

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS EN GLÁNDULAS SALIVALES  
DE *Lutzomyia ayrozai* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

NÉSTOR EDUARDO CEPEDA OLAVE

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2012

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS EN GLÁNDULAS SALIVALES  
DE *Lutzomyia ayrozai* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

NÉSTOR EDUARDO CEPEDA OLAVE

Trabajo de grado presentado para optar al título de  
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Director:

Gerardo Muñoz Mantilla

PhD., Docente titular Escuela de Medicina

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA

2012

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia por su permanente y definitivo apoyo para el logro de cada etapa que he emprendido. En el vínculo fraterno que me une a ellos está representada la energía divina que siempre me ha acompañado y de la que siempre estaré agradecido. Parte del aliciente a culminar de este proceso lo dedico a mi mamá Gloria Nelly y a Carlos Andrés que aunque ausentes han forjado en mí el deseo de concretar sueños que compartí con ellos, de quienes siempre recibí el consejo de la perseverancia, actitud que seguiré madurando, en su honor para alcanzar mis más grandes anhelos.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a todos los que participaron en el desarrollo de este proceso, familia amigos y compañeros que contribuyeron de una u otra manera a culminar las labores de este estudio, primordialmente a mi familia por toda la fuerza que me dio durante estos años. En el estudio de campo tengo que agradecer a la familia Ardila Salamanca por su apoyo y hospitalidad durante mi estadía, de la misma manera que a la familia Muñoz Rueda por su permanente asistencia y soporte al desarrollo de este estudio en la estación experimental de campo.

Al doctor Gerardo Muñoz Mantilla por su acompañamiento y paciencia en un proceso que sin lugar a dudas heredó en mi memoria muchas enseñanzas que han forjado el camino que voy trazando en mi vida profesional.

Además el agradecimiento lo hago extensivo al grupo de Investigación en Bioquímica y microbiología GIBIM en cabeza del Dr., Rodrigo Torres y la Dra. Claudia Ortiz, por su acompañamiento y su valioso aporte a la obtención de los resultados de este estudio. Igualmente al personal de varios laboratorios de la UIS, al laboratorio de parasitología en la facultad de salud y en el laboratorio de patología al señor Isaías Duarte por su apoyo técnico en el procesamiento de algunas muestras.

Mil gracias a la madre naturaleza.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Lutzomyia ayrozai</i> .....	15
2.2 Generalidades sobre homeostasia ante la lesión vascular.....	15
2.3 Mecanismos desarrollados por insectos que contrarrestan la acción hemostática .....	17
2.3.1 Proteínas que bloquean en la agregación plaquetaria .....	17
2.3.2 Moléculas Vasodilatadoras .....	18
2.3.3 Anticoagulantes salivales.....	20
3. OBJETIVOS.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	26
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1. Área de estudio.....	27
5.2 Estudio entomológico .....	27
5.3 Técnicas de laboratorio .....	31
5.3.1 Cuantificación y electroforesis de proteínas por PAGE.....	31
5.3.2 Análisis por western Blot .....	32
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Estudio entomológico.....	34
6.2 Separación de glándulas salivales .....	36
6.3 Análisis de proteínas de glándulas salivales .....	38

6.3.1	Electroforesis SDS-PAGE.....	38
6.3.2	Análisis por Western Blot.....	40
7.	DISCUSIÓN.....	43
8.	CONCLUSIONES.....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	51

## RESUMEN

**Título:**

Identificación de proteínas antigénicas en glándulas salivales de *Lutzomyia ayroza* (Diptera: Psychodidae)\*

**Autor:**

Néstor Eduardo Cepeda Olave\*\*

**Palabras Claves:**

*Lutzomyia*, glándulas salivales, proteínas antigénicas.

**Descripción:**

La saliva de los artrópodos hematófagos manifiesta respuesta ante los sistemas hemostáticos de los hospederos generando una interacción entre las moléculas que actúan en ambos sentidos. Las proteínas salivales de los flebótomos tiene propiedades hemostáticas, inflamatorias e inmuno moduladoras. Este estudio fue desarrollado mediante el procesamiento de glándulas salivales de *Lu. ayrozai* en una estación experimental de campo en zona rural de Santander, Colombia con especímenes de procedencia silvestre procesados 4 días después de su captura. Del lisado de glándulas salivales se logró obtener fracciones proteicas mediante electroforesis de proteínas SDS PAGE registrando bandas de 64, 60, 53, 48, 36, 32, 29, 20, 16 kDa. Éstas posteriormente se sometieron a Western blot donde se consiguió establecer algunos antígenos de 64, 60, 53, 48, 32, 16 kDa. conjugados con sueros de perros (*Canis familiaris*) infectados y no infectados con *Leishmania* spp. Posteriormente en un análisis presuntivo éstas proteínas se pudieron asociar a otras moléculas salivales obtenidas en estudios anteriores, algunas de las cuales parecen tener relevancia durante la transmisión de microorganismos patógenos, convirtiéndose en moléculas que pueden ser investigadas a futuro, estableciendo una completa caracterización química y así indagar el rol epidemiológico y los usos potenciales a nivel farmacológico a que haya lugar.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Salud – Escuela de Medicina – Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas – Director MUÑOZ MANTILLA, Gerardo.

