele é um vetor exclusivo da *Leishmania infantum chagasi* (optamos a nomenclatura atual substituindo *L. chagasi* seguindo proposta de Lainson e Rangel, 2005).

Tabela 1: Combinações naturais de vetor-parasito.

Flebotomíneo	Parasito	Tipo de leishmaniose
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>L. infantum chagasi</i>	Visceral
<i>Lutzomyia withmani</i>	<i>L. braziliensis</i>	Cutânea
<i>Lutzomyia migonei</i>	<i>L. braziliensis</i>	Cutânea
<i>Lutzomyia intermedia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Cutânea
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	Cutânea
<i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>L. major</i>	Cutânea
<i>Phlebotomus argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	Visceral
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	<i>L. major</i>	Cutânea
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	<i>L. infantum</i>	Cutânea
<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	Cutânea

Obs.: O gênero *Lutzomyia* é exclusivo das Américas e o gênero *Phlebotomus* dos outros continentes.

A alimentação do vetor no hospedeiro infectado - O processo de interação vetor-parasito se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado. Elas realizam movimentos semelhantes a um tatear sobre a pele do hospedeiro, inspecionando previamente o tecido que será lesionado. Após a escolha do local adequado, a fêmea utiliza suas peças bucais, relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, formando um pequeno poço de sangue no qual ela pode se alimentar (telmatofagia ou “pool-feeding”) (Ribeiro, 1987). Durante o repasto, eventualmente a fêmea ingere o protozoário *Leishmania* juntamente com o sangue do hospedeiro infectado.

A infecção do flebotomíneo: Colonização, desenvolvimento e diferenciação do parasito no intestino do vetor - Parasitos do gênero *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida que envolve diversas formas de desenvolvimento (Killick-Kendrick, 1979; Sacks & Perkins, 1984), as quais são consideradas adaptações às mudanças nas condições ambientais sofridas pelo parasito dentro inseto vetor e no hospedeiro vertebrado para sobreviver em um ambiente com variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes e oxigênio (Santos e cols. 1998). Os parasitos diferenciam-se em formas altamente

especializadas que se distinguem quanto ao seu requerimento nutricional, taxa de crescimento e habilidade de se dividirem, regulação da expressão de moléculas de superfície e também em sua morfologia (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; McConville & Handman, 2007; Besteiro e cols., 2007). Existem diversas denominações para os morfotipos encontrados no vetor (Walters, 1993; Nieves & Pimenta, 2000, 2002; Rogers e cols., 2002; Gossage e cols., 2003; Bates & Rogers, 2004). A nomenclatura mais simples e aceita universalmente é a proposta por Lawyer e colaboradores (1990). Os parasitos do gênero *Leishmania* dentro do vetor, independente das espécies, apresentam as seguintes formas: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas (Figura 4).

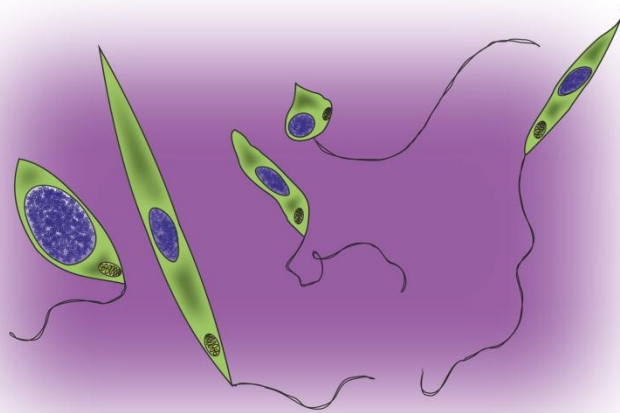


Figura 4: Os morfotipos de *Leishmania* encontrados dentro dos flebotomíneos vetores. Observa-se da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica. (Desenho esquemático baseado em esfregaços de promastigotas obtidos de vetores infectados e corados pelo Giemsa. Autor: Paulo Pimenta, CPqRR, Fiocruz-MG)

O ciclo de vida da *Leishmania* se inicia no vetor quando uma fêmea de flebotomíneo ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado. No período de 0 a 2 dias após a alimentação sanguínea infectante, a diferenciação dos parasitas em promastigotas seguido de uma intensa multiplicação ocorre dentro do bolo alimentar armazenado no intestino médio abdominal. O processo de transformação das amastigotas ingeridas em promastigotas inicia-se entre 6 e 12 horas após o repasto, enquanto o sangue é envolvido por uma matriz de proteínas, glicoproteínas e quitina denominada matriz peritrófica (Lawyer e cols., 1987, 1990; Secundino e cols., 2005). Uma

vez diferenciados em promastigotas e a digestão ser finalizada, os parasitos exibem uma distribuição preferencial dentro do trato digestivo do vetor, formando “micro-habitats”, o que levou Lainson e Shaw (1987) a classificarem as espécies do gênero *Leishmania* em três categorias: suprapilária, peripilária e hipopilária.

Uma grande maioria de espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos é de comportamento suprapilário. Seu desenvolvimento é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Parasitos com comportamento suprapilário pertencem ao subgênero *Leishmania*. Os parasitos com comportamento peripilário estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento (vide na figura 5 as regiões anatômicas de um flebotomíneo). Esses parasitos pertencem ao subgênero *Viannia*, cujos representantes são unicamente encontrados no Novo Mundo (Lainson e Shaw, 1987). As espécies de *Leishmania* com comportamento suprapilário e peripilário têm sido associadas às infecções em mamíferos. O desenvolvimento do tipo hipopilário é restrito ao intestino posterior e ocorre em espécies de *Leishmania* que infectam répteis. Esse grupo tem sido classificado tanto dentro do gênero *Leishmania* quanto como um gênero separado chamado *Sauroleishmania* (revisado em Momen & Cupollilo, 2000).

Uma grande maioria de espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos é de comportamento suprapilário. Portanto, vamos restringir este capítulo ao conhecimento relacionado ao ciclo de vida de parasitos com esse padrão de desenvolvimento em seus vetores naturais.

Primeiramente, é importante frisar que ainda não está definido como são originados e quais são os parâmetros determinantes do surgimento dos distintos morfotipos de promastigotas dentro do vetor. Tampouco são conhecidas as suas funções com exceção dos promastigotas metacíclicos, os quais são os únicos injetados na pele do hospedeiro vertebrado dando continuidade ao ciclo de vida da *Leishmania*.

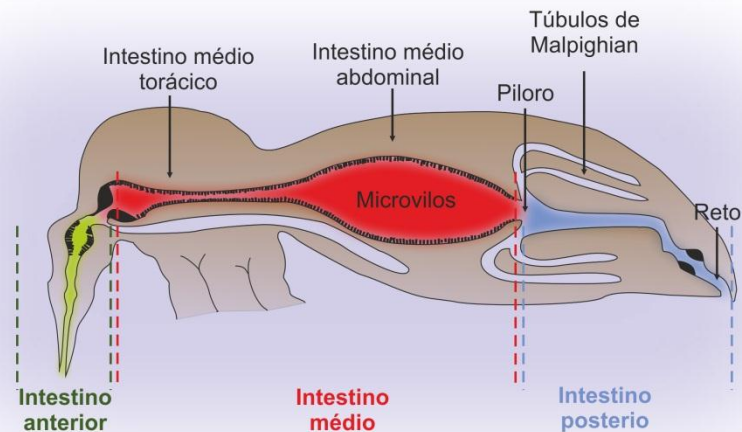


Figura 5: Desenho Esquemático do Intestino de um Flebotomíneo.
Adaptado de Schlein 1993 por Paulo Pimenta, CPqRR, Fiocruz-MG.

Após a ingestão do sangue infectado, rapidamente os amastigotas se posicionam no meio do bolo alimentar e se transformam em promastigotas procíclicas, os quais se multiplicam intensamente nas primeiras 48 horas. Período este, onde ocorre o processo digestivo e também a formação da matriz peritrófica, uma estrutura quitinosa ao redor do bolo alimentar. Após 2 a 5 dias, a matriz peritrófica se degenera e o bolo fecal começa a ser excretado passando pelo píloro e pelo íleo. Durante estes eventos, ocorre intensa multiplicação das formas procíclicas e o aparecimento das nectomonas, que preenchem o intestino abdominal anterior. Os parasitos ancoram-se via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal evitando a expulsão durante a liberação do bolo fecal. Em seguida, eles provavelmente os metacíclicos, se desprendem do epitélio, visto que eles não tem capacidade adesiva (Pimenta e cols. 1992), e migram para região anterior do intestino médio. Nesse período do desenvolvimento também são encontradas formas curtas e largas denominadas haptomonas e formas de pequeno corpo classificadas como paramastigotas. Na região anterior os parasitos secretam uma substância gelatinosa, o PSG (*promastigote secretory gel* cuja função será discutida a posteriori) que os mantém embebidos e imobilizados (Rogers e cols., 2002, 2004; Gossage e cols., 2003). Após 5 dias ou mais, dependendo da espécie de vetor, o intestino está livre do bolo fecal, o desenvolvimento dos ovos está completo e a oviposição é iniciada. Neste momento, uma massa de parasitos pode ser observada na válvula do estomodeu sendo que parte desses parasitos permanece embebida no PSG, formando um “plug” que se estende para o intestino torácico (Lawyer e cols., 1990; Sacks & Kamhawi, 2001; Rogers e cols., 2002, 2004). As formas

metacíclicas podem ser identificadas próximas à válvula do estomodeu. Elas possuem um corpo celular pequeno, flagelo longo e não se dividem. São parasitos altamente móveis e livres que podem migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probócide, possibilitando assim a sua transmissão via picada em hospedeiro vertebrado. Experimentos utilizando a alimentação forçada de flebotomíneos infectados demonstraram que as formas metacíclicas são as únicas promastigotas ejetadas pelos vetores na pele dos vertebrados (Saraiva e cols. 1995).

O significado do aparecimento e as funções dos morfotipos de *Leishmania* dentro do vetor não são ainda compreendidos, mas é considerado que estejam relacionados à origem dos metacíclicos. Os metacíclicos são células altamente diferenciadas contendo grânulos de secreção e uma superfície celular complexa e distinta das formas não infectivas (Pimenta e cols. 1991). Além disso, eles não possuem capacidade multiplicativa e nem de diferenciação em outras formas no vetor (observação pessoal).

