

A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos

Francinaldo S. Silva¹

Resumo – Para exercerem a hematofagia, os insetos hematófagos perfuram a pele de seus hospedeiros, liberam saliva e sugam o sangue. A saliva dos insetos é crucial para o sucesso do hematofagismo, pois o mesmo desencadeia diversos mecanismos fisiológicos naturais nos animais vertebrados. Para subjugar tais acontecimentos fisiológicos os insetos hematófagos estocam em suas glândulas salivares um arsenal molecular com várias propriedades, incluindo as de ação vasodilatadora, anticoagulante, antiplaquetária e imunomoduladora. Estes alvos da saliva dos insetos hematófagos correspondem aos principais episódios que ocorrem logo após lesão vascular e entrada de elementos salivares durante o processo hematofágico. Os microorganismos patogênicos que são transmitidos por insetos hematófagos podem ser favorecidos pelas ações anti-hemostáticas e imunomoduladoras da saliva, através da regulação da resposta imune do hospedeiro que potencializam os eventos infecciosos. O conhecimento da interação molecular entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros proporciona meios de combate às doenças transmitidas durante a hematofagia. Portanto, o objetivo deste trabalho é expor as principais características da saliva dos insetos hematófagos no processo hematofágico e nos mecanismos imunomoduladores que governam os ciclos de transmissão de patógenos aos animais e ao homem.

Palavras-chave: glândula salivar, hematofagia, hemostasia, insetos.

The hematophagic and parasitological importance of blood-sucking insect saliva

Abstract – To blood feed, haematophagous insects pierce the host skin, salivate and then suck blood. In this context, the blood-sucking insect saliva is the key for the success of this mission, since hematophagy triggers a range of natural physiological reactions in vertebrate animals. To overcome the host physiological events, blood-sucking insects store in their salivary glands a blend of molecules displaying various properties, such as vasodilatory, anti-clotting, anti-platelet aggregation and immunomodulation. These actions are addressed to the main events occurring just after a vascular lesion and when salivary compounds make contact with host tissue through hematophagy. Blood-sucking insects-transmitted parasites may be favored by the anti-haemostatic and immunomodulation saliva properties, through the host immune response regulation which may be responsible for infection enhancement. The molecular information from the interface between bloodsucking insects and their hosts give measures of controlling the diseases transmitted during blood feeding. Thus, the goal of this work is to show the main characteristics of the blood-sucking insect saliva both in the hematophagic and in the immunomodulatory mechanisms governing the transmission cycles of pathogens vectored by insects to animals and man.

Keywords: salivary glands, hematophagy, hemostasis, insects.

INTRODUÇÃO

Os principais hábitos alimentares dos insetos são a fitofagia, hábito relacionado à ingestão de alimento de origem vegetal, representado por seiva e frutos; a zoofagia, hábito cuja fonte alimentar é constituída de outros animais invertebrados e até de pequenos vertebrados; e a hematofagia, hábito restrito a cinco ordens de artrópodes e que consiste na ingestão de sangue de animais vertebrados. Neste contexto, existem mais de 14.000 espécies de artrópodes que sugam sangue, distribuídas em mais de 400 gêneros e em pelo menos oito famílias agrupadas em quatro ordens de insetos (Ross, 1982; Richards & Davies, 1984).

Dentre os insetos hematófagos, dois grupos bem distintos podem ser encontrados, conforme a relação com os hospedeiros vertebrados: os ectoparasitas permanentes e os ectoparasitas temporários (Carrera, 1991; Rey, 1992).

Recebido e aceito

¹ Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA, Universidade Federal do Maranhão - UFMA, Km 4, MA 230, s/n, Bairro Boa Vista, CEP 65500-000, Chapadinha - MA. E-mail: sandflybr@yahoo.com.br.

Comportamento hematofágico

Com exceção aos Hemiptera, os Siphonaptera e algumas espécies de Diptera (*Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* e *Glossina* spp), nos quais o comportamento hematofágico é compartilhado por ambos os sexos, a hematofagia é desempenhada exclusivamente pelas fêmeas. Neste comportamento os insetos assumem duas posturas básicas na busca do alimento sanguíneo: a solenofagia e a telmofagia. Na primeira, os insetos retiram sangue diretamente dos vasos sanguíneos, alguns do sangue extravascular, utilizando para isto uma probóscide longa e flexível, como por exemplo, os mosquitos (Diptera, Culicidae) e barbeiros (Hemiptera, Reduviidae), e, na segunda, os insetos geralmente possuem uma probóscide curta e dilaceram os pequenos vasos produzindo uma espécie de microhemorragia, e dela sugam o alimento sanguíneo (Gordon et al., 1952). Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), os maruins (Diptera, Ceratopogonidae) e os borrachudos (Diptera, Simuliidae) são exemplo de insetos telmófagos.

Para muitos insetos hematófagos, a alimentação sanguínea é necessária para suprir demandas nutricionais associadas com o crescimento do inseto. Muitos organismos só são capazes de evoluir e reproduzir realizando a hematofagia desde sua primeira fase de vida até a fase adulta (Carrera, 1991; Neves et al., 2005). Sem o repasto sanguíneo não ocorre a evolução completa desde larva até adulto, e os estágios imaturos, quando muito, farão apenas uma mudança de cutícula. Outros insetos, no entanto, exercem a hematofagia apenas como fonte de proteínas e aminoácidos, necessários ao desenvolvimento do ovário, tendo, portanto, relevante papel reprodutivo. Nesse caso, os machos não sugam sangue, necessitando somente das substâncias açucaradas obtidas de diversas fontes vegetais e que servirão para a sua manutenção biológica (Carrera, 1991; Rey, 1992; Neves et al., 2005).

Do ponto de vista parasitológico, a hematofagia proporciona um cenário para a transmissão de doenças aos animais e ao homem, visto que inúmeros microorganismos patogênicos utilizam o hábito hematofágico dos insetos para a continuidade de seu ciclo de vida e podem passar de um hospedeiro a outro através (1) do fluxo salivar (*Plasmodium* spp.); (2) do bloqueio mecânico do canal alimentar (*Leishmania* spp.); (3) da excreção de fezes contaminadas durante a pré-diurese (*Trypanosoma cruzi*), e (4) pelo rompimento do aparato bucal (*Wuchereria bancrofti*) (Carrera, 1991; Rey, 1992; Neves et al., 2005). Qualquer que seja a via de transferência, é durante a hematofagia que se estabelece o contato mais íntimo entre o inseto e seu hospedeiro sanguíneo.