## SUMMARY

**Title:**

Identification of antigenic proteins from the salivary gland of the Sand fly *Lutzomyia ayroza* (Diptera: Psychodidae)\*

**Author:**

Néstor Eduardo Cepeda Olave\*\*

**Keywords:**

*Lutzomyia*, salivary glands, antigenic proteins.

**Description:**

The saliva of bloodsucking arthropods responds to the hemostatic systems of the hosts by generating an interaction between molecules that act in both ways. Salivary proteins of sandflies have hemostatic, inflammatory and immune modulating properties. The salivary glands of wild *Lutzomyia ayrozai* specimens were processed 4 days after capture in a research station in a rural area of Santander, Colombia. Salivary gland protein fractions were obtained by SDS PAGE recording bands of 64, 60, 53, 48, 36, 32, 29, 20 and 16 kDa. Subsequently, western blot analysis found antigens of 64, 60, 53, 48, 32 and 16 kDa. Conjugated white antibodies from dogs infected with *Leishmania* spp.

Proteins identified in this study may relate to salivary molecules obtained in previous studies, some of which may have relevance in the transmission of pathogenic microorganisms, further research on these molecules, concerning chemical characterization for pharmacological uses, may find the basis to attenuate the impact of such microorganisms.

---

\* Thesis

\*\* Faculty of Health – School of Medicine – Mastery in Basic Medical Science – Director MUÑOZ MANTILLA, Gerardo.

## INTRODUCCIÓN

Los Dípteros hematófagos han generado un complejo salival con proteínas biológicamente activas, que contrarrestan la homeostasis y la reacción inflamatoria de los hospederos vertebrados. Estos no logran dirigir una respuesta inmune adecuada contra las proteínas expuestas al momento de la picadura (Belkaid *et al.*, 2000), algunas de las cuales tiene además actividad anticoagulante, anti plaquetarias y vasodilatadora. Se han separado proteínas biológicamente activas de saliva de *Lutzomyia (Lu.) longipalpis*, *Phlebotomus (Ph.) papatasi*, *Cimex lectularius*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Rhodnius (R.) prolixus* entre otros. Esto ha permitido el diseño de fármacos como el derivado de la proteína “maxadilan”, usado en el tratamiento de vasoconstricción periférica (Valenzuela *et al.*, 2001; Lerner *et al.*, 1991), o la producción de vacunas tipo cDNA que dificultan la transmisión de *Leishmania* spp. (Anderson *et al.*, 2006; Valenzuela *et al.*, 2001).

Las dificultades en la separación de las proteínas desde glándulas salivales de flebótomos, incluyen las maniobras de disección, la cantidad de proteínas por individuo y el mantenimiento de colonias. En consecuencia la mayor fuente de información la proporciona *Lutzomyia longipalpis* que de fácil colonización, pero se desconoce lo que pasa en especies vectoras importantes en centro y sur América, como *Lutzomyia trapidoi*, cuya colonización ha resultado imposible. En el presente trabajo se propone un mecanismo para abordar dichas especies de difícil manejo, mediante el uso de un modelo que logre colectar en campo para aislamiento de glándulas sin necesidad de colonización. La especie *Lu. ayrozai* se encuentra en reservas ecológicas cercanas a los laboratorios de experimentación, de la Universidad Industrial de Santander en la ciudad de Bucaramanga, que en experimentos previos ha demostrado su abundancia durante todo el año. Los experimentos consisten en separación de proteínas por electroforesis y la determinación de su papel antigénico en el perro.