Veja abaixo o ciclo de vida da *Leishmania* mostrando aspectos gerais da infecção do vetor após a ingestão do parasito (amastigota) vindo de um hospedeiro vertebrado infectado.

As Barreiras Naturais Encontradas pelo Parasito Dentro do Vetor

O parasito precisa vencer diversas barreiras para completar o seu desenvolvimento no vetor. A expressão de moléculas específicas do próprio parasito tem se mostrado um evento crucial para esse processo. A ação de enzimas digestivas produzidas pelo intestino do vetor pode matar os parasitos presentes no bolo sanguíneo; a matriz peritrófica constitui uma barreira física para a sua migração para a parte anterior do intestino e a excreção do bolo fecal pode resultar na perda da infecção.

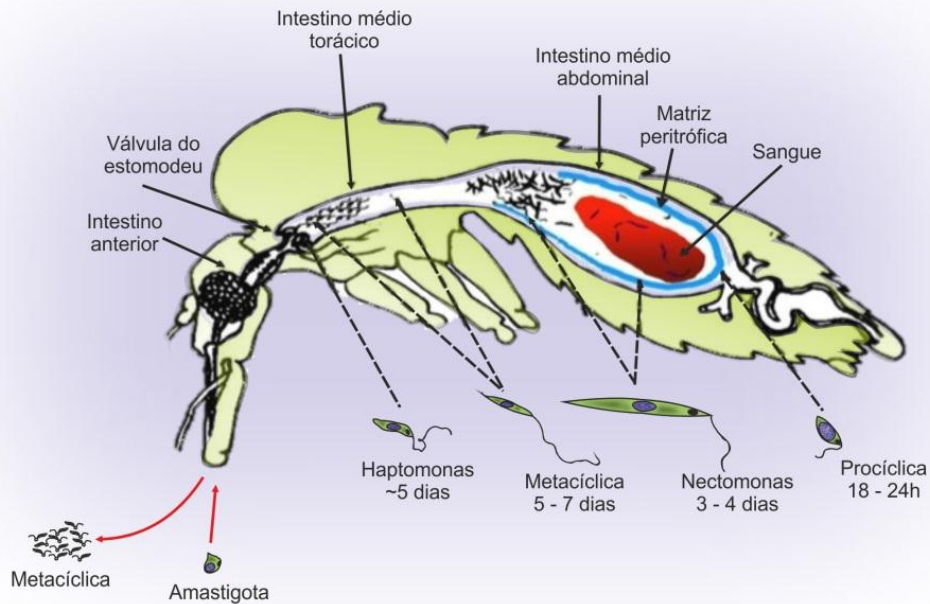


Figura 6: Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* sp. Modificado com permissão de David Sacks por Vanessa C. Freitas com adaptação final de “layout” por Nilson Porto para essa edição.

Sobrevivência dos parasitos dentro do bolo sanguíneo - Susceptibilidade dos parasitos às enzimas digestivas

A ingestão de sangue induz a síntese e secreção de enzimas digestivas no lúmen do intestino médio do inseto (tais como tripsina, quimiotripsina, aminopeptidases, carboxipeptidases e glicosídeos) e a síntese e formação da matriz peritrófica. A partir de 12 até 48 horas após a alimentação, estas enzimas digestivas são liberadas no espaço ectoperitrófico e passam através da matriz peritrófica para digerir o sangue. Adler (1938) foi o primeiro a investigar como a digestão do sangue nas fases iniciais da infecção de *P. papatasi*, vetor que somente transmite a *Leishmania major*, poderia explicar a resistência natural a outras espécies. Foi observado que a taxa de infecção aumentou nessas espécies que normalmente não infectam o vetor *P. papatasi* quando experimentalmente diminuiu-se a concentração do plasma no sangue infectado. Tal fato foi considerado devido aos componentes do soro que induzem a produção

de proteases no intestino do inseto sugerindo que os produtos da digestão eram os responsáveis pela destruição dos parasitos. Além disso, promastigotas em número reduzido, mortos ou danificados, têm sido observados nos intestinos de flebotomíneos infectados com espécies de *Leishmania* não compatíveis entre dois a três dias após o repasto (Lawyer e cols., 1990; Schlein & Jacobson, 1998). Pimenta e colaboradores (1997) observaram que o ambiente intestinal do *P. papatasi* também é naturalmente danoso para *L. major*, já que 50% dos parasitos ingeridos morreram dentro do vetor nas primeiras horas após o repasto sanguíneo. A idéia de Adler, de que as condições danosas para o parasito ocorrem devido às altas concentrações de enzimas proteolíticas, foi posteriormente validada por estudos que mostraram um aumento na sobrevivência de *Leishmania donovani*, espécie que naturalmente não se desenvolve em *P. papatasi*, em flebotomíneos alimentados com sangue sem soro (apenas eritrócitos, solução salina e amastigotas) (Schlein & Jacobson, 1998). O aumento da sobrevivência foi correlacionado com o retardo e a diminuição nos níveis de atividade das proteases. Outros tratamentos capazes de reduzir a atividade proteolítica no intestino do inseto, tais como a adição de inibidor de tripsina ao sangue, também promoveram a sobrevivência inicial de *L. donovani* em *P. papatasi* (Borovsky & Schlein, 1987). Em um experimento similar, Pimenta e colaboradores (1997) promoveram a sobrevivência inicial de *L. major* em *P. papatasi*. Esse estudo detalhou também pela primeira vez, o importante papel da matriz peritrófica na redução da taxa de difusão das enzimas digestivas para dentro do bolo sanguíneo e no conseqüente retardo da exposição do sangue contendo parasitos ao processo digestivo. A rápida difusão das enzimas digestivas em intestinos de flebotomíneos tratados com quitinase, que bloqueia a produção da matriz peritrófica, foi sugerida como responsável pela mortalidade inicial dos parasitos durante sua transição de amastigotas para promastigotas. Os autores mostraram que a perda da matriz peritrófica exacerbou as condições letais que normalmente existem durante o processo digestivo, já que a morte de parasitos nos períodos iniciais da digestão também foi observada nos flebotomíneos não tratados.

Os estudos descritos acima suportam a hipótese que durante o desenvolvimento da *Leishmania* no vetor a concentração e o tempo de exposição às enzimas proteolíticas presentes no intestino podem influenciar a competência vetorial dos flebotomíneos e que a modulação dessas enzimas pelo parasito (discutido abaixo) podem conferir uma vantagem seletiva para a sua sobrevivência.

Inibição da digestão em flebotomíneos infectados com Leishmania

Baseado nos resultados descritos acima propôs-se que algumas espécies de *Leishmania* desenvolveram estratégias para superar os efeitos danosos das enzimas digestivas, inibindo ou retardando o pico de atividade enzimática (revisado em Sacks & Kamhawi, 2001). Em *P. papatasi*, as enzimas proteolíticas produzidas pelo inseto foram inibidas ou retardadas em infecções com *L. major*, mas não com *L. donovani* (Schlein & Romano, 1986; Borovsky & Schlein, 1987).

Similarmente, Dillon e Lane (1993) relataram que a inclusão de amastigotas de *L. major* ao sangue do repasto retardava e diminuía o pico de atividade de proteases no intestino de *P. papatasi*. Entretanto, a sobrevivência de *L. major* em *P. papatasi* também tem sido observada na ausência de qualquer inibição ou retardo no pico de atividade de proteases durante a infecção (Pimenta e cols., 1997).

A idéia de que a sobrevivência dos parasitos depende, pelo menos em parte, da modulação da atividade proteolítica no intestino foi reforçada em experimentos *in vitro*. Parasitos da espécie *L. major* foram expostos por uma a duas horas à lisados de um único intestino de *P. papatasi* (Pimenta e cols., 1997). Formas amastigotas recém-retiradas de tecido infectado e formas promastigotas totalmente diferenciadas foram mais resistentes à morte do que os parasitos em estágio inicial de transição amastigota-promastigota (com 2 a 8 horas), os quais tiveram uma redução de mais de 95% no número de parasitos viáveis quando comparados ao controle. Esses resultados foram consistentes com aqueles de Dillon e Lane (1993), que indicaram que promastigotas totalmente diferenciadas se desenvolveram na presença de tripsina em cultura. Pode-se concluir que diferenças na sobrevivência dos parasitos dentro do intestino do flebotomíneo nos períodos iniciais de digestão, particularmente em infecções iniciadas com amastigotas, devem-se às diferenças na cinética dos estágios de transformação do parasito. O atraso de uma ou poucas horas no desenvolvimento do parasito pode expor formas transicionais vulneráveis às concentrações letais de enzimas proteolíticas.

Análises refinadas do transcriptoma de *P. papatasi* e *L. longipalpis* têm oferecido uma melhor caracterização das moléculas do intestino desses insetos e revelado, pela primeira vez, a habilidade de parasitos do gênero *Leishmania* em modular os transcritos do vetor. A comparação das bibliotecas de cDNA de fêmeas não alimentadas e alimentadas com sangue demonstrou que os transcritos que codificam proteases, incluindo algumas tripsinas, quimiotripsinas e carboxipeptidases, são regulados pelo repasto sanguíneo (Ramalho-Ortigão e cols., 2007; Telleria e cols., 2007; Jochim e cols., 2008; Pitaluga e cols., 2009). Comparações adicionais das bibliotecas de cDNA de fêmeas alimentadas com sangue na ausência ou presença de *Leishmania* identificaram proteases do intestino que são especificamente reguladas na presença dos parasitos (Ramalho-Ortigão e cols., 2007; Jochim e cols., 2008).