Durante o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos injetam saliva nos tecidos dos hospedeiros. As moléculas do conteúdo salivar auxiliam na busca por um local ideal para a hematofagia e na superação das conseqüências fisiológicas naturais ali encontradas. Para exercer com sucesso esta tarefa, os insetos hematófagos precisam superar os obstáculos hemostáticos e inflamatórios do hospedeiro.

A hemostasia é um fenômeno natural em que os tecidos do hospedeiro agem no intuito de conter a perda de sangue (Spector & Axford, 1999; Metze, 2004), podendo esta resposta impedir o vínculo hematofágico do inseto com o vertebrado. Para superar tais barreiras, a evolução munuiu a saliva dos insetos hematófagos de um arsenal molecular encarregado de assessorar no combate e na neutralização das respostas do hospedeiro vertebrado (Ribeiro et al., 1994; Ribeiro, 1995; Basanova et al., 2002; Champagne, 2005). Além das propriedades anti-hemostáticas, o conteúdo da glândula salivar destes insetos apresenta grande relevância parasitológica em razão da capacidade de regular o sistema imune, podendo, através do poder inibitório das células microbicidas do hospedeiro, criar um ambiente adequado à sobrevivência e multiplicação dos microorganismos transmitidos durante a hematofagia (Gillespie et al., 2000; Andrade et al., 2005; Rohousová & Volf, 2006; Menezes et al., 2008).

Assim, a saliva dos insetos hematófagos certamente assegura o elo estabelecido pelo hábito hematofágico, acoplando os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasito e o hospedeiro. O conhecimento desta interação é de grande relevância para o

entendimento da estrutura de transmissão de doenças através da hematofagia. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo expor as principais características da saliva dos insetos hematófagos e sua importância hematofágica e parasitológica, contribuindo, assim, com os estudos sobre os insetos hematófagos e os mecanismos pelos quais transmitem doenças aos animais e ao homem.

A ação anti-hemostática da saliva dos insetos hematófagos

A hemostasia é um fenômeno complexo que ocorre nos animais vertebrados e que consiste de mecanismos elaborados para conter a perda sanguínea por uma lesão vascular. Neste processo, podem entrar em ação a constricção vascular, a agregação de plaquetas e a coagulação sanguínea. Buscando um repasto de sangue satisfatório, os insetos hematófagos necessitam contrariar os processos anti-hemostáticos do hospedeiro, e, para tal, a saliva destes artrópodes possui moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes e antiplaquetárias, que permitem uma sucedida alimentação sanguínea.

A ação vasodilatadora da saliva dos insetos hematófagos

Quando um inseto hematófago encontra sua fonte alimentar, perfura a pele e libera saliva. A saliva cria um microambiente favorável à alimentação através do bloqueio da vasoconstricção, a reação primária que ocorre nos pequenos vasos do hospedeiro quando há uma lesão vascular. A constricção dos pequenos vasos ocorre a partir da liberação de tromboxano A₂ e serotonina pelas plaquetas agregadas ou por células inflamatórias, como os neutrófilos (Metze, 2004). A vasoconstricção favorece um contato mais íntimo entre os vasos lesados e o tampão formado pelas plaquetas no intuito de obstruir a passagem de sangue. A superação deste obstáculo só acontece porque a saliva destes insetos possui substâncias com atividade vasodilatadora a qual propicia um maior fluxo sanguíneo para o local da picada (Ribeiro, 1992; Ribeiro et al., 1994; Ribeiro, 1995; Champagne, 2005; Takac et al., 2006). Estas substâncias podem atuar ao nível de endotélio, no caso do óxido nítrico, ou ao nível da musculatura lisa, no caso do maxadilán, um vasodilatador encontrado na saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, e das nitroforinas, moléculas carreadoras de ON encontrada na glândula salivar dos barbeiros (Lerner et al., 1991; Champagne, 1994; Champagne & Ribeiro, 1994; Ribeiro, 1995; Yin et al., 2000).

O óxido nítrico (ON), encontrado na saliva de muitos insetos hematófagos, funciona como molécula vasodilatadora. Ao picarem, estes insetos produzem vasodilatação através da injeção de ON em suas vítimas, como é o caso das espécies de hemípteros *Rhodnius prolixus* e *Cimex lectularius*. Como o ON é um gás instável, estes insetos estocam este composto em sua saliva na forma de nitroforinas, proteínas da mesma classe das mioglobinas e das hemoglobinas (Valenzuela et al., 1995; Andersen & Montfort, 2000). O ON injetado na forma de nitroforina induz relaxamento vascular através da elevação intracelular dos níveis do mediador GMPc das células musculares, ou seja, produz vasodilatação independente de endotélio e inibição da agregação das plaquetas, permitindo um fluxo sanguíneo contínuo (Champagne, 1994).

A molécula maxadilán, com ação vasodilatadora semelhante às nitroforinas, é responsável pelo eritema provocado pela picada de *L. longipalpis* durante a procura de um local favorável para exercer a hematofagia (Lerner et al., 1991; Ribeiro, 1995), semelhante ao que acontece com o componente vasodilatador da saliva do maruim *Culicoides variipennis*, que produz um halo avermelhado (eritema) ao redor da hemorragia petequial causada pela picada (Perez de Leon et al., 1997).