## 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El perro doméstico (*Canis familiaris*) ha sido incriminado como reservorio de *Leishmania (Le.) panamensis* y *Le. braziliensis* potenciando el riesgo de transmisión intradomiciliaria (Reithinger *et al.*, 1999; Dantas-T *et al.*, 2009, Muñoz, 2006). La utilización de péptidos inmunogénicos presentes en saliva de *Lutzomyia* spp ha sido utilizado en el control del ciclo doméstico en dos vías: i) como marcadores de exposición de los reservorios al vector (Schwarz *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2006) y ii) uso de vacunas tipo cDNA contra proteínas en la saliva que facilitan la infección de los parásitos inoculados al momento de la picadura (Valenzuela *et al.*, 2001, 2004; Clements *et al.*, 2010). En Colombia no hay desarrollos en ninguna de estas vías y el control de la patología en el humano se basa en el diagnóstico oportuno y el tratamiento inmediato. No existen lineamientos de control de reservorios para impactar la transmisión doméstica y persisten los problemas relacionados con escasos y efectos colaterales del fármaco.

La mayoría de los trabajos se han desarrollado en Estados Unidos en saliva de *Lu. longipalpis*, que es un modelo de fácil colonización, lo que no ha estimulado el intento con especies de difícil mantenimiento en el laboratorio como *Lu. trapidoi* (Chaniotis 1974, 1986). Esta especie es el vector de *Le. panamensis* en centro y sur América, que no se ha logrado colonizar de manera permanente y su comportamiento en ecótopos intervenidos se conoce parcialmente (Chaniotis 1986). La mayoría de los focos de transmisión de dicho parásito en Colombia están situados en zonas remotas, de difícil acceso y con problemas de orden público. En un trabajo previo en la zona de Borrascoso-Opón en el Magdalena Medio la especie se incriminó como vector y su abundancia se encontró directamente proporcional a la cantidad de bosque rodeando cultivos de cacao y habitaciones humanas. La caracterización de las proteínas salivales de *Lu. trapidoi* permitiría la

formulación de vacunas cDNA para controlar la transmisión doméstica de *Le. panamensis*. Cualquier estudio que se emprenda tendría que contar con una infraestructura en campo en zonas remotas que permitiera capturarla continuamente dada la dificultad de su colonización. Se tendría que contar con pruebas estandarizadas para la identificación de las proteínas y se tendrían que tener una concentración de proteínas apropiada para las pruebas inmunogénicas usando sueros de reservorios domésticos. Ninguna de las anteriores condiciones está dada actualmente y se requiere de la estandarización de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados.

En el presente proyecto se indaga sobre la posibilidad de estandarizar los métodos usando una especie abundante, presente en áreas cercanas a los laboratorios de experimentación que permita resolver las siguientes preguntas:

1. Es posible usar ejemplares capturados en campo en lugar de ejemplares de colonia para investigación en proteínas de saliva?
2. La concentración de proteínas extraída de glándulas salivales de ejemplares capturados en campo es homogénea?
3. El desconocimiento de la edad del ejemplar capturado en campo que podría alterar la concentración de proteínas se puede atenuar dejando los ejemplares enjaulados cierto número de días posterior a la captura?
4. Es posible determinar la antigenicidad de las proteínas usando ejemplares de campo en lugar de colonizados?
5. Es posible usar tinciones poco costosas para la detección de proteínas inmunogénicas.
6. Cuál es el valor del western blot para la detección de la inmunogenicidad.
7. Qué diferencia existe en el perfil antigénico de perros domésticos infectados y no infectados con *Leishmania* spp.
8. *Lutzomyia ayrozai*. se constituye en un modelo para la estandarización de métodos y permitiría explorar su contenido proteico para futuros usos

usando la misma especie o especies de comportamiento similar como *Lutzomyia trapidoi*?

Hipótesis: La utilización de sueros de perros domésticos infectados y no infectados por *Leishmania spp*, permitiría saber si la antigenicidad de las proteínas presentes en saliva, tiene perfiles diferentes en los dos grupos. En caso de encontrarse una proteína antigénica exclusivamente en perros no infectados, se podría establecer su utilidad como modelo experimental en el diseño de vacunas tipo cDNA útil en leishmaniasis cutánea. Los resultados se obtuvieron en *Lu. ayrozai* del municipio de El Playón, pero por compartir nichos con *Lu. trapidoi*, se asume que los perros domésticos de donde provienen los sueros (municipio de Landázuri) han estado también expuestos a su picadura.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Lutzomyia ayrozai*

Los insectos hematófagos del género *Lutzomyia* (*Lu*) son un grupo de dípteros pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae con varias especies en el Caribe, centro y sur América. *Lu. ayrozai* se presenta en Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Guayana Francesa, Trinidad y Tobago, Perú, Bolivia y Brasil (Young & Duncan, 1994; Rangel & Lainson, 2003). En Colombia ha sido reportada en 13 departamentos: Amazonas, Antioquia, Boyacá, Caquetá, Cauca, Chocó, Vichada, Guainía, Meta, Nariño, Putumayo, Risaralda, Santander y Valle del Cauca (Viveros *et al.*, 2009; Galatti, 2009; Bejarano, 2006; Sandoval *et al.*, 2006). *Lu. ayrozai* es una especie antropofílica abundante en los meses soleados y húmedos y con una actividad de picadura que comienza en el crepúsculo vespertino y se extiende hasta avanzadas horas de la noche (17:00 y 24:00 horas) picando preferiblemente a nivel del suelo (Rangel & Lainson, 2003).