Moléculas do parasito que controlam a sobrevivência inicial

Diante do que foi exposto, fica claro que o processo digestivo do flebotomíneo representa um conjunto de fenômenos adversos ao desenvolvimento da *Leishmania*. A expressão de moléculas estágio e espécie-específica estão envolvidas na sobrevivência e no crescimento do parasito durante essa fase crítica (Pimenta e cols., 1992; Descoteaux & Turco 1999). Inicialmente, a identificação de moléculas que poderiam ter um papel importante na sua defesa contra danos causados pela ação de enzimas digestivas foi

focada na família dos glicoconjugados. Essas moléculas estão presentes na superfície do parasito e incluem os lipofosfoglicanos (LPG), os glicoinositolfosfolípides (GIPLs), proteofosfoglicanos (PPG) e as proteínas ancoradas a GPI (GP63) ou podem ser secretadas como fosfoglicanos (PG), proteofosfoglicanos (sPPG) e fosfatases ácidas (sAP) (Turco & Descoteaux, 1992; McConville & Ferguson, 1993; Ilg e cols., 1999; Ilg, 2000).

O LPG é o glicoconjugado majoritário na superfície das formas promastigotas de *Leishmania*, está localizado em todo o parasito, inclusive no flagelo, e é organizado como um glicocálix filamentososo (Pimenta e cols., 1989). Cada promastigota expressa cerca de $1-5 \times 10^6$ moléculas de LPG (Orlandi & Turco, 1987). Bioquimicamente o LPG é composto por quatro domínios: 1) uma âncora de 1-*O*-alquil-2-*liso*-fosfatidilinositol seguida por 2) uma parte central (“core”) formada por um heptassacarídeo Gal(α 1,6)Gal(α 1,3)Gal(β 1,3)[Glc(α 1)-PO₄]Man(α 1,3)Man(α 1,4)-GlcN(α 1), 3) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ e 4) um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo “cap” (Descoteaux & Turco, 1999) (Figura 7).

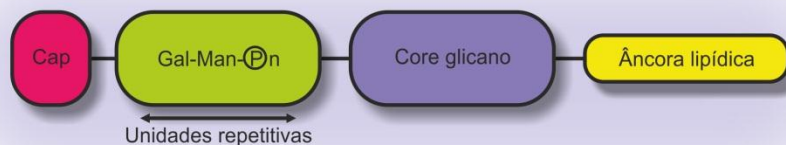


Figura 7: Representação Esquemática da Estrutura do Lipofosfoglicano (LPG) de Promastigotas de *Leishmania* spp. Gal=galactose; Man=manose; P=fosfato (modificado de Descoteaux & Turco, 1999).

Transgênicos de *Leishmania* têm sido utilizados para a investigação da função de genes do parasito, incluindo sequências envolvidas na interação com o hospedeiro vertebrado e o vetor e na própria virulência (revisado por Beattie e cols., 2008). A evidência mais conclusiva de que moléculas contendo fosfoglicanos promovam a sobrevivência inicial dos parasitos no intestino do vetor veio de estudos empregando mutantes especificamente deficientes na biossíntese de fosfoglicanos (como por exemplo, LPG, GIPLs, PPG).

Experimentos utilizando parasitos mutantes deficientes na produção de todas as moléculas que contêm fosfoglicanos têm o seu desenvolvimento e crescimento severamente reduzido nas fases iniciais da infecção no vetor antes

da liberação do bolo fecal (Sacks e cols., 2000; Boulanger e cols., 2004; Svárovská e cols., 2010; Secundino e cols., 2010). Interessantemente, parasitos mutantes deficientes somente na biossíntese de LPG, sobrevivem relativamente bem no intestino contendo sangue, no período que antecede a liberação do bolo fecal (Butcher e cols.1996; Sacks e cols., 2000; Boulanger e cols., 2004; Svárovská e cols., 2010; Secundino e cols., 2010). Esses resultados indicaram que o LPG não é essencial para a sobrevivência inicial dos parasitos e que outras moléculas contendo fosfoglicanos devem estar envolvidas na sua proteção contra as enzimas digestivas do inseto.

Persistência dos parasitos no flebotomíneo após a defecação - Escape dos parasitos da matriz peritrófica .

Os parasitos recém-ingeridos com o sangue multiplicam-se no bolo sanguíneo confinados pela matriz peritrófica. Como citado anteriormente, a matriz peritrófica é uma barreira quitinosa e semipermeável que permite a difusão de enzimas hidrolíticas do flebotomíneo para dentro do bolo alimentar e de nutrientes provenientes da digestão para fora dele, mas impede a saída dos parasitos. Pimenta e colaboradores (1997) demonstraram que a matriz peritrófica intacta beneficia a sobrevivência dos parasitos durante a fase inicial de seu desenvolvimento dentro do bolo sanguíneo. Observou-se uma queda no número de parasitos *L. major* viáveis em flebotomíneos *P. papatasi* tratados com quitinase que impediu a sua formação; indicando que este fato, exacerbava as condições letais existentes durante o processo digestivo no intestino do vetor. A sobrevivência dos parasitos foi aumentada quando inibidor de tripsina foi adicionado ao sangue, indicando que eles os parasitos foram mortos pela ação das enzimas digestiva. Por outro lado, a matriz peritrófica age também como uma barreira à colonização do intestino anterior do inseto, que deve acontecer antes da eliminação do bolo fecal. Alguns autores hipotetizam que a perda de infecções por *Leishmania* em vetores não naturais deve-se, pelo menos em parte, à incapacidade dos parasitos escaparem da matriz peritrófica antes da defecação (Feng e cols., 1951; Walters e cols., 1992). A participação de quitinases derivadas do flebotomíneo e/ou do parasito para degradação dessa matriz peritrófica, e conseqüente escape dos parasitos, foi claramente demonstrada em experimentos envolvendo o uso de alosamidina, um inibidor específico de quitinase. Pimenta e colaboradores (1997) adicionaram essa substância ao sangue dado a *P. papatasi*, o que resultou no espessamento da matriz peritrófica, que se sustentou intacta por mais tempo. Nos vetores *P. papatasi* alimentados com sangue infectado com *L. major* e alosamidina, os parasitos foram incapazes de escapar da matriz peritrófica e estabelecerem a infecção no intestino, e somente quando o resto alimentar finalmente foi excretado, os parasitos foram perdidos junto com ele.

Apesar da aparente importância da atividade das quitinases de *Leishmania* para o estabelecimento da infecção do parasito no vetor, ainda não existem muitas informações sobre esse assunto. Schlein e colaboradores (1991) observaram que, *in vitro*, promastigotas de *L. major* foram capazes de produzir

quitinases e sugeriram que essas enzimas poderiam causar a desintegração da porção anterior da matriz peritrófica de *P. papatasi*, permitindo dessa forma o escape do parasito. Anos depois, Shakarian e Dwyer (1998, 2000) identificaram em *L. donovani* um gene para quitinase com alta homologia para quitinases conhecidas e, posteriormente, Joshi e colaboradores (2005) identificaram também um gene para quitinase em *Leishmania mexicana* e um sistema de expressão episomal foi desenvolvido para super expressão desse gene nesses parasitos. A super expressão de quitinase foi demonstrada em promastigotas e amastigotas e resultou em aumento da lesão em camundongos (Joshi e cols., 2005). Em *L. longipalpis* isso facilitou o escape do parasito da matriz peritrófica e contribuiu para destruição da válvula do estomodeu (Rogers e cols., 2008), como previamente sugerido por outros autores (Schlein e cols., 1992; Volf e cols., 2004). Entretanto, recentemente, Sádlová e Volf (2009) não encontraram diferenças no tempo de desintegração da matriz peritrófica em outro modelo, fêmeas de *Phlebotomus duboscqi* infectadas ou não por *L. major*, as quais, em contraste com as prévias descrições (Schlein e cols., 1991), não causaram a desintegração da MP na porção anterior (Sádlová & Volf, 2009), mas migraram através de uma abertura posterior existente na matriz peritrófica até mesmo de fêmeas não infectadas (Walters e cols., 1993, 1995; Warburg 2008; Sádlová & Volf, 2009).

Contudo, em muitas combinações vetor-parasito o seu escape coincide com a quebra da matriz peritrófica pelas quitinases derivadas do flebotomíneo (Ramalho-Ortigão & Traub-Cseko, 2003; Ramalho-Ortigão e cols., 2005). Um sistema quitinolítico induzido pela presença de sangue foi caracterizado no intestino de *P. papatasi* e *L. longipalpis* (Ramalho-Ortigão e cols., 2005), os quais demonstraram significantes níveis de atividades enzimáticas pós-alimentação sanguínea, com pico máximo em 48 horas. A análise das sequências específicas dessas quitinases também revelou que elas são ativadas pela digestão proteolítica. A identidade das quitinases dos flebotomíneos *P. papatasi* e *L. longipalpis* foi validada pela análise do transcriptoma (Ramalho-Ortigão e cols., 2007; Jochim e cols., 2008). Comparações das bibliotecas de cDNA de fêmeas alimentadas com sangue na ausência ou na presença de *Leishmania* também identificaram que a peritrofina, uma proteína que compõe a matriz peritrófica, é regulada pela presença de parasitos (Ramalho-Ortigão e cols., 2007; Jochim e cols., 2008). Entretanto, não se sabe ainda se a regulação da expressão de peritrofinas pode interferir no seu desenvolvimento no intestino do vetor.

Inibição do peristaltismo em insetos infectados

Um interessante tipo de modulação da infecção observou-se foi observado em flebotomíneos infectados por *Leishmania* (Vaidyanathan, 2004, 2005). Um peptídeo mioinibitório capaz de inibir as contrações do intestino médio de *P. papatasi* encontrou-se em lisados celulares de promastigotas de *L. major*. Existe a hipótese ainda não comprovada de que a inibição do peristaltismo no inseto retardaria a excreção dos parasitos, aumentando assim a possibilidade de estabelecimento da infecção do parasito no vetor.