Além da importância hematofágica do maxadilán, esta molécula pode desempenhar relevância epidemiológica, pois sua ação, a nível de hospedeiro, pode caracterizar e direcionar o curso de uma infecção. O tamanho e a duração do eritema provocado pelo maxadilán dependem da quantidade desta molécula encontrada na saliva do inseto vetor (Warburg et al., 1994). O eritema provocado pelas picadas de *L. longipalpis* da América do Sul é maior e mais duradouro, contrastando com o eritema das espécies da América Central. Curiosamente, na América do Sul, a infecção pela *L.*

chagasi leva freqüentemente a uma doença tipicamente visceral, mas na América Central este parasito tem sido recentemente implicado no aparecimento de uma forma cutânea não ulcerada, além da forma típica supracitada (Ponce et al., 1991; Neva et al., 1997). Em ambos os casos o vetor é *L. longipalpis* e o agente etiológico é a *L. chagasi* (Noyes et al., 1997). Apesar da existência de uma divergência (cerca de 23%) na seqüência de aminoácidos da molécula de maxadilan dentro das populações de *L. longipalpis* da América Central e do Sul, isto não afeta a atividade vasodilatadora, pois todas as variantes possuem atividades de vasodilatação equivalentes. Por esta razão, a quantidade diferencial de maxadilan nas populações de *L. longipalpis* parece estar relacionada às diferentes manifestações clínicas desta forma de leishmaniose nas áreas supracitadas.

Os anofelinos possuem uma enzima com atividade de peroxidase que degrada a serotonina liberada pelas plaquetas, conseqüentemente bloqueando a vasoconstrição (Ribeiro & Nussenzeig, 1993). No *Aedes aegypti*, as moléculas vasodilatadoras constituem peptídeos pertencentes à família das taquiquininas (sialoquinina I e II) (Ribeiro, 1992), termo coletivo para várias substâncias de variadas ações fisiológicas e de ampla distribuição em várias espécies animais desde invertebrados até mamíferos. As taquiquininas ligam-se aos receptores presentes na parede dos vasos e induzem a liberação de ON e conseqüente relaxamento vascular (Champagne & Ribeiro, 1994).

A ação vasodilatadora foi também observada nos tabanídeos, em que o extrato salivar destes insetos foi capaz de exercer experimentalmente relaxamento arterial, (Rajská et al., 2003; Takác et al., 2006), ação esta compartilhada pelos simulídeos (Cupp et al., 1994).

A ação anticoagulante da saliva dos insetos hematófagos

Outro passo importante para uma eficiente alimentação sangüínea pelos insetos hematófagos é o bloqueio da cascata de coagulação. Este bloqueio se dá por uma série de substâncias anticoagulantes presentes na saliva destes insetos que podem operar inibindo os fatores de coagulação (Bassanova et al., 2002; Champagne, 2005). Muitas substâncias encontradas na saliva de várias espécies de insetos hematófagos têm como alvo os diversos ramos do sistema de coagulação.

Na saliva dos simulídeos são encontradas diversas substâncias anticoagulantes que tem como alvo vários fatores de coagulação. Por exemplo, na glândula salivar de *Simulium vittatum* são encontradas várias moléculas inibitórias dos elementos coaguladores do sangue, como a trombina, Xa e o fator V (Abebe et al., 1995; 1996; Basanova et al., 2002). Inibidores do fator Xa foram também isolados de mosquitos, *A. aegypti* e de triatomíneos (Stark & James, 1998).

Inibidores de trombina foram detectados na saliva de *H. irritans* (Cupp et al., 2000) e de várias espécies de tabanídeos (Kazimirová et al., 2001). Esta mesma ação foi verificada com a anofelina, molécula peptídica encontrada na saliva do mosquito *Anopheles albimanus* (Valenzuela et al., 1999). A substância proxilina foi isolada do triatomíneo *Rhodnius prolixus* (Ribeiro et al., 1995) que é um anticoagulante que age inibindo o fator VIII da cascata de coagulação.

Mesmo dentro de um grupo estreitamente relacionado existem diferenças quanto ao mecanismo de bloqueio da hemostasia. Nos anofelinos, as substâncias anticoagulantes são direcionadas à trombina, diferindo dos culicíneos em que foram detectadas substâncias salivares direcionadas ao fator de coagulação Xa (Stark & James, 1996). *Culicoides variipennis* também apresenta este fator de coagulação como alvo para bloquear a cascata de coagulação (Perez de Leon et al., 1998).

A ação da saliva no bloqueio da agregação plaquetária

A agregação de plaquetas é mais um empecilho que os insetos hematófagos devem superar. Quando os tecidos dos hospedeiros são lesados, a superfície subendotelial induz a adesão das plaquetas e liberação de vários elementos que produzem a agregação plaquetária, tais como ADP, tromboxano A₂, serotonina e Ca⁺⁺. O ADP é um potente agregador e indutor das secreções das plaquetas, amplificando a agregação plaquetária. Outro meio de liberação destes mediadores pode

ser via fator de agregação plaquetária (PAF) liberado pelos leucócitos, além de outros elementos como a trombina e complexo antígeno-anticorpo (Spector & Axford, 1999). Quando a agregação de plaquetas acontece, o fluxo de sangue pára e, conseqüentemente, o inseto não se alimenta. Para superar este processo fisiológico, os insetos hematófagos adquiriram um componente salivar capaz de bloquear esta agregação. Este componente é uma enzima denominada apirase, e parece estar presente em todos os insetos que se alimentam de sangue (Ribeiro, 1995; Basanova et al., 2002). A apirase age quebrando o ATP e o ADP resultando em AMP (adenosina monofosfato) e fosfato inorgânico, incapazes de agregar as plaquetas.

As concentrações e a atividade da apirase na saliva dos insetos hematófagos são diferentes e estão relacionadas com o hábito hematofágico dentro de cada grupo de artrópode. Os culicídeos são insetos solenófagos e, geralmente, procuram um local ideal para exercer a hematofagia. Neste processo, o mosquito saliva continuamente e as concentrações de apirase auxiliam no sucesso e na velocidade com que o inseto realiza o seu repasto sanguíneo (Ribeiro et al., 1985; Ribeiro, 2000). Desta forma, este papel da apirase é um fator determinante para a capacidade vetorial de um inseto hematófago. Nos insetos telmófagos esta correlação ainda precisa ser bem avaliada.