Esta especie fue encontrada infectada con *Le. (Vianna) naiffi* y *Le. (Vianna) braziliensis* en Brasil (Lainson & Shaw, 1989, Killick-Kendrich, 1990) y en Bolivia se reportó como vector de *Le. (Vianna) braziliensis* (Killick-Kendrich, 1999). Su principal hospedero silvestre es el armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Lainson *et al.*, 1994; Shaw, 2007), pero algunos animales domésticos y el hombre pueden estar involucrados como hospederos en asentamientos humanos de zonas endémicas.

### 2.2 Generalidades sobre homeostasia ante la lesión vascular

La conducta hematofágica de los flebotomos está dirigida a la obtención de proteínas sanguíneas esenciales para el desarrollo de sus huevos. Causa una leve lesión vascular que desencadena una actividad hemostática activando

mecanismos de vasoconstricción, agregación plaquetaria, fibrinólisis y coagulación (Fernandez, 2001). Al producirse la lesión vascular se libera norepinefrina que causa vasoconstricción, mediada por la acción de componentes vaso activos tipo serotonina y tronboxano A<sub>2</sub> (Fernandez, 2001), contenidos en las plaquetas y se estimulan al contacto con el colágeno endotelial. Actúan otros vasoconstrictores como endotelina y reguladores del tono vascular como bradiquininas, fibrinopéptidos B y óxido nítrico. La activación plaquetaria origina un tapón hemostático temporal por ruptura de su glicocálix y emisión de numerosos pseudópodos que les permite enlazarse entre sí para formar un trombo plaquetario (Fernandez, 2001). El factor de adhesión plaquetaria Von Willebrand, de origen endotelial, permite mayor adhesión de las plaquetas y contribuye a contener la pérdida de sangre. Éste mismo factor también es secretado a la circulación donde desencadena la actividad de varias moléculas y factores de la coagulación (Viso y Lopez, 2001).

La coagulación se origina en un proceso paralelo al plaquetario a partir de la liberación del factor tisular III (tromboplastina tisular) y Factor XII (Hageman), que activan la formación de trombina a partir de protrombina, en una cascada procedente de dos vías estimuladas por la lesión vascular. Una vía es permanente y lenta, altamente regulada, activada por el factor XII por contacto con el colágeno endotelial (vía intrínseca) y la vía extrínseca que ocurre únicamente cuando se produce ruptura de un vaso y entra en contacto el factor VII con factor III (proteína del subendotelio). Las dos vías activan la trombina, enzima proteolítica que actúa sobre el fibrinógeno del plasma sanguíneo, formando monómeros de fibrina con cargas positivas y negativas que terminan uniéndose y conformando una red, donde son atrapados los glóbulos rojos en un proceso que es mediado por el factor XIII creando el tampón hemostático definitivo (Velasco y Lopez, 2000). Una vez formado el trombo se detiene la actividad plaquetaria, se produce vasodilatación y se evita la formación de fibrina. En esta etapa actúan varias proteínas, entre ellas tromboxano A<sub>2</sub>, α-2 antitrombina III, α-1 antitripsina y α-2

macroglobulina, prostaciclina (PG12), adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que inhibe la agregación plaquetaria y óxido nítrico (Ferrer *et al.*, 1998).