Ligação do parasito ao epitélio intestinal do inseto - o papel do LPG

Após o rompimento da matriz peritrófica, mesmo aquelas promastigotas que escaparam do confinamento correm o risco de serem liberadas do intestino juntamente com os restos do sangue digerido. Nesse estágio, as promastigotas de espécies com desenvolvimento do tipo suprapilárico se ligam ao epitélio do intestino médio. (Obs.: Não existem estudos com as espécies do tipo hipopilárico). O ancoramento dos parasitos permite a sua permanência no intestino frente aos movimentos peristálticos da digestão sofridos pelo vetor. Essa ligação das promastigotas ao epitélio intestinal foi observada pela primeira vez sob microscopia de luz por Adler e Teodor em 1927, e subseqüentemente, imagens ultra-estruturais revelaram a íntima associação do flagelo do parasito com as microvilosidades do intestino do flebotomíneo (Killick-Kendrick, 1974a, b; Molyneux e cols., 1975; Lawyer e cols., 1987, 1990; Warburg e cols., 1986; Walters e cols., 1987, 1989a; Saraiva e cols., 1995; El Sawaf e cols., 2008; Warburg, 2008) (Figura 8).

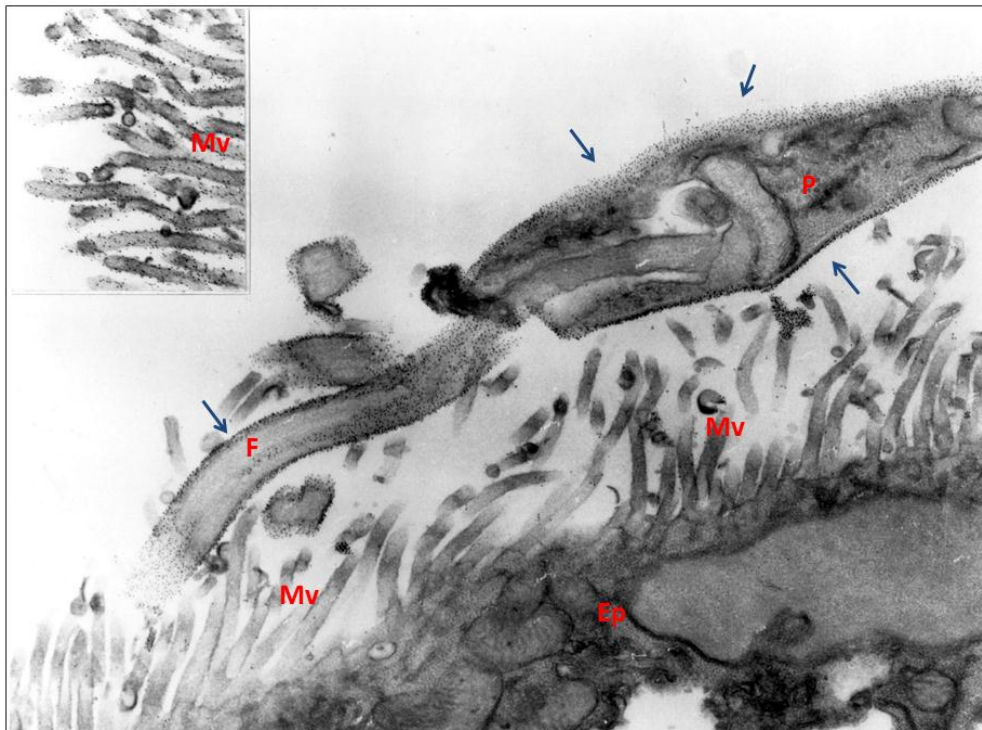


Figura 8: Micrografia do intestino de uma fêmea de *P. papatasi* infectada com *L. major* mostrando a ligação do parasito (P) ao epitélio intestinal (Ep) através do seu flagelo (F) aderido às microvilosidades (Mv). As setas estão mostrando a marcação da molécula LPG presente em toda a superfície do parasito. O inseto mostra os receptores para o LPG purificado de *L. major* ligado às microvilosidades (Mv no inseto). (foto de Paulo Pimenta CPqRR, Fiocruz-MG e publicada em Saraiva e cols. 1995).

O estudo pioneiro identificando o LPG como molécula responsável pela adesão foi desenvolvido por Pimenta e colaboradores em 1992. Nele foi introduzida uma nova técnica, a interação *in vitro* do intestino de flebotomíneos com parasitos, a qual passou a ser empregada por vários autores. Este trabalho demonstrou pela primeira vez o papel de uma molécula de um parasito no processo de interação vetor-parasito, *i. e.*, parasitos *L. major* dependem da molécula de LPG para permanecerem aderidos ao epitélio intestinal.

Posteriormente, diversos outros estudos investigaram e confirmaram o papel do LPG em mediar a adesão dos parasitos ao intestino médio do flebotomíneo sedimentando a importância desta molécula durante o processo de desenvolvimento da *Leishmania*. Estudos utilizando a técnica de *interação in vitro* (Pimenta e cols. 1992) demonstraram que em várias espécies de *Leishmania* a adesão dos parasitos ao epitélio intestinal foi completamente inibida pelo LPG purificado de formas procíclicas (Pimenta e cols., 1992; Sacks e cols., 1995; Soares e cols., 2002). A molécula do LPG purificada do parasito também foi capaz de se ligar diretamente aos intestinos dissecados (Pimenta e cols., 1992, 1994; Kamhawi e cols., 2000b; Soares e cols., 2010). A seguir, outras evidências importantes do papel do LPG na adesão foram obtidas com parasitos mutantes. Mutantes de *L. major* deficientes na síntese de LPG não se desenvolveram no vetor após a excreção do bolo fecal (Butcher e cols., 1996). Dessa forma, as evidências encontradas *in vitro* por Pimenta e colaboradores (1992) sobre o papel do LPG foram confirmadas *in vivo*. Entretanto, como esses mutantes foram obtidos por forte mutagênese e cultivados *in vitro*, seu fenótipo para deficiência em LPG não foi estabelecido definitivamente (Sacks e cols., 2000). Com o advento de métodos genéticos funcionais para identificação de genes responsáveis pela biossíntese do LPG, foi então possível gerar através de genes alvos, mutantes de LPG “limpos”. Experimentos utilizando *L. donovani* e *L. major* mutantes em LPG apresentaram apenas uma leve redução na sua sobrevivência e crescimento nos períodos iniciais da infecção, quando os intestinos dos seus respectivos vetores, *P. papatasi* e *P. argentipes*, ainda continham sangue. Entretanto, a habilidade em persistir no intestino foi completamente perdida após a excreção do bolo fecal e essa perda foi correlacionada à inabilidade dos parasitos de se ligarem ao epitélio intestinal antes da liberação do bolo fecal (Sacks e cols., 2000). Além disso, em ambos mutantes a adesão e a persistência dos parasitos no vetor após a defecação foram recuperadas quando a expressão do LPG foi restaurada pela reintrodução do gene LPG no parasito.

Ligação do parasito ao epitélio intestinal do inseto - espécie-específica

Análises estruturais do LPG de diferentes espécies de *Leishmania* revelaram a completa conservação da âncora lipídica, do core e da estrutura básica Gal β 1,4Man α 1-PO $_4$ da região de unidades repetitivas (Turco e cols., 1989; Ilg e cols., 1992). O polimorfismo na molécula de LPGs se deve a variação na sua composição e frequência dos açúcares das cadeias laterais ligadas à região conservada de unidades repetitivas e “cap” (Turco & Descoteaux, 1992;

Sacks e cols., 1994). Por exemplo, o LPG de *L. donovani* proveniente do Sudão não possui cadeias laterais, enquanto aquele proveniente da Índia possui um ou dois resíduos de β -glicosés (Sacks e cols. 1995; Mahoney e cols., 1999). Em *L. major*, o LPG contém β -galactosés (McConville e cols., 1990) e em *L. mexicana* e *L. infantum chagasi* (PP75) contém β -glicosés (Ilg e cols., 1992; Soares e cols., 2002).

O conceito de que a adesão ao intestino é espécie-específica e dependente do polimorfismo da molécula LPG partiu de experimentos iniciais de Pimenta e colaboradores (1994). Esse interessante polimorfismo inter e intra-específicos do LPG está relacionado à sua função como ligante do parasito aos receptores do intestino do vetor e em muitos casos, explica a competência vetorial espécie-específica. Um exemplo interessante é o flebotomíneo *P. papatasi* capaz de transmitir somente *L. major*. Essa habilidade pode ser atribuída aos múltiplos resíduos de β -galactosés terminais do LPG de *L. major* (McConville e cols., 1990), responsáveis pela adesão do parasito no intestino médio do vetor (Pimenta e cols. 1992). Após este conhecimento, Pimenta e colaboradores (1994) utilizaram outras cinco espécies de *Leishmania* que não contêm esses mesmos resíduos para infectar *P. papatasi* e demonstraram que os parasitos falharam em aderirem-se ao intestino do flebotomíneo, pois não persistiram no intestino do vetor após a defecação. Conclusivamente, foi mostrado que dentre os LPGs purificados dessas cinco espécies, somente aquele de *L. major* se ligou ao intestino de *P. papatasi*, que é vetor exclusivo deste parasito.

O papel das cadeias laterais do LPG foi confirmado pelo uso de mutantes de *L. major* deficientes na biossíntese dessas cadeias laterais. Um mutante de *L. major*, denominado Spock, foi gerado por seleção negativa com anticorpos específicos para β -galactose e foi especificamente deficiente para galactosil transferase requerida para a adição de β -galactose nas cadeias laterais. A perda desses resíduos impediu a adesão e persistência dos mutantes no intestino de *P. papatasi* (Butcher e cols., 1996). O comportamento do mutante Spock em *P. papatasi* foi similar ao de *L. donovani* do Sudão que não possui cadeias laterais (Pimenta e cols., 1994).

A seguir outros estudos, como o de Kamhawi e colaboradores (2000b) reforçaram o conceito de que a adesão ao intestino é espécie-específica. Intestinos de *Phlebotomus sergenti* ligaram o LPG purificado de *L. tropica*, espécie encontrada infectando esse inseto na natureza, mas não os LPGs purificados das espécies *L. major* e *L. donovani*. Embora as unidades repetitivas de *L. major* e *L. tropica* sejam substituídas, os açúcares das cadeias laterais são diferentes. *L. tropica* possui uma abundância de açúcares com terminações em arabinose e glicose, distintos das terminações em β -galactose características de *L. major*.