A quantidade de apirase também pode estar relacionada ao tipo de hospedeiro ao qual o inseto está evolutivamente associado. Nos triatomíneos, a pequena quantidade de apirase na saliva de *Dipetalogaster maximus* (Ribeiro et al., 1998) condiz com o hábito deste triatomíneo de se alimentar em répteis. Isto é sustentável visto que a agregação plaquetária em muitos animais não mamíferos se dá por outros mecanismos que não via ADP (Belamarich et al., 1966), alvo da apirase. Em contrapartida, outros triatomíneos que fazem repasto sanguíneo em animais de sangue quente apresentam quantidades substancialmente maiores de apirase (Ribeiro et al., 1998) e em sua saliva existem moléculas que se ligam ao ADP (Francischetti et al., 2002), inibindo a ação de agregação plaquetária deste nucleotídeo, como o RPAI, encontrada na saliva de *R. prolixus*.

Culex quinquefasciatus parece ter uma relação recente com o homem, já que esta espécie foi mais eficiente em sugar o sangue de aves do que de mamíferos (camundongo e homem), e isto foi baseado na aparente ausência, em sua saliva, de mecanismos antiplaquetários eficientes, em comparação aos outros mosquitos avaliados (*A. albimanus* e *A. aegypti*), que se alimentam de mamíferos e possuem uma quantidade maior de apirase e melhores mecanismos antiplaquetários em sua saliva (Ribeiro, 2000). Reforçando a idéia que *C. quinquefasciatus* têm recente contato com hospedeiro humano, Ribeiro & Francischetti (2001) detectaram uma enzima salivar com ação bloqueadora da agregação das plaquetas, denominada PAF-fosforilcolina-hidrolase, que atua degradando o PAF, elemento muito importante no processo de agregação plaquetária em vários animais não-humanos.

Outros componentes e ações da saliva dos insetos hematófagos

Outras substâncias presentes na glândula salivar dos insetos hematófagos estão ligadas diretamente ao sucesso no processo hematofágico e ao comportamento alimentar do vetor, garantindo a intimidade com o hospedeiro e a possibilidade de transmissão de microorganismos patogênicos.

Alguns componentes encontrados na saliva dos vetores telmófagos *S. vittatum* e *L. longipalpis* apresentam atividade enzimática de hialuronidase (Ribeiro et al., 2000). Esta enzima hidroliza o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, polímeros importantes na constituição do tecido conectivo animal. Desta forma ela abre passagem para outros componentes glandulares que se difundem pelo tecido cutâneo adjacente. Devido a estas propriedades a atividade de hialuronidase parece auxiliar na difusão dos agentes anti-hemostáticos no tecido e garantir o estabelecimento da microhemorragia provocada pela picada, propiciando a estes insetos telmófagos explorarem mais sua fonte sanguínea. Muitas outras espécies de insetos hematófagos possuem, em sua saliva, compostos com atividade enzimática para hialuronidase, como os Diptera telmófagos *Chrysops viduatus* (Tabanidae), *Odagmia ornata* (Simulidae) e *Phlebotomus papatasi* (Psychodidae); no

solenófago *C. quinquefasciatus* (Culicidae) e na pulga *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera). Em outros solenófagos estudados, (*Pediculus humanus*, *R. prolixus*, *Anopheles stephensi*, *A. aegypti*, *Glossina fuscipes* e *Stomoxys calcitrans*), esta atividade não foi detectada, mostrando que a hialuronidase é uma substância relacionada mais ao hábito hematofágico dos insetos telmófagos (Volfova et al., 2008).

As espécies de reduviídeos são criaturas maiores e ingerem mais sangue e, para isto, injetam saliva continuamente ao exercerem a hematofagia (Soares et al., 2006). Para escapar das ações defensivas do hospedeiro, a picada destes insetos muitas vezes se torna imperceptível. Na saliva de *Triatoma infestans* foram detectados compostos com ação inibitória sobre os canais de sódio (Dan et al., 1999) e que tais efeitos são sugeridos de diminuir a geração do potencial elétrico nos nervos, resultando na redução da sensibilidade na região e produzindo uma espécie de anestesia local. Isto contribui para o sucesso da interação destes insetos com seus hospedeiros e certifica a capacidade vetorial dos triatomíneos.

Além de proteínas e gases como o ON, na saliva dos insetos também podem ser encontradas moléculas de natureza lipídica com ação anti-hemostática, como as que ocorrem nas glândulas salivares do triatomíneo *Rhodnius prolixus* (Golodne et al., 2003). Neste caso, a molécula lipídica, denominada lisofosfatidilcolina (LysoPC), impede a agregação plaquetária via PAF e trombina e induz um aumento da produção de ON por células endoteliais em cultura.

A ação imunomoduladora da saliva e a transmissão de patógenos

Vários estudos demonstraram o papel imunoregulador da saliva dos insetos hematofagos sobre a resposta imune do hospedeiro (Gillespie et al., 2000; Norsworthy et al., 2004; Wasserman et al., 2004; Bishop et al., 2006; Caljon et al., 2006; Menezes et al., 2008). Este papel na imunoregulação consiste no fato de que os componentes salivares podem direcionar o destino de uma infecção, através da ação quimiotática, estimulatória ou inibitória sobre as células efetoras do sistema imune e, conseqüentemente, favorecendo ou desfavorecendo a instauração de um dado patógeno que é transmitido durante a hematofagia.

Nas infecções artificiais com espécies de *Leishmania*, costuma-se injetar milhões de parasitas em camundongos para induzir uma infecção. Naturalmente, os insetos hematofagos induzem infecções a partir da injeção, durante a hematofagia, de um número bem menor de parasitas, como por exemplo, de 1 a 100 no caso dos flebotomíneos transmissores da leishmaniose (Warburg & Schlein, 1986). A transmissão natural de *L. major* para camundongos foi simulada, utilizando extrato de glândula salivar do vetor *L. longipalpis*. Quando o parasita foi inoculado juntamente com o extrato salivar, mesmo em pequena quantidade, a infecção foi mais intensa e duradoura em comparação à injeção do parasita sem o extrato salivar (Titus & Ribeiro, 1988). Outros trabalhos têm demonstrado este papel intensificador da saliva de insetos hematofagos nas infecções (Bezerra & Teixeira, 2001; Morris et al., 2001; Norsworthy et al., 2004).

