

NOTA TÉCNICA

COMPONENTES ANTIINFLAMATÓRIOS NA SALIVA DO *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*, VETOR DA *Leishmania chagasi*

Marta Chagas Monteiro¹

RESUMO

A inoculação da saliva de vetores na pele do hospedeiro é importante tanto para a alimentação do inseto quanto para a transmissão e estabelecimento de várias infecções. Em leishmaniose, vários estudos demonstram que a saliva dos vetores *Lutzomyia* e *Phlebotomus* contém substâncias com atividades imunossupressoras, imunomodulatórias, vasodilatadoras, anti-plaquetárias e anticoagulantes. Os componentes salivares auxiliam a alimentação do inseto através do aumento do fluxo sanguíneo, assim como induzem a imunossupressão no hospedeiro, o que é fundamental para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Neste trabalho foi observado que a saliva induz a produção de IL-10, citocina antiinflamatória, não alterando a produção de IFN- γ , citocina próinflamatória, no foco da inflamação. Além disso, a saliva potencializa o edema induzido por carragenina.

Palavras-chave: *Leishmania*; *Lutzomyia longipalpis*; extrato da glândula salivar; saliva; inflamação

ABSTRACT

The inoculation of the saliva with vectors in the skin of the parasite is important to the feeding of the insect as well as to the transmission and establishment of various infections. In leishmaniasis, there are many studies which show that the saliva of the vectors *Lutzomyia* and *Phlebotomus* contain substances with immunosuppressor, immunomodulatory, vasodilator, antiplatelet and anticlotting activities. The salivary components help in the feeding of the insect by means of the increase of the blood flow as well as they induce to the immunosuppression of the parasite, which is fundamental to the establishment

¹ Departamento de Ciências Biológicas - UNICENTRO. 85040-080 Guarapuava-PR. E-mail: mcmonteiro@unicentro.br

of the infection by *Leishmania*. In this work, it was observed that the saliva induces to the production of IL-10, anti-inflammatory cytokine, and it does not alter the IFN-g levels, proinflammatory cytokine, in the centre of the inflammation. Furthermore, the saliva enhances the edema induced by carrageenin.

Key words: *Leishmania*; *Lutzomyia longipalpis*; extract of the salivary glands; saliva; inflammation

DESENVOLVIMENTO

Leishmania spp. são protozoários, da família *Trypanosomatidae*, capazes de infectar e causar doenças em seres humanos e animais (ANONYMOUS, 1990). O ciclo de transmissão da *Leishmania* é realizado pelo inseto vetor dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Ao sugar o sangue, a fêmea do mosquito regurgita na pele do hospedeiro um pequeno número de parasitos (10 a 100 promastigotas) juntamente com a sua saliva.

A saliva regurgitada na pele é importante tanto para a alimentação do inseto quanto para a transmissão e estabelecimento da infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. Visto que na saliva estão presentes vários componentes com diferentes atividades, tais como: imunossupressores, imunomoduladores, vasodilatadores, inibidores da agregação plaquetária e coagulação sanguínea, o que aumenta o fluxo sanguíneo e possibilita a alimentação do inseto (RIBEIRO, 1987). Além disso, componentes com atividades imunossupressoras e imunomoduladoras inibem o desenvolvimento de uma resposta imune inflamatória do hospedeiro contra o parasita, ocasionando o aumento da infecção (SAMUELSON et al., 1991). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antiinflamatório do extrato de glândula salivar do vetor *L. longipalpis* (EGS) na produção de citocinas inflamatórias induzida por *L. major*, além disso, verificar o efeito edematogênico induzido pelo EGS em pata de ratos e camundongos.