O fato de que significativas diferenças na adesão mediada por LPG terem sido observadas quando diferentes espécies de vetores foram comparadas, sustenta a idéia de que as moléculas de ligação para os parasitos no intestino

variem entre as diferentes espécies de flebotomíneos e que, por isso, tenham proporcionado pressão evolutiva para o polimorfismo estrutural do LPG (Sacks & Kamhawi, 2001). Dessa forma, a descoberta e a natureza dos possíveis receptores de LPG no intestino dos flebotomíneos tem sido foco de estudos. Já no primeiro estudo sobre a função do LPG na interação vetor-parasito, em 1992, Pimenta e colaboradores postularam que “moléculas tipo lectinas” poderiam servir como sítios de ligação para os parasitos devido à abundância de açúcares na molécula do LPG. Posteriormente, algumas publicações relataram a existência de lectinas em intestinos lisados de flebotomíneos capazes de aglutinar parasitos de *Leishmania* (Svobodova e cols., 1996; Volf e cols., 1998, 2002). Contudo, não ocorreu a demonstração do envolvimento das moléculas de LPG neste processo de aglutinação. Somente em 2004, a natureza de receptor para o LPG foi pela primeira vez elegantemente demonstrada, detectada e caracterizada num inseto vetor pelo grupo de Sacks no NIH. Esse receptor foi denominado PpGalec determinante para a ligação da *L. major* como havia sido postulado por Pimenta e colaboradores em 1992. Trata-se de uma galectina expressa pelo epitélio intestinal de *P. papatasi* e *P. duboscqi* que é utilizada como receptor específico para as unidades repetitivas de galactose presente no LPG de procíclicos de *L. major* (Kamhawi e cols., 2004).

Como já foi dito, *P. papatasi* e *P. sergenti*, que são respectivamente vetores naturais de *L. major* e *L. tropica*, expressam LPGs altamente substituídos e demonstram especificidade para seus respectivos parasitos. Já os vetores naturais de *L. donovani* e *L. infantum chagasi*, que expressam LPGs com poucas ou sem adições de cadeias laterais, parecem suportar, em laboratório, o desenvolvimento de diversas espécies de *Leishmania* (revisado em Sacks e cols., 2008). Dessa forma, sugeriu-se que esses vetores experimentalmente “permissivos” possam expressar receptores que reconheçam estruturas conservadas nos seus LPGs, mas ausentes ou inacessíveis em *P. papatasi* e *P. sergenti*,

Migração dos parasitos para a região anterior do intestino do flebotomíneo - *Ligação do parasito ao epitélio intestinal do inseto dependente do estágio específico da Leishmania*

Após a passagem do bolo fecal, o estabelecimento da infecção presumivelmente envolve a liberação de um grande número de parasitos do intestino médio que precisam se aderir ao epitélio intestinal do inseto para não serem excretados. Além disso, o estágio final de desenvolvimento deles no vetor depende da diferenciação sua diferenciação em formas metacíclicas, únicas formas capazes de infectar os hospedeiros vertebrados.

Ao contrário das outras formas de desenvolvimento, formas metacíclicas não têm sido encontradas aderidas, mas sim livres no lúmen para migrar para a região anterior. Durante a metaciclogênese, modificações estruturais que ocorrem no LPG das formas infectivas são responsáveis pelo despreendimento do parasito do epitélio intestinal do vetor (Pimenta e cols. 1992). Essas

modificações são características para cada espécie de *Leishmania*. Duas formas principais de LPG têm sido observadas: o LPG das formas não infectivas e o das infectivas (metacíclicas). Em *L. major*, por exemplo, durante a metaciclogênese a molécula LPG aumenta seu tamanho em duas a três vezes devido a um aumento na expressão de unidades repetitivas. Além disso, ocorre uma diminuição nas cadeias laterais terminadas em resíduos de galactose e correspondente substituição por arabinose, o que provavelmente controla a adesão e liberação dos parasitos do epitélio (Sacks e cols., 1990; McConville e cols., 1992). Já em *L. donovani* do Sudão, que não expressa cadeias laterais, a molécula LPG dobra de tamanho e a região do "cap" é modificada (Sacks e cols., 1995). Para *L. donovani* da Índia e *L. infantum chagasi*, que têm cadeias laterais de glicose, a metaciclogênese é associada à alongação da molécula e diminuição das cadeias laterais de glicose (Mahoney e cols., 1999; Soares e cols., 2002). Interessantemente, a análise do LPG de *L. braziliensis*, espécie com desenvolvimento do tipo periplárico, revelou um tipo diferente de regulação de carboidratos nas cadeias laterais. O LPG das formas não infectivas não possui cadeias laterais enquanto que no LPG das formas metacíclicas durante a diferenciação ocorre a adição de uma ou duas glicoses (Soares e cols., 2005).

Em todos os casos, o aumento no tamanho da molécula de LPG e as modificações nas cadeias laterais de açúcares culminam com o desprendimento das formas promastigotas do epitélio intestinal e a migração para a região anterior do tubo digestivo. É importante destacar que a alongação do LPG nas formas metacíclicas também resulta em um espessamento do glicocálix (Pimenta e cols., 1989) que parece proteger o parasito da ação do sistema complemento quando injetados no hospedeiro vertebrado (Sacks, 1989; Sacks e cols., 1995).

A expressão de LPG não é regulada somente entre as diferentes formas de promastigotas durante a metaciclogênese, mas também durante a transição da forma promastigota para amastigota. O número de cópias de LPG expressas por amastigotas intracelulares é substancialmente menor do que o número de cópias expressas em promastigotas (Moody & Handman, 1993; Turco, 2003). O LPG de formas amastigotas de *L. major* é bioquímica e antígenicamente distinto do LPG de promastigotas (Moody & Handman, 1993) e até o momento, não se conhece a sua função.

Estudos da interação vetor-*Leishmania* são importantes para o entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento e transmissão do parasito. Os dados da literatura referem-se principalmente às espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Em relação às espécies do Novo Mundo existem poucos trabalhos (Lainson & Shaw, 1988; Walters e cols., 1989a,b; Nieves e Pimenta 2000; 2002; Rogers e cols., 2002; Gossage e cols., 2003; Rogers & Bates, 2007; Miranda e cols., 2008), principalmente se levarmos em consideração a importância epidemiológica da doença nos países dessa região. Devido à grande importância da espécie *L. longipalpis* na transmissão da LV nas Américas, ainda são necessários mais detalhes sobre o desenvolvimento *in vivo* de *L. infantum chagasi* nesse vetor. Embora já tenha sido demonstrado que o

LPG purificado de *L. infantum chagasi* se liga *in vitro* ao intestino de *L. longipalpis* (Soares e cols., 2002), o papel dessa molécula no estabelecimento do parasito nesse vetor ainda não foi elucidado.

Mecanismos de Transmissão pela Picada

Até recentemente, o conhecimento acerca do processo inicial de infecção e do estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado era exclusivamente baseado na inoculação intradérmica ou subcutânea de parasitos em camundongos utilizando inóculos com quantidades variáveis de parasitas (10^2 a 10^7 parasitos) (Belkaid e cols., 1998 e 2000). O número de parasitos utilizados foi estabelecido aleatoriamente, pois não se tinha conhecimento do número de parasitos inoculados pelo inseto vetor na pele de um hospedeiro. Porém, estudos desenvolvidos nos últimos anos sugeriram que a quantidade de *L. mexicana* regurgitados por fêmeas de *L. longipalpis*, um modelo não natural de “infecção laboratorial”, pode variar de 10 a 10.000. Além disso, este número foi quantificado considerando os parasitos derivados pelo regurgitamento do vetor no meio de cultura em um aparato de membrana e não diretamente da picada do vetor (Rogers e cols., 2004). Somente em 2008, é que foi classicamente demonstrado que uma fêmea de *P. papatasi* infectada com *L. major* pode inocular através de uma picada de 100 a 100.000 parasitos na orelha de camundongos. Interessante foi a constatação da distribuição da dose de parasitos que apresentou perfil binomial: cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram 600 ou menos promastigotas, enquanto os demais liberaram mais de 1000 parasitos. Altas doses de infecção foram associadas a insetos com intestinos intensamente infectados e com mais de 30.000 parasitos (Kimblin e cols., 2008). Recentemente, o mesmo tipo de estudo foi desenvolvido pela primeira vez para vetores do Novo Mundo, *L. longipalpis* infectado com *L. infantum chagasi*, que quantificou a dose de parasitos injetados em orelhas de hamster e camundongos variando de 50 a 10.000 (Secundino e cols., 2012). Esses valores diferem daqueles encontrados por Kimblin e colaboradores (2008), mas demonstra que em transmissões naturais, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* injeta um número baixo de *L. infantum chagasi* na pele do hospedeiro vertebrado. Estudos com outros pares de vetor-parasito são necessários para verificar se esta característica é uma propriedade dos vetores do Novo Mundo.

Conceitos fundamentais do processo inicial da infecção do hospedeiro vertebrado pela *Leishmania* têm sido alterados graças aos experimentos de transmissão do parasita pela via natural, a picada. Fêmeas de flebotomíneos infectadas inoculam na pele do hospedeiro as formas infectantes de *Leishmania*, as promastigotas metacíclicas. Estas são fagocitadas pelos macrófagos, que são recrutados para o sítio da picada (van Zandbergen e cols., 2004). Recentemente, imagens do processo natural de transmissão dos parasitos via picada revelaram um papel importante para os neutrófilos, os quais são

rapidamente atraídos para o sítio de inoculação, provendo a sobrevivência dos parasitos dentro do hospedeiro vertebrado nos períodos iniciais da infecção (Peters e cols., 2008). Após a internalização dos parasitos pelos macrófagos, eles se transformam em formas amastigotas e iniciam o ciclo no hospedeiro vertebrado.

O papel das substâncias secretadas pelo vetor e pelo parasito no estabelecimento da infecção no vertebrado - A importância da saliva do vetor.