Os vários mecanismos estudados demonstraram que a saliva atua regulando o sistema imune do hospedeiro, através da inibição das atividades celulares envolvidas na resposta inflamatória, como ativação linfocitária, produção de H₂O₂ e ON, fatores celulares microbicidas, e regulação da produção de citocinas (Soares et al., 1998; Titus, 1998; Waitumbi & Warburg, 1998; Wasserman et al., 2004; Caljon et al., 2006; Bishop et al., 2006; Monteiro et al., 2007). Mesmo nas infecções virais, a saliva dos insetos hematofagos pode potencializar o processo de transmissão, através da regulação da resposta imune. A participação da saliva de *A. aegypti* nos experimentos com vírus Sindbis, resultou em uma redução, no local do inóculo, da citocina INF- γ e aumento das citocinas IL-4 e IL-10, em comparação com a injeção só do vírus (Schneider et al., 2004). Similarmente, a produção sistêmica de citocinas foi avaliada a partir de linfócitos esplênicos coletados de camundongos susceptíveis aos flavivírus expostos às picadas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* (Zeidner et al., 1999). Nestes experimentos, foi observado redução de INF- γ e aumento de IL-4 e IL-10, resposta esta que propicia uma infecção viral. Este padrão de resposta imunológica favorece

as infecções virais, o mesmo ocorrendo para outros organismos, como as leishmânias.

Ação quimiotática da saliva dos insetos hematófagos

Além destes efeitos imunomoduladores sobre os macrófagos, a saliva dos insetos hematófagos possuem propriedades quimiotáticas. Esta quimiotaxia poderia estar relacionada pela liberação, induzida pela saliva, de fatores celulares com propriedades de atrair certas células do sistema imune para a área da picada.

Com o uso de câmaras de quimiotaxia contendo uma membrana com microporos, foi demonstrada a ação quimioatraente do extrato salivar dos flebotomíneos *P. papatasi* e *L. longipalpis* para os macrófagos. A observação dos movimentos migratórios das células através dos microporos foi maior quando o estímulo salivar estava presente, comparado à quantificação das células migrantes diante de outros estímulos. Com esta mesma metodologia, foi estudada a ação quimiotática da saliva do mosquito *Anopheles stephensi*, e verificou-se uma maior migração de neutrófilos (Owhashi et al., 2001). Anjili et al. (1995) demonstraram que a saliva de *Phlebotomus duboscqi* foi quimiotática para monócitos peritoniais de camundongos. A molécula anticoagulante simulidina, extraída do conteúdo salivar de *Simulium vittatum*, também apresentou quimiotaxia frente às células macrofágicas (Abebe et al., 1995). Naturalmente, estas células podem incitar uma resposta imune no local da picada através da liberação de moléculas regulatórias capazes de definir as posteriores ocorrências inflamatórias no hospedeiro, exacerbando-as ou inibindo-as.

Os estudos utilizando o bolsão inflamatório mostraram haver uma grande quantidade de macrófagos nos líquidos extraídos de camundongos tratados com a saliva (Silva, 2002; Teixeira et al., 2005). Teixeira et al. (2005) observaram, frente ao estímulo com a saliva de *L. longipalpis*, que em animais susceptíveis à infecção por espécies de *Leishmania* a quantidade de macrófagos no líquido do bolsão inflamatório foi bem expressiva em relação aos animais resistentes à infecção. Estes autores avaliaram e constataram que a participação de moléculas quimioatraentes foi induzida pela saliva do flebotomíneo, com conseqüente recrutamento das células macrofágicas. Este fator quimiotático é de grande importância para os parasitas intracelulares, como as espécies de *Leishmania*, que precisam ingressar nas células fagocíticas e escapar das ações eliminatórias do meio extracelular. Quanto mais macrófagos presentes no local da picada do vetor, maiores são as chances de um parasita intracelular se estabelecer e iniciar uma infecção.

Resposta celular e humoral pela contínua exposição à saliva

Outra descoberta importante nos estudos da regulação da resposta imune pela saliva dos insetos hematófagos, é que a contínua exposição de animais de experimentação aos componentes salivares foi capaz de neutralizar o efeito intensificador das infecções pela saliva, relatado anteriormente, resultando em infecções menos severas. Qualquer que seja a via de inoculação dos elementos salivares, artificial ou natural via picada do inseto, o efeito foi protetor contra as infecções (Belkaid et al., 1998; Kamhawi et al., 2000; Morris et al., 2001).

Animais de laboratório infestados por piolhos e pulgas mostram que a contínua exposição a estes artrópodes hematófagos produz uma inflamação no local da hematofagia capaz de diminuir a infestação dos ectoparasitas em seus hospedeiros produzindo resistência ao ectoparasitismo (Beinjamin et al., 1961; Larrivve et al., 1964; Askenase, 1977; Nelson et al., 1979; Brown & Askenase, 1982; Brown et al., 1983).

Nos experimentos com camundongos continuamente expostos a picadas de *L. longipalpis*, foi verificado um aumento no número de células inflamatórias no local onde estes insetos exerceram a hematofagia (Silva et al., 2005), principalmente neutrófilos e macrófagos. Do mesmo modo, em modelos animais infectados com *L. chagasi*, a prévia imunização com proteínas salivares do vetor *L. longipalpis* produziu um resposta celular tardia com produção de citocinas INF- γ e de ON (Gomes et al., 2008). INF- γ e NO são importantes elementos na ativação de células fagocíticas, sendo que a prévia exposição e a resposta celular observada foram decisivos em conferir intensa

proteção dos modelos animais contra um progresso fatal da infecção por *L. chagasi* (Gomes et al., 2008). A presença das células inflamatórias pode ser um empecilho para a sobrevivência dos parasitas transmitidos durante a hematofagia, estando estas células envolvidas na redução da carga parasitária no início da infecção.

Alem das células, a prévia exposição da saliva pode induzir a produção de anticorpos específicos contra as substâncias salivares, caracterizando o poder imunogênico da saliva dos insetos hematófagos. Os estudos experimentais com camundongos demonstram a presença dos anticorpos anti-saliva após pré-exposição dos animais às picadas de flebotomíneos (Belkaid et al., 1998; Ghosh & Mukhopadhyay, 1998; Volf & Rohousová, 2001; Silva et al., 2005), mosquitos (Chen et al., 1998; Ohtsuka et al., 2001) e borrachudos (Cross et al., 1993). Em população de áreas endêmicas para a leishmaniose visceral, foram detectados anticorpos IgG específicos aos componentes salivares do vetor *L. longipalpis* (Barral et al., 2000). Palosuo et al. (1997) detectaram, por immunoblotting, alteração sazonal dos níveis de anticorpos anti-saliva em população expostas às picadas de *Aedes communis*, sendo maiores os níveis séricos após a época de proliferação dos mosquitos.