Para a avaliação do efeito antiinflamatório do EGS, camundongos susceptíveis a infecção por *L. major* (BALB/c) receberam injeção intraperitoneal de salina (100ml/cav), *L. major* (105 promastigotas/cav), EGS (1 glândula/cav) ou *L. major* +EGS. A retirada do lavado peritoneal para dosagem das citocinas foi realizada 48 horas após a injeção dos estímulos; as citocinas foram dosadas pela técnica de ELISA. Os animais injetados com *L. major* e EGS apresentaram níveis elevadíssimos de IL-10 (citocina antiinflamatória) na cavidade peritoneal (305 ± 10 pg/ml), quando comparado aos animais injetados com salina (10 ± 0.15 pg/ml), *L. major* (50 ± 0.10 pg/ml) ou EGS (60 ± 0.13 pg/ml). No entanto, quanto à produção de citocina próinflamatória, a administração de

EGS não alterou a produção de IFN-g induzida por *L. major* (*L. major* +EGS = 99 ± 0.8 pg/ml; *L. major* = 98 ± 2 pg/ml; EGS = não detectado).

Para o efeito edematogênico, camundongos receberam injeções intraplantar com 50ml salina; 300mg de carragenina; EGS (1 glândula) ou carragenina + EGS. A migração A espessura da pata foi avaliada por paquímetro nos tempos de 2, 4, 6 horas após a administração dos estímulos. Observou-se que a injeção de 300mg de carragenina induziu edema na pata de camundongos ($1,166 \pm 0.168$ mm) a partir da 2a hora quando comparado à salina ($0,086 \pm 0,032$ mm). Além disso, neste tempo, observou-se que a administração do EGS foi capaz de potencializar significativamente o edema ($1,714 \pm 0,105$ mm) induzido pela carragenina. A injeção somente do EGS já foi capaz de induzir um pequeno, porém significativo edema na pata de camundongos ($0,734 \pm 0,078$ mm).

A atividade antiinflamatória induzida pela saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis*, já vem sendo demonstrada nos últimos anos, sendo que vários mecanismos de ação vêm sendo propostos: *i*) a saliva inibe a produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e a apresentação de antígenos por macrófagos infectados através do bloqueio da interação ocorrida entre células T e células apresentadoras de antígenos (APCs) (THEODOS e TITUS, 1993; HALL e TITUS, 1995); *ii*) inibe a modulação da resposta Th1, aumentando a resposta do padrão Th2 com acentuada produção de IL-4 por linfócitos em animais infectados e não infectados (LIMA e TITUS, 1996; MONTEIRO et al., 2000). *iii*) potencializa o recrutamento de eosinófilos e linfócitos Th2 (MONTEIRO et al., 2000).

O edema promovido pela saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis* pode ser devido à presença de peptídeos vasodilatadores, os quais podem induzir vasodilatação e inibir a agregação plaquetária, favorecendo desta forma o fluxo sanguíneo (RIBEIRO, 1987). A picada do vetor do gênero *Lutzomyia* também resulta em eritema de longa duração na pele do hospedeiro vertebrado (LERNER et al., 1991). Os principais constituintes presentes na saliva do *Lutzomyia longipalpis* são: **a**) maxadilan, peptídeo vasodilatador e potente indutor de eritema, que afeta o fluxo sanguíneo e tem efeito imunomodulador (LERNER et al., 1991; QURESHE et al., 1996). Vários estudos demonstram que o maxadilan suprime o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), a proliferação de linfócitos T e a expressão de TNF- α por macrófagos e aumenta a liberação de IL-10, IL-6 e PGE₂ (QURESHE et al., 1996; BOZZA et al., 1998; SOARES et al., 1998); **b**) apirase salivar, enzima que hidrolisa ATP e ADP formando AMP (CHARLAB et al., 1999); **c**) 5' nucleotidase, enzima que hidrolisa AMP formando adenosina, composto com atividades imunossupressoras, vasodilatadoras e antiplaquetária (CHARLAB et al., 1999; RIBEIRO et al., 2000a); **d**) adenosina deaminase, enzima que converte a molécula de adenosina para inosina, composto com múltiplos efeitos antiinflamatórios (CHARLAB et al., 2000); **e**) amilase salivar que degrada carboidrato