A saliva dos flebotomíneos tem um importante papel na transmissão de *Leishmania*. Ela é um rico conjunto de substâncias com atividades farmacológicas, tais como vasodilatadoras, anti-agregadoras de plaquetas, anti-hemostáticas, imunossupressoras, exacerbadoras da infecção e indutoras de infecciosidade de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado (revisado em Kamhawi, 2000 e Soares & Turco, 2003). A co-injeção de parasitos com homogenados de glândula salivar de *L. longipalpis* ou *P. papatasi* em camundongos produzem um aumento substancial no tamanho da lesão de diversas espécies de *Leishmania*, (Titus & Ribeiro, 1988; Theodos e cols., 1991; Belkaid e cols., 1998; Donnelly e cols., 1998; revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; Norsworthy e cols., 2004), quando comparados aos animais controles injetados somente com parasitos. Entretanto, informações sobre as moléculas responsáveis por esta exacerbação de infecção são pouco conhecidas. A apirase e o maxadilán são as moléculas mais estudadas. Apirase é uma enzima com atividade anti-agregação plaquetária encontrada em ambos os gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Ribeiro e cols., 1986, 1989). Ao contrário da apirase, o maxadilán foi unicamente encontrado em *L. longipalpis*. A habilidade de o maxadilán exacerbar a infecção por *Leishmania* foi demonstrada em modelos *in vivo*. No modelo murino, as injeções de maxadilán juntamente com parasitos da espécie *L. major* produziram lesões 2-3 vezes maiores que o controle e continham um número de parasitos 400 vezes maior (Titus & Mbow, 1999). Além disso, Morris e colaboradores (2001) demonstraram que o maxadilán é capaz de exacerbar a infecção na mesma proporção que a saliva total. De fato, o maxadilán tem diversos efeitos sobre a ativação de macrófagos, o que poderia explicar a sua habilidade em exacerbar a infecção e prolongar a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Rogers & Titus, 2003).

As espécies do complexo *L. longipalpis* diferem na quantidade de maxadilán da saliva (Warburg e cols., 1994). O *L. longipalpis* da Costa Rica que produz pouco maxadilán transmite uma infecção por *L. infantum chagasi* que tem uma aumentada e incomum proliferação de lesões cutânea. Inversamente, o *L. longipalpis* do Brasil, que produz mais maxadilán, transmite a mesma *L. infantum chagasi* com uma visceralização da infecção (Warburg e cols., 1994). Contudo, Ressalta-se que outras substâncias salivares são importantes. Por exemplo, o maxadilán nunca foi encontrado em espécies do gênero

Phlebotomus, incluindo *P. papatasi*, que também possui uma saliva que apresenta o efeito de exacerbação da infecção por *L. major* (Kamhawi e cols., 2000a). Nessa espécie, a atividade exacerbatória da saliva tem sido atribuída a adenosina e a seu precursor 5' AMP (Ribeiro e cols., 1999).

Outro assunto muito interessante é que diversos trabalhos têm demonstrado que a imunidade provocada pela saliva de flebotomíneos permite ao hospedeiro desenvolver proteção contra a infecção por *Leishmania*. Em modelo animal, camundongos imunizados com homogenado de glândula salivar de *P. papatasi* ou pré-expostos a picadas de flebotomíneos não infectados foram protegidos contra infecção por *L. major* derivada de inoculação via agulha (Belkaid e cols., 1998) ou pela picada do flebotomíneo (Kamhawi e cols., 2000a). Trabalhos mais recentes demonstram que diferentes proteínas salivares conferem proteção contra leishmaniose cutânea e visceral (Gomes e cols., 2008; Oliveira e cols., 2008; Collins e cols., 2009). Entretanto, sugere-se que essa proteção gerada pela pré-imunização seja flebotomíneo espécie-específica (Thiakaki e cols., 2005; Drahota e cols., 2009) o que dificulta as considerações de utilização das substâncias salivares para a produção de vacinas protetoras contra as leishmanioses.

Outra característica é que os flebotomíneos ingerem parte da saliva secretada por eles durante o processo de alimentação (observação pessoal). Charlab e Ribeiro (1993) demonstraram em experimentos *in vitro* que a saliva influencia na metaciclogênese. É possível que este contacto da saliva com os parasitos em desenvolvimento dentro do intestino médio do vetor tenha alguma influência na virulência e na diferenciação das formas infectivas.

Finalmente, alguns trabalhos sugerem que na presença de homogenados de glândula salivar, macrófagos sejam incapazes de produzir óxido nítrico com atividade leishmanicida (Theodos & Titus 1993; Titus & Ribeiro 1990; Waitumbi & Warburg, 1998; Norsworthy e cols., 2004). Porém em um trabalho recente, Rogers e colaboradores encontraram que a saliva e o PSG, isolados ou em combinação, não influenciam a geração do óxido nítrico pelos macrófagos (Rogers e cols., 2009). Este é uma assunto que precisa ser mais bem estudado.

A saliva de *L. longipalpis* e *P. papatasi* também possui fatores quimiotáticos para macrófagos (Anjili e cols., 1995; Zer e cols., 2001, Teixeira e cols., 2005). Rogers e colaboradores (2009) demonstraram que o recrutamento dessas células em camundongos injetados com saliva de *L. longipalpis* foi cinco vezes maior do que naqueles injetados com solução salina. Já em grupos injetados com PSG esse aumento foi de 108 vezes. Quando PSG e saliva foram inoculadas juntas a atração foi aumentada para 224 vezes, indicando a existência de um sinergismo de atuação das duas substâncias para a quimiotaxia dos macrófagos (Rogers e cols., 2009).

Interessante é que até recentemente, todos os trabalhos sobre o efeito da saliva do vetor na exacerbação ou proteção contra a infecção por *Leishmania* foram desenvolvidos com vetores colonizados em laboratório. Entretanto, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo (Laurenti e colaboradores, 2009a,

2009b) utilizando o modelo murino, demonstraram significativas diferenças no efeito de exacerbação causada pela saliva de *L. longipalpis* criados em laboratório (colonizados) ou capturados no campo. A saliva dos flebotomíneos colonizados apresentou um efeito de exacerbação mais forte, causando lesões duas vezes maiores do que aquelas provocadas pela de flebotomíneos capturados no campo. Além disso, esses trabalhos demonstraram que a saliva dos insetos capturados no campo não possui os mesmos fatores quimiotáticos para as células dos hospedeiros como verificado na de flebotomíneos colonizados. Finalmente, foi mostrado que a composição e quantidade de proteínas observadas na saliva dos dois grupos de vetores, colonizados e do campo, foram substancialmente diferentes (Laurenti e cols., 2009a). Essa diferença na sua composição justifica o fato do achado de um menor efeito na modulação da infecção por *Leishmania* em camundongos da saliva dos flebotomíneos do campo quando comparados à proveniente flebotomíneos colonizados (Laurenti e cols., 2009b).

A importância do gel sintetizado pelo promastigota (PSG = “promastigote secreted gel”) - A presença de uma massa de parasitos embebidos em uma matriz gelatinosa na região da válvula do estomodeu de fêmeas de flebotomíneos infectadas é comum em todas as combinações vetor-*Leishmania* estudadas até o momento (Warburg e cols., 1986; Lawyer e cols., 1987, 1990; Walters e cols., 1987, 1989a; Stierhof e cols., 1999; Rogers e cols., 2002, 2004). Esta substância é secretada em altas concentrações pelos promastigotas de *Leishmania* e é constituída proteofosfoglicanos (PPGs) filamentosos que forma uma rede tridimensional e gelatinosa que obstrui a região anterior do trato digestivo de flebotomíneos infectados (Stierhof e cols., 1999). O bloqueio causado pelo PSG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, pois aumenta o número de tentativas de picada e o tempo de repasto (Killick-Kendrick e cols., 1977; Beach e cols., 1985; Rogers e cols., 2002; Rogers & Bates, 2007). Devido a sucessivas picadas, esse comportamento dos insetos infectados deve favorecer a inoculação de uma maior quantidade de parasitos na pele do hospedeiro.

O PSG regurgitado juntamente com os parasitos atua como mais um potente fator de virulência (Bates & Rogers, 2004; Rogers e cols., 2004) adicionalmente à saliva, como já discutido. A exacerbação da infecção causada pelo PSG tem sido atribuída a duas propriedades fundamentais: capacidade de recrutar macrófagos para o sítio da infecção e aumento na expressão e atividade de arginase nessas células, intensificando a síntese de moléculas requeridas para o crescimento do parasito internalizado (Rogers e cols., 2009).

A presença do gel e dos parasitos no intestino torácico também altera o funcionamento da válvula do estomodeu. Essa válvula fica aberta por mais tempo, aumentando o refluxo de sangue e parasitos no local da picada (Schlein e cols., 1992; Rogers e cols., 2004; Rogers & Bates, 2007). Além disso, sua abertura é presumivelmente essencial para a expansão da infecção para o intestino anterior (Rogers e cols., 2002). Também foi sugerido que quitinases

produzidas pelos parasitos possam causar uma disfunção na válvula do estomodeu (Schlein e cols., 1992; Volf e cols., 2004) e, dessa forma, aumentar a transmissão das leishmanias.

Considerações Finais.

Existem poucos grupos de pesquisas estudando o processo de interação de insetos vetores com patógenos causadores de doenças em humanos. Se considerarmos o estudo de vetores causadores das leishmanioses nas Américas, a carência ainda é maior, principalmente em relação ao conhecimento da biologia dos vetores e dos estudos de interação e transmissão aos hospedeiros vertebrados. Como discutimos anteriormente, o desenvolvimento de modelos de estudos necessita ser estendido a outros vetores, e não somente ao *Lutzomyia longipalpis*, o qual serve para estudos de inferências do processo de interação com parasitas transmissores de leishmanioses cutânea, apesar dele na natureza ser vetor exclusivo de leishmaniose visceral. O conhecimento do genoma dos parasitas e dos vetores gera ferramentas importantes que podem ser utilizadas em pesquisas considerando estudos moleculares e de expressão gênica que permitam avançar em vários aspectos relacionados com a competência vetorial. Além disso, é necessário conhecer e estudar insetos vetores capturados no campo e não somente insetos colonizados. Alguns laboratórios vem observando que depois de algumas gerações, distintas espécies de flebotomíneos tornam-se mais susceptíveis ou resistentes às infecções por *Leishmania* (Secundino e Pimenta, observações pessoais). Finalmente, aos jovens estudantes e pesquisadores que tenham interesse em pesquisar e/ou aprofundar os seus estudos em flebotomíneos vetores e o processo de interação com parasitas do gênero *Leishmania*, recomendamos que além de lerem artigos dos nosso grupo, leiam também o que vem sendo publicado neste assunto pelos grupos dos seguintes pesquisadores: David Sacks, Paul Gates e Petr Volf.