Remoue et al. (2006) avaliaram a resposta humoral em crianças de áreas malarígenas ao extrato salivar do vetor *Anopheles gambiae*. A detecção dos anticorpos IgG anti-saliva foi correlacionada aos achados clínicos da malária na população estudada, onde os níveis foram maiores nas crianças que apresentavam malária clínica. Observaram também que os níveis de anticorpos foram positivamente relacionados ao grau de exposição da população aos mosquitos, quanto mais expostos, maiores os níveis. Estes estudos, assim como o de Barral et al. (2000), aventam a possibilidade dos compostos salivares serem utilizados como marcadores imunológicos e epidemiológicos para identificar populações em risco de exposição às doenças transmitidas por insetos hematófagos.

Em vários animais expostos à picada de espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, foi detectada a produção de anticorpos especificamente direcionados para cada espécie de inseto estudada (Volf & Rohousová, 2001), mostrando que os componentes salivares são capazes de excitar, no hospedeiro, a produção de anticorpos correspondente à saliva da respectiva espécie. Neste contexto, o maxadilán, molécula vasodilatadora encontrada na saliva do flebotomíneo *L. longipalpis*, também é especificamente imunogênica. Em animais de laboratório e domésticos e em humanos de área endêmica para *L. longipalpis*, as exposições a este vetor induziram a produção de anticorpos anti-maxadilán da classe IgG (Milleron et al., 2004). Estes autores também estudaram e detectaram variações moleculares dentro de uma simples população de flebotomíneo e tais variações se refletiram nos testes de imunogenicidade, onde as seqüências mais variáveis da molécula foram as mais imunogênicas e, ainda, cada variação induziu uma resposta específica nos hospedeiros estudados (Milleron et al., 2004).

A contínua exposição de animais de experimentação à saliva do flebotomíneo *L. longipalpis* induziu uma elevada produção de anticorpos da classe IgG e sub-classe IgG1 (Silva et al., 2005). Outros estudos concernentes à imunogenicidade da saliva dos insetos hematófagos têm demonstrado que os anticorpos produzidos a partir de exposições contínuas podem induzir a morte do inseto vetor, quando este ingurgita o sangue juntamente com os anticorpos anti-saliva encontrado no hospedeiro. Isto foi demonstrado por Ghosh & Mukhopadhyay (1998) com a espécie *Phlebotomus argentipes* alimentada em hamsters pré-expostos ao flebotomíneo ou artificialmente utilizando membrana com soro do hamster previamente sensibilizado com os elementos salivares de *P. argentipes*.

Os anticorpos podem ainda comprometer a sobrevivência dos microorganismos naturalmente transmitidos durante a hematofagia, através da neutralização da ação imunoreguladora da saliva, relatada no tópico anterior, permitindo a eliminação dos parasitas pelas ações microbicidas dos macrófagos (Belkaid et al., 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conteúdo bioquímico das glândulas salivares está envolvido direta ou indiretamente no êxito de uma infecção mediante suas propriedades imunomoduladoras ou quimiotática, mostradas acima.

A capacidade vetorial relaciona-se com parâmetros ecológicos, comportamentais e fisiológicos dos insetos, tais como preferência por hospedeiro, número de repastos sangüíneos, ciclo gonotrófico, densidade populacional, longevidade e sucesso hematofágico. Estes parâmetros facultam o inseto a entrar em contato com algum tipo de microorganismo, permitindo a sua infecção. O sucesso da grande maioria dos parasitos transmitidos pelos insetos hematofagos depende da eficiência dos mecanismos empregados para alcançar o hospedeiro vertebrado e executar o repasto sangüíneo. Neste contexto, o conteúdo salivar é importante na determinação da capacidade vetorial, visto que a presença ou até a quantidade de uma dada substância são necessárias para que um vetor consiga ter sucesso em realizar o repasto sangüíneo sobre um hospedeiro vertebrado e assim favorecer os mecanismos de transmissão.

Os microorganismos patogênicos intracelulares quando alcançam o hospedeiro via hematofagia precisam ser endocitados por células fagocíticas, como os macrófagos, a fim de evitar o ambiente extracelular nocivo. Quanto mais células fagocíticas estiverem no local e menos eficientes forem elas no combate aos parasitos endocitados, mais chances terão estes microorganismos de se multiplicar e infectar outras células. É neste contexto que a saliva dos insetos hematofagos pode favorecer e intensificar as infecções, atraindo mais macrófagos para o local de entrada dos patógenos e reduzindo as atividades microbicidas destas células, produzindo, assim, um ambiente adequado à multiplicação dos microorganismos endocitados. Outras células da resposta imunológica podem ser também reguladas pela ação da saliva, como os linfócitos T. Estas células secretam citocinas que podem estimular a ação das células inflamatórias e determinar o curso da resposta imune.

A presença de anticorpos anti-saliva induzidos pelo hospedeiro e do papel da saliva na regulação da resposta imune mostra que as substâncias salivares podem ser fortes candidatos à produção de possíveis canais de imunização. Para isto é necessário conhecer quais são os elementos da saliva que estão efetivamente induzindo a geração destes anticorpos e a resposta celular no hospedeiro. Neste contexto, as análises proteômicas do conteúdo salivar constituem um ponto de partida para os estudos de interação molecular entre vetor e parasita, propiciando um valioso conhecimento acerca dos mecanismos de transmissão envolvendo os arbopatógenos, e assim constituindo um alvo poderoso para a interceptação das cadeias de transmissão das doenças propagadas pelos insetos hematofagos.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, M.; CUPP, M.S.; CHAMPAGNE, D.; CUPP, E.W. Simulidin: a black fly (*Simulium vittatum*) salivary gland protein with anti-thrombin activity. **Journal of Insect Physiology**, 41: 1001-1006, 1995.
- ABEBE, M.; RIBEIRO, J; Cupp, M.; Cupp, E. Novel anticoagulant from salivary glands of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor V. **Journal of Medical Entomology**, 33: 173-176, 1996.
- ANDERSEN, J.F.; MONTFORT, W.R. The crystal structure of nitrophorin 2. **The Journal Biological Chemistry**, 275: 30496-30503, 2000.
- ANDRADE, B.B.; TEIXEIRA, C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77: 665-693, 2005.
- ANJILI, C. *et al.* The chemostatic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, 60: 97-100, 1995.