(RIBEIRO et al., 2000b); **f**) Hialuronidase, hidroliza o ácido hialurônico (RIBEIRO et al., 2000c); **g**) peptídeo RGD, que possui atividade antiplaquetária (CHARLAB et al., 1999). Várias investigações vêm demonstrando que a maioria das atividades desencadeadas pela saliva do *Lutzomyia longipalpis* é mediada pela associação de vários componentes, como por exemplo: i) atividades vasodilatadoras e antiplaquetária são induzidas pela ação da 5' nucleotidase, maxadilan e apirase; ii) a hialuronidase auxilia na difusão do maxadilan, que então promove sua função; iii) atividades antiinflamatórias e imunossupressoras são mediadas principalmente por adenosina, inosina e o maxadilan (KAMHAWI, 2000).

Apesar do isolamento de vários componentes da saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis*, até o momento, ainda não foi possível identificar quais os componentes(s) antiinflamatórios(s) responsáveis pelas atividades descritas acima. Esta identificação seria de grande valia, pois possibilitaria o surgimento de novas drogas eficazes contra doenças inflamatórias crônicas e doenças degenerativas e o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANONYMOUS. *World Health Organization Technical Report Series* n. 793, p1-158, 1990.
- BOZZA, M., SOARES, M.B.P., BOZZA, P.T., SATOSKAR, AR., DIACOVO, T.G., BROBACHER, F., TITUS, R.G., SHOEMAKER, C.B. & DAVID, J.R. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur. J. Immunol.*, n. 28, p.3120, 1998.
- CHARLAB R, VALENZUELA J.G, ROWTON E.D, RIBEIRO J.M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. n. 96, p.15155, 1999.
- CHARLAB R, ROWTON E.D, RIBEIRO J.M. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol.*, n.95, p.45, 2000.
- HALL, L.R. & TITUS, R.G. Sand fly vector selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *L. major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology*, n.151, p.3501, 1995.
- KAMHAWI S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.*, n.2, p.1765, 2000.
- LERNER, E.A., RIBEIRO, J.M., NELSON, R.J. & LERNER, M.R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *L. longipalpis*. *J. Biol. Chem.*, n. 266, p.11234, 1991.

- LIMA, H.C. & TITUS, R.G. Effect of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in Balb/c mice. *Infect Immunity*, n. 64, p.5442, 1996.
- MONTEIRO, M.C; RAMOS, C.D.L; LIMA, H; MENGUEL, J; SOUZA, A.; CUNHA, F.Q.C. The saliva of *Lutzomyia longipalpis* vectors effect in leukocyte migration induced by *L. major*. *Annals of XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology*, 2000.
- QURESHE, A. A., ASAHIMA, A., OHNUMA, M., TAJIMA, M., GRANISTEIN, R. D. & LERNER, E. A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilatador peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, n. 54, p. 665, 1996.
- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in blood feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol*, n. 32, p. 463, 1987.
- RIBEIRO J.M, ROWTON E.D, CHARLAB R. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagus sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol.*, n. 30, p.279, 2000a.
- _____. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol*, n. 30, p.271, 2000b.
- RIBEIRO J.M, CHARLAB R, ROWTON E.D, CUPP E.W. *Si. vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lu. longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *J Med Entomol.*, n.37, p.743, 2000c.
- SAMUELSON, J., LERNER, E., TESH, R. & TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.*, n. 173, p.49; 1991.
- SOARES, M.B., TITUS, R.G., SHOEMAKER, C.B. DAVID., J.R. BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sandfly salivary inhibits TNF-a and induced IL-6 by mouse macrophage thought interaction with the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor. *J. Immunol.*, n.160, p.1811, 1998.
- THEODOS, C.M. & TITUS, R.G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has a inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunology*, n. 15, p.481, 1993.