Observação: Neste ano de 2012, no momento da revisão final deste capítulo, dois novos artigos relacionados com o tema apresentado foram publicados pelo nosso grupo. A leitura destes é recomendável, pois um deles trata do desenvolvimento de *L. infantum chagasi* no *L. longipalpis* e o outro trata da primeira descrição de uma metodologia que permite a transmissão natural via picada desta espécie em laboratório (vide bibliografia abaixo).

- Vanessa C. Freitas, Klivia P. Parreiras, Ana Paula M. Duarte, Nagila F. C. Secundino, and Paulo F. P. Pimenta. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. Apr 1, 2012; 86 (4) (*in press*)
- Secundino NF, de Freitas VC, Monteiro CC, Pires AC, David BA, Pimenta PF. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the

Lutzomyia longipalpis to two different vertebrates. Parasit Vectors. 2012 Jan 19; 5:20.

Agradecimentos.

Os autores agradecem o suporte financeiro da FIOCRUZ, CNPq, FAPEMIG e OMS. Vanessa C. Freitas foi pós-doutoranda pela FAPEMIG (Processo: CBB 00260/09).

29

Referências Bibliográficas.

Adler, S., 1938. Factors determining the behavior of *Leishmania* sp. in sandflies. Harefuah. 14, 1-6.

Adler, S., Theodor, O., 1927. The behavior of cultures of *Leishmania tropica*, *L. infantum* and *L. braziliensis* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. Nature (Lond). 119, 48-49.

Adler, S., 1964. *Leishmania*. Adv Parasitol. 2, 35-91.

Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., Githure, J.I., Olobo, J.O., Robert, L.L., et al., 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. Acta Trop. 60, 97-100.

Azulay, R.D., 1952. Leishmaniose tegumentar. Tese para Livre Docente. Rio de Janeiro.

Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med. 4, 601-609.

Beach, R., Kiilu, G., Leeuwenburg, J., 1985. Modifications of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. Am J Trop Med Hyg. 34, 278-282.

Beattie, L., Evans, K.J., Kaye, P.M., Smith, D.F., 2008 Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. Parasite Immunol. 30, 255-266.

Beauty, B.J., Marquardt, W.C., 1996. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., et al., 1998. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*. 188, 1941-1953.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D., 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 165, 969-977.

Besteiro, S., Eilliams, R.A.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 37, 1063-1075.

Borovsky, D., Schlein, Y., 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol*. 1(3), 235-242.

Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., et al., 2004. Characterization of a defensin from the sandfly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004. 72, 7140-7146.

Brazil, R.P., Oliveira, M.O., 1999. Parthenogenesis in the sand fly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol*. 13,463-464.

Butcher, B.A., Turco, S.J., Hilty, B.A., Pimenta, P.F.P., Panunzio, M., Sacks, D.L., 1996. Deficiency in β 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sandfly interaction. *J Biol Chem*. 271, 20573-20579.

Charlab, R., Ribeiro, M., 1993. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. *Am J Trop Med Hyg*. 48, 831-838.

Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., War, J.M., et al., 2009. Sand Fly salivary proteins induce strong cellular immunity un a natural

reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. PLOS Pathog. 5(5), e1000441.

Descoteaux, A., Turco, J.S., 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochim Biophys Acta. 1455, 341-352.

Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004. 27, 305-318.

Dillon, R.J., Lane, R.P., 1993. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langerone*. Parasitol Res. 79, 492-496.

Dillon, R.J., Lane, R.P., 1999. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding protein in the gut of the sandfly vector. Parasitology. 118, 27-32.

Donnelly, K.B., Lima, C.L., Tutus, R.G., 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sandfly vector salivary gland lysate. J Parasitol. 84, 97-103.

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

El Sawaf, B.M., Doha, S.A., Kamel, K.E., Emam, M., 2008. Attachment of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* in the midgut of their respective sandfly vectors *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). J Egypt Soc Parasitol. 38(3), 833-842.

Evangelista, L.G., Leite, A.C., 2002. Histochemical localization of N-acetylgalactosamine in the midgut *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 39, 432-439.

Feng, L.V., 1951. The role of the peritrophic membrane in *Leishmania* and trypanosome infection of sandflies. Pek Nat His Bull. 19, 327-334.

Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., et al., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the

fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. Proc Natl Acad Sci USA. 105, 7845-7850.

Gossage, S.M., Rogers, M.E., Bates, P.A., 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 33, 1027-1034.

Herrer, A., Christensen, H.A., 1975. Implication of Phlebotomus sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. Science. 190(4210), 154-155.

Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. The Lancet. 354, 1191-1199.

Ilg, T., 2000. Proteophosphoglycan of *Leishmania*. Parasitol Today. 16(11), 489-497.

Ilg, T., Handman, E., Stierhof, Y.D., 1999. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Biochem Soc Trans. 27, 518-525.

Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M.J., Thomas-Oates, J., Thomas, J., et al., 1992. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. J Biol Chem. 267, 6834-6840.

Jochim, R.C., Teixeira, C.R., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R.B., et al., 2008. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies. BCM Genomics. 9:15.

Johnson, P.T., 1961. Autogeny in Panamanian *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). Ann Ent Soc Amer. 54, 116-118.

Joshi, M.B., Rogers, M.E., Shakarian, A.M., Yamage, M., Al-Harhi, S.A., Bates, P.A., Dwyer, D.M., 2005. Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of *LmexCht1*: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. J Biol Chem. 280, 3847-3861.

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

Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Roeton, E., Sacks, D., 2000a. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 290, 1351-1354.

Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F.P., Rowton, E., Sacks, D.L., 2000b. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*. 121, 25-33.

Kamhawi, S., Ortigão, M.R., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., et al., 2004. A Role for Insect Galectins in Parasite. *Cell*. 119(3), 329-341.

Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parasitol*. 33, 315-320.

Killick-Kendrick, R., 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly, in: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the kinetoplastida*. Volume 2. Academic Press, London, New York & San Francisco, pp. 396-449.

Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clin Dermatol*. 17, 279-289.

Killick-Kendrick, R.R., Leaney, A.J., Ready, P.D., Molyneux, D.H., 1977, in: *Leishmania* in *Phlebotominae* sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamster by bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B*. 196, 105-115.

Killick-Kendrick, R.R., Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1974a. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 68, 269-276.

Killick-Kendrick, R.R., Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1974b. *Leishmania* in phlebotominae sandflies. 1. Modifications of the flagellum associated with attachment to the midgut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol*. 187, 409-419.

Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Efen, J., Lawyer, P., et al. 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(29), 10125-10130.

Lainson, R., Rangel, E., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 811-827.

Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. in: Peters, W., Killick-Kendrick, R., (Eds.), The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London, Academic Press; 1987. pp. 1-121.

Lainson, R., Shaw, J.J., 1988. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Ann Parasitol Hum Comp. 63(2), 134-145.

Laurenti, M.D., da Matta, L.R., Pernichelli, T., Secundino, N.F.C., Pinto, L.C., Corbett, C.E.P., Pimenta, P.F., 2009b. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Scand J Immunol. 70, 389-395.

Laurenti, M.D., Silveira, V.M.S., Secundino, N.F.C., Corbett, C.E.P., Pimenta, P.F., 2009a. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol Int. 58(3), 220-226.

Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrahtu, Y.B., Githure, J.I., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg. 43(1), 31-43.

Lawyer, P.G., Young, D.G., Butler, J.F., Akin, D.E., 1987. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 24, 347-55.

Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G., Turco, S., 1999. Intra-Species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry. 38, 9813-9823.

McConville, M.J., Ferguson, M.A.J., 1993. The structure, biosynthesis and function of glycolysate phosphatidylinositol in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* 294, 305-324

McConville, M.J., Handman, E., 2007. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol.* 37, 1047-1051.

McConville, M.J., Thomas-Oates, J.E., Ferguson, M.A., Homans, S.W., 1990. Structure of the lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *J Biol Chem.* 265, 19611-19623.

McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., Sacks, D.L., 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 11 (10), 3593-3600.

Miranda, J.C., Secundino, N.F.C., Nieves, E., Souza, A.P.A., Bahia-Nascimento, A.C., Prates, D.B., et al., 2008. Studies of the influence of the presence of domestic animals on increasing the transmission probabilities of Leishmaniasis. *Ann Med Entomol (Bhopal, India).* 17, 9-15.

Missawa, N.A., Lorosa, E.S., Dias, E.S., 2008. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(4), 365-368.

Modi, G.B., 1997. Care and maintenance of phlebotominae sandfly colonies. in: Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis C. (Eds.), *Molecular Biology of Insect Disease Vectors*. Chapman and Hall, London, pp. 21-30.

Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R., Ashford, R.W., 1975. *Leishmania* in Phlebotominae sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B;* 190, 341-357.

Momen, H., Cupolillo, E., 2000. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 95(4), 583-588.

Moodi, F., Handman, E., 1993. The structure of *L. major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 268(25), 18457-18466.

Morris, R.V., Shoemaker, C.B., David, J.R., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol.* 167, 5226-5230.

Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., Volf, P., 2007. A lipophosphoglycan independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect.* 9(3), 317-324.

Nieves, E., Pimenta, P.F.P., 2000. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 37(1), 134-140.

Nieves, E., Pimenta, P.F.P., 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* 67(6), 640-647.

Norsworthy, N.B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G., Soong, L., 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* Infection by modulating Interleukin-10 production. *Infect Immun.* 1240-1247.

Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2008. Immunity to Distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2(4), e226.

Orlandi, P.A., Turco, S.J., 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 262, 10384-10391.

Pessoa, S.B., Barreto, M.P., 1948. *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Saúde.

Peters, N.S., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kiling, N., Kamhawi, S., et al., 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 321, 970-974.

Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Sacks, S.L., 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol.* 72(2): 191-204.