- ASKENASE, P.W. Immune inflammatory response to parasites: the role of basophils, mast cells and vasoactive amines. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 26: 97-103, 1977.
- BARRAL, A. *et al.* Human immune response to sandfly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 62: 740-745, 2000.
- BASANOVA, A.V.; BASKOVA, I.P.; ZAVALOVA, L.L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry**, 67: 143-50, 2002.
- BEINJAMIN, E.; FEINGOLD B.; KARTMAN, L. Skin reactivity in guinea pigs sensitized to flea bites: the sequence of reactions. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, 108: 700-702, 1961.
- BELAMARICH, F.; FUARI, M.; SHEPRO, D; KIEN. M. In vitro studies of aggregation of non-mammalian thrombocytes. **Nature**, 212: 1579-1580, 1966.
- BELKAID, Y. *et al.* Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effect of vector saliva and saliva pre-exposure on the long term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **Journal of Experimental Medicine**, 188: 1941-1953, 1998.
- BEZERRA, H.S.; TEIXEIRA, M.J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Balb/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96: 349-351, 2001.
- BISHOP, J.V.; MEJIA, J.A.; PEREZ DE LEÓN, A.A.; TABACHNICK, WJ.; TITUS, R.G. Salivary gland extracts of *Culicoides sonorensis* inhibit murine lymphocyte proliferation and NO production by macrophages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75: 532-536, 2006.
- BROWN, S.J.; WORMS, M.J.; ASKENASE, P.W. Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). IV. Differences in blood basophil kinetics in hosts parasitized by ixodid and argasid ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 32: 897-902, 1983.
- BROWN, S.J; ASKENASE, P.W. Blood eosinophil and basophil response in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 31: 593-598, 1982.
- CALJON, G.; ABBEELE, J.V.D; STIJLEMANS, B.; COOSERMANS, M.; BAETSELIER, P.; MAGEZ, S. Tsetse fly saliva accelerates the onset of *Trypanosoma brucei* infection in mouse model associated with a reduced host inflammatory response. **Infection and Immunity**, 74: 6324-6330, 2006.
- CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: UFPR, 1991, 228p.
- CHAMPAGNE, D.E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiology and Haemostasis and Thrombosis**, 34: 221-227, 2005.
- CHAMPAGNE, D.E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitology Today**, 10: 430-433, 1994.
- CHAMPAGNE, D.E.; RIBEIRO, J.M.C. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 91: 138-142, 1994.
- CHEN, Y.L.; SIMONS, F.E.R.; PENG, Z. A mouse model of allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclasses responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and IFN-g production. **International Archives of Allergy and Immunology**, 116: 269-277, 1998.
- CROSS, M.; CUPP, M.; CUPP, E.; GALLOWAY, A.; ENRIQUEZ, F. Modulation of immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae).

Journal of Medical Entomology, 30: 928-935, 1993.

CUPP, M.; ZHANG, D.; CUPP, E. Horn fly (Diptera: Muscidae) saliva targets thrombin action in hemostasis. **Journal of Medical Entomology**, 37: 416-421, 2000.

CUPP, M.S.; RIBEIRO, J.M.C.; CUPP, E.W. Vasodilative activity in Black fly salivary glands. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50: 241-246, 1994.

DAN, A.; PEREIRA, M.; PESQUERO, J.; DIOTAIUTI, L.; BEIRÃO, P.S. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. **Journal of Medical Entomology**, 36: 875-879, 1999.

FRANCISCHETTI, I.M.; ANDERSEN, J.F.; RIBEIRO, J.M. Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet inhibitor I as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. **Biochemistry**, 41: 3810-3818, 2002.

GHOSH, K.; MUKHOPADHYAY, J. The effect of antisaliva antibodies on *Plhebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. **International Journal of Parasitology**, 28: 275-281, 1998.

GILLESPIE, R.; MBOW, M.; TITUS, R. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite immunology**, 22: 319-331, 2000.

GOLODNE, D.M.; MONTEIRO, R.Q.; GRAÇA-SOUZA, A.V.; SILVA-NETO, M.A.C.; ATELLA, G.C. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 278: 27766-27771, 2003.

GOMES, R. *et al.* Immunity to a salivary protein of a sandfly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, 105: 7845-7850, 2008.

GORDON, R.; CREWE, W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 42: 335-356, 1952.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, 290: 1351-1354, 2000.

KAZIMÍROVÁ, M.; SULANOVÁ, M.; KOZÁNEK, M.; TAKAC, P.; LABUDA, M.; NUTTALL, P.A. Identification of anticoagulant activities in salivary gland extracts of four horsefly species (Diptera, Tabanidae). **Haemostasis**, 31: 294-305, 2001.

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 *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, 266: 11234-11236, 1991.

MENEZES, M.J. *et al.* Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BMC Immunology**, 9: 2008.

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 97-129.

MILLERON, R.S. *et al.* Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70: 286-293, 2004.

MONTEIRO, M.C. *et al.* Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocytes migration induced by *Leishmania major*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,

76: 88-94, 2007.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **Journal of Immunology**, 167: 5226-30, 2001.

NELSON, W.A.; BELL, J.F.; STEWART, S.J. *Poliplax serrata*: cutaneous cytologic reaction in mice that do (CFW strain) and do not (C57BL strain) develop resistance. **Experimental Parasitology**, 48: 259-264, 1979.

NEVA, F.A.; PONCE, C.; PONCE, E.; KREUTZER, R.; MODABBER, F.; OLLIARO, P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 91: 473-475, 1997.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2005, 524p.

NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, 72: 1240-1247, 2004.

NOYES, H.; CHANCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in Honduras. **Experimental Parasitology**, 85: 264-273, 1997.

OHTSUKA, E. *et al.* Roles of mast cells and histamine in mosquito bite-induced allergic itch-associated responses in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, 86: 97-105, 2001.

OWHASHI, M.; HARADA, M.; SUGURI, S.; OHMAE, H.; ISHII, A. The role of saliva of *Anopheles stephensi* in inflammatory response: identification of a high molecular weight neutrophil chemotactic factor. **Parasitology Research**, 87: 376-382, 2001.

PALOSUO, K.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; MIKKOLA, J.; SAHI, T.; REUNALA, T. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquitoes bites. **International Archives of Allergy and Immunology**, 114: 367-372, 1997.

PEREZ DE LEON, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; TABACHNICK, W.J.; VALENZUELA, J.G. Identification of a salivary vasodilator in the primary North American vector of bluetongue viruses, *Culicoides variipennis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 57: 375-371, 1997.

PEREZ DE LEÓN, A.A.; VALENZUELA, J.G.; TABACHNICK, W.J. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an inhibitor of factor Xa. **Experimental Parasitology**, 88: 131-138, 1998.

PONCE, C. *et al.* *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. **The Lancet**, 337: 67-70, 1991.

RAJSKÁ, P. *et al.* Vasodilatory activity in horsefly and deerfly salivary glands. **Medical and Veterinary Entomology**, 17: 395-402, 2003.

REMOUE, F. *et al.* Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100: 363-370, 2006.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 350p.

RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Disease**, 4: 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic

- activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Medical and veterinary Entomology**, 14: 142-148, 2000.
- RIBEIRO, J.; CHARLAB, R.; ROWTON, E.; CUPP, E. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. **Journal of Medical Entomology**, 37: 743-747, 2000.
- RIBEIRO, J.; NUSSENZVEIG, R.; TORTORELLA, G. Salivary vasodilators of *Aedes triseriatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, 31: 747-753, 1994.
- RIBEIRO, J.; SCHEIDER, M.; ISAIAS, T.; JUBERG, J.; GALVÃO, C.; GUIMARÃES, J. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, 35: 599-610, 1998.
- RIBEIRO, J.M. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Experimental Biology**, 165: 61-71, 1992.
- RIBEIRO, J.M.; ROSSIGNOL, P.A.; SPIELMAN, A. Salivary gland apirase determines probing time in anopheline mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, 31: 689-692, 1985.
- RIBEIRO, J.M.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of proxilín S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemistry Journal**, 308: 243-249, 1995.
- RIBEIRO, J.M.C.; FRANCISCHETTI, I.M.B. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary gland and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Experimental Biology**, 204: 3887-3894, 2001.
- RIBEIRO, J.M.C.; FRANCISCHETTI, I.M.B. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Experimental Biology**, 204: 3887-3894, 2001.
- RIBEIRO, J.M.C.; NUSSENZVEIG, R.H. The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. **The Journal of Experimental Biology**, 179: 273-287, 1993.
- RICHARDS, O.W.; DAVIES, R.G. **Tratado de entomologia Imms**. Clasificación y Biología. Barcelona: Ediciones Omega, V. II, 1984, 998p.
- ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, 53: 161-171, 2006.
- ROSS, H.H. **Introducción a la entomología general y aplicada**. Barcelona: Ediciones Omega, 1982, 536p.
- SCHNEIDER, B.S.; SOONG, L.; ZEIDNER, N.S.; HIGGS, S. *Aedes aegypti* salivary glands extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to Sindbis virus infection. **Viral Immunology**, 17: 565-573, 2004.
- SILVA, F.S. **Efeito da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) sobre a resposta inflamatória em camundongos BALB/C**. 2002. 69p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia.
- SILVA, F.S. *et al.* Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72: 94-98, 2005.
- SOARES, A.C.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N.F.; DOS SANTOS, V.C.; TEIXEIRA, M.M.; PEREIRA, M.H. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Triatominae) in mouse skin. **Journal of Insect Physiology**, 52: 468-472, 2006.

- SOARES, M.B.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibit TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **Journal of Immunology**, 160: 1811-1816, 1998.
- SPECTOR, T.D.; AXFORD, J.S. **An introduction to general pathology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999, 391p.
- STARK, K.R.; JAMES, A.A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 20802-20809, 1998.
- TAKÁČ, P. *et al.* Vasotab, a vasoactive peptide from horse *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. **The journal of Experimental Biology**, 209: 343-352, 2006.
- TEIXEIRA, C.R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **The Journal of Immunology**, 175: 8346-8353, 2005.
- TITUS, R.; RIBEIRO, J. Salivary glands lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, 239: 1306-1308, 1988.
- TITUS, R.G. Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells *in vivo* and concanavalin A *in vitro*. **Experimental Parasitology**, 89: 133-136, 1998.
- VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; RIBEIRO, J.M. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. **Biochemistry**, 38: 11209-11215, 1999.
- VALENZUELA, J.G.; WALKER, F.A.; RIBEIRO, J.M.C. A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying-hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. **The Journal of Experimental Biology**, 198: 1519-1526, 1995.
- VOLF, P.; ROHOUSOVÁ, I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitology**, 122: 37-41, 2001.
- VOLFOVA, V.; HOSTOMSKA, J.; CERNY, M.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on *Leishmania* infection in mice. **PLoS Neglected Tropical Disease**, 2: e294, 2008.
- WAITUMBI, J.; WARBURG, A. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. **Infection and immunity**, 66: 1534-1537, 1998.
- WASSERMAN, H.A.; SINGH, S.; CHAMPAGNE, D.E. Saliva of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* modulates murine lymphocytes function. **Parasite Immunology**, 26: 295-306, 2004.
- WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.; TITUS, R.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 345: 223-230, 1994.
- WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 35: 926-930, 1986.
- YIN, H.; NORRIS, H.; LANZARO, G. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. **Insect and Molecular Biology**, 9: 309-314, 2000.

ZEIDNER, N.S.; HIGGS, S.; HAPP, C.M.; BEATY, B.J.; MILIER, B.R. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. **Parasite Immunology**, 21: 35-44, 1999.