Pimenta, P.F.P., da Silva, R.P., Sacks, D.L., Pinto da Silva, P., 1989. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture flip: A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stages promastigotes. *Eur J Cell Biol.* 48, 180-190.

Pimenta, P.F.P., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., Sacks, D., 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology.* 115, 359-369.

Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M., Rowton, E., Mogi, G.G., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S., Sacks, D.L. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 9155-9159.

Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., Sacks, D. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. *Science.* 256, 1812-1815.

Pitaluga, A.N., Lobo, V., Ortigão-Faria, A.R., Dávila, J.R., Souza, A.M., Ramalho-Ortigão, J.M., Traub-Cseko Y.M. 2009. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics.* 282(3), 307-317.

Quinnel, R.J., Dye, C., Shaw, J.J., 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol.* 6(3), 195-200.

Ramalho-Ortigão, J.M., Traub-Cseko, Z.M., 2003. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 33, 279-87.

Ramalho-Ortigão, J.M., Kamhawi, S., Joshi, M.B., Reynoso, D., Lawyer, P.G., Dwyer, D.M., et al., 2005. Characterization of an activated chitinolytic system in the midgut of the sandfly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol.* 14(6), 703-712.

Ramalho-Ortigão, M.R., Jochin, R.C., Anderson, J.M., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Kamhawi, S., et al., 2007. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and

Leishmania major-infected sandflies. BCM Genomics. 8, 300.

Ribeiro, J.M., 1987. Vector salivation and parasite transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 82, 1-3.

Ribeiro, J.M., Katz, O., Panell, L.K., Waitumbi, J., Warburg, A., 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. J Exp Biol. 202:1551-1559.

Ribeiro, J.M., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989. Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies. Insect Biochem. 19, 409-412.

Ribeiro, J.M., Rossignol, P.A., Spielman, A., 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Comp Biochem Physiol. 83, 683-686.

Rogers, K.A., Titus, R.G., 2003. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate on human primary *in vitro* immune responses. Parasite Immunol. 25, 127-134.

Rogers, M.E., Bates, P.A., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog. 3(6), 818-825.

Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A., 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology. 124, 498-507.

Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A.J., Bates, P.A., 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature. 430, 463-467.

Rogers, M.E., Hajmová, M., Joshi, M.B., Sadlova, J., Mwyer, D.M., Volf, P., et al., 2008. *Leishmania* chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cell Microbiol. 10, 1363-1372.

Rogers, M.E., Kropf, P., Choi, B., Podinovskaia, M., Bates, P., Muller, I., 2009. Proteophosphoglycan regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophage to promote parasite survival. PLoS

Pathog. 5(8), 1-14.

Sacks, D.L., 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol. 69, 100-103.

Sacks, D.L., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 55, 453-483.

Sacks, D.L., Perkins, P.V., 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science. 223, 1417-1419.

Sacks, D.L., Crodin, T.N., Turco, S.J., 1990. Developmental modifications of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. 42, 225-233.

Sacks, D.L., Lawyer, P., Kamhawi, S., 2008. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions, in: Myler, P., Fasel, N. (Eds.). *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk. pp. 205-238.

Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S.J., et al., 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci USA. 97, 406-411.

Sacks, D.L., Pimenta, P.F.P., McConville, M.J., Schneider, P., Turco, S.J., 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformation changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J Exp Med. 181, 685-697.

Sacks, D.L., Saraiva, E.M., Rowton, E., Turco, S.J., Pimenta, P.F.P., 1994. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. Parasitology. 108, S55-62.

Sádlová, J., Volf, P., 2009. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell Tissue Res. 337(2), 313-325.

Santos, V.C., Araujo, R.A., Machado, L.A.D., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH

in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biology* 211: 2792-2798.

Saraiva, E.M., Pimenta, P.F., Brodin, T.N., Rowton, E., Modi, G.B., Sacks, D.L., 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* on *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 111(Pt3), 275-287.

40

Schlein, Y., Jacobson, R.L., 1998. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology (London)*. 117, 467-473.

Schlein, Y., Romano, H., 1986. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Exp Parasitol*. 62, 376-380.

Schlein, Y., Warburg, A., 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol*. 23(1), 11-15.

Schlein, Y., Jacobson, R.L., Schlomai, J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc R Soc Lond (Biol)*. 245, 121-126.

Schlein, Y., Jacobson, R.L., Messer, G., 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 9944-9948.

Secundino, N.F.C., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M., Pimenta, P.F.P., 2005. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *J Med Entomol*. 42, 928-938.

Secundino, N., Kimblin, N., Peters, N.C., Lawyer, P., Capul, A.A., Berveley, S.M., et al., 2010. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cel Microbiol*. 12(7), 906-918.

Shakarian, A.M., Dwyer, D.M., 1998. The *Ld Cht1* gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. *Gene*. 208, 315-322.

Shakarian, A.M., Dwyer, D.M., 2000. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases with are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol.* 94, 238-242.

Soares, R.P.P.S., Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc.* 75(3), 301-330.

Soares, R.P.P., Cardoso, T.L., Barron, T., Araújo, M.S.S., Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol.* 35, 245-253.

Soares, R.P.P., Margonari, C., Secundino, N.F.C., Macedo, M.E., Costa, S.M., Rangel, E.F., et al., 2010. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol.* ID 439174.

Soares, R.P.P., Macedo, M.E., Ropert, C., Gontijo, N.F., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., 2002. *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol.* 121, 213-224.

Stierhof, Y.D., Bates, P.A., Jacobson, R.L., Rogers, M.E., Schlein, Y., Handman, E., et al., 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol.* 78,675-689.

Svárovská, A., Ant, T.H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S., Volf, P., 2010. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (*lpg2*) but not lipophosphoglycan (*lpg1*) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(1), e580.

Svobodova, M., Volf, P., Killick-Kendrick, R., 1996. Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. *Ann Trop Med Parasitol.* 90, 329-336.

Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol.* 175, 8346-8353.

Telleria, L.T., Pitaluga, N.A., Ortigão-Faria, J.R., Araújo, A.P.O., Ramalho-Ortigão, L.M., Traub-Cseko, Y., 2007. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. Arch Insect Biochem Physiol. 66, 53-63.

Tesh, R.H., Chaniotis, B.N., Aranson, M.D., Johnson, K.M., 1971. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. Am J Trop Med Hyg. 20, 150-156.

Theodos, C.M., Titus, R.G., 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. Parasite Immunol. 15, 481-487.

Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G., 1991. Analysis of enhancing effect on sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infect Immun. 59, 1592-1598.

Thiakaki, M., Rohousova, I., Volfová, V., Volf, P., Chang, K.P., Soteriadou, K., 2005. Sand fly species-specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-Balb/C mouse model. Microbes Infect. 7, 760-766.

Titus, R., Mbow, M., 1999. The vasodilator of *Lutzomyia longipalpis* sand fly salivary glands exacerbates infection with *Leishmania major* in mice. FASEB J, 13(Pt 2, Suppl S):A970.

Titus, R.G., Ribeiro, J., 1988. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science. 239, 1306-1308.

Titus, R., Ribeiro, J., 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. Parasitol Today. 6, 157-160.

Turco, S.J., 2003. Trypanosomatid surface and secreted carbohydrates, in: Marr, J.J., Nilsen, T.W., Komuniecki, R.W. (Eds). Molecular Medical Parasitology. Academic Press, California. pp.225-240.

Turco, S.J., Descoteaux, A., 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol. 46, 65-94.

Turco, S., 1990. The leishmanial lipophosphoglycan: A multifunctional molecule. *Exp Parasitol.* 70(2), 241-245.

Vaidyanatham, R., 2004. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contraction in hemimetabolous and holometabolous insects. *J Invertebr Pathol.* 87, 123-128.

Vaidyanatham, R., 2005. Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae). *J Med Entomol.* 42, 142-152.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173, 6521-6525.

Volf, P., Kiewgová, A., Svobodová, M., 1998. Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med Vet Entomol.* 12, 151-154.

Volf, P., Skarupová, S., Man, P., 2002. Characterization of the lectin from female of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem.* 269, 6294-6301.

Volf, P., Hajmova, M., Sadova, J., Votypka, J., 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol.* 34, 1221-1227.

Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vect Ecol.* 36, S1-S9.

Waitumbi, J., Warburg, A., 1998. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxid production by murine macrophages. *Infect Immun.* 66, 1534-1537.

Walters, L.L., 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Eukaryot Microbiol.* 40, 196-206.

Walters, L.L., Chaplin, G.L., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989b. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Phlebotomidae): a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg.* 40, 19-39.

Walters, L.L., Irons, K.P., Guzman, H., Tesh, R.B., 1993. Formation and compositions of the peritrophic membrane in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 30, 179-198.

Walters, L.L., Irons, K.P., Guzman, H., Tesh, R.B., 1995. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinacrassa* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 32, 711-725.

Walters, L.L., Irons, K.P., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1992. Refractory barriers in the sandfly (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg. 46,211-228.

Walters, L.L., Modi, G.B., Chaplin, G.L., Tesh, R.B., 1989a. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg. 41(3), 295-317.

Walters, L.L., Modi, G.B., Tesh, R.B.M., Burrage, T., 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg. 36(2), 294-314.

Warburg, A., 2008. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. Trans R Soc Trop Med Hyg. 102, 161-166.

Warburg, A., Hamada, G.S., Schlein, Y., Shire, D., 1986. Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. Z Parasitenkd. 72, 423-431.

Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., Neva, F., 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B, 345, 223-230.

World Health Organization, 2006. Control of Leishmaniasis. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_4-en.pdf. Acesso em 18 jan 2010.

World Health Organization, 2010. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/. Acesso em 18 jan 2010.

Young, D.G., Lawyer, P.G., 1987. New world vectors of the Leishmaniases, in: Current Topics in Vector Research. Harriz, K.F. (Eds). Spring-Verlag, New York, pp.29-71.

Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., Warburg, A., 2001. Effect of sand fly saliva *Leishmania* uptake by murine macrophages. Int J Parasitol. 31, 810-814.