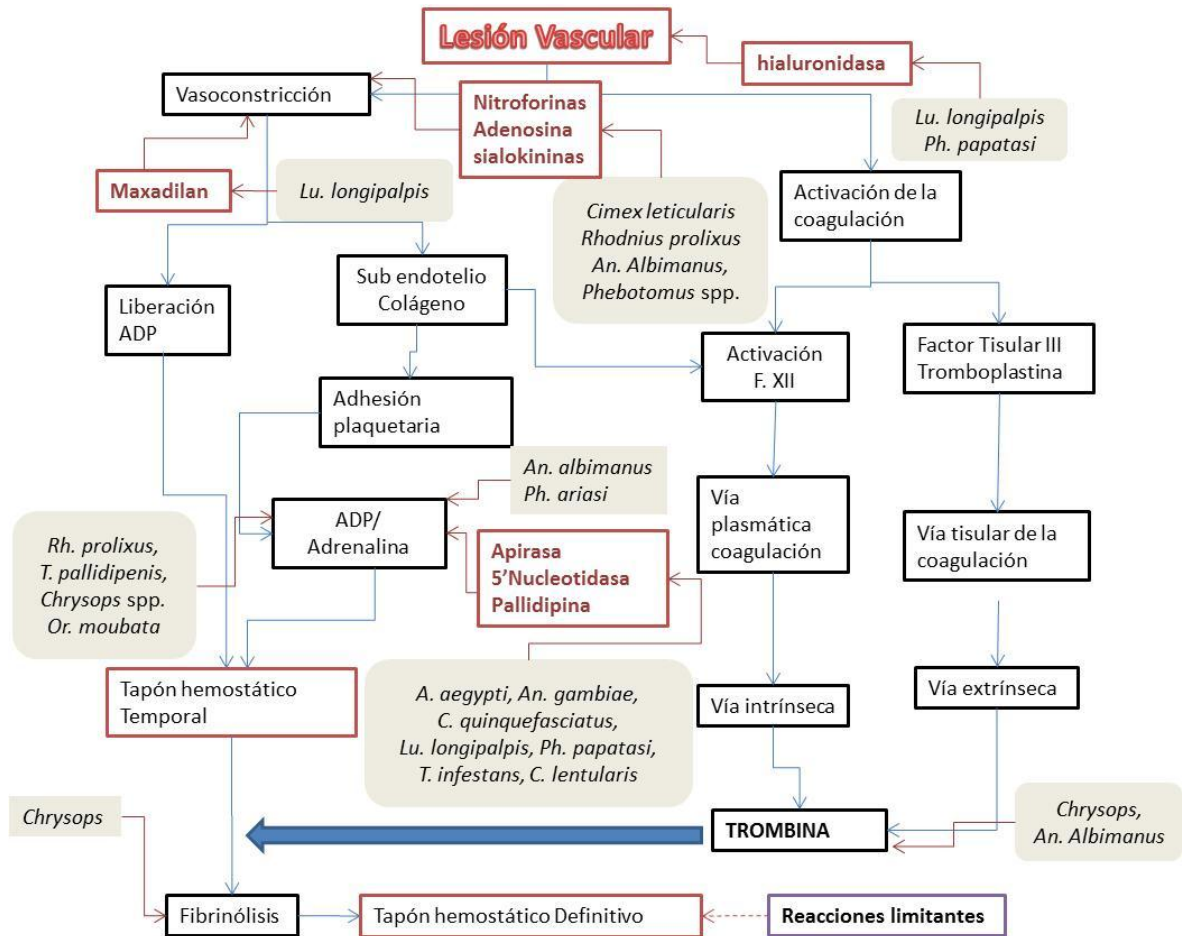
### 2.3. Mecanismos desarrollados por insectos que contrarrestan la acción hemostática

Varias acciones regulatorias han sido imitadas exitosamente por especies de insectos hematófagos que evitan el mecanismo hemostático para proveerse de sangre (Tabla 1) (Demeure *et al.*, 2005). Estas acciones facilitan a su vez la infección de varios microorganismos que usan los insectos como sus vectores (Belkaid *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1989).

#### 2.3.1 Proteínas que bloquean en la agregación plaquetaria

Las “apirasas” están presentes en todos los insectos que se alimentan de sangre y tienen como función inhibir la agregación plaquetaria (Fig. 1). Las principales proteínas identificadas como apirasas en varios grupos de insectos son: i) LuloAPY de 35 kDa. y Lulo5NUC de 60 kDa., ii) 5'nucleotidasas de 61, 65 y 68 kDa. y iii) proteína antiagregante de 40 kDa. (Riberio 1989, Riberio *et al.* 1995; Champagne y Ribeiro 1994; Lerner *et al.* 1991; Charlab *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 1998, 2001, 2004, Silva, 2009; Ribeiro y Francischetti, /2003). Adicionalmente la acción sobre las plaquetas es efectiva con proteínas que actúan sobre la trombina o que inhiben la unión de fibrinógeno como la trombostatina de 9.2 kDa. y la TTI de 3.5 kDa. (Ciprandi, 2003). En otros casos, las proteínas actúan sinérgicamente con apirasas, como la palidipina y RPAI-1 de 19 y 20 kDa., responsables de inhibir la agregación inducida por colágeno endotelial (Noeske *et al.*, 1994; Ciprandi 2003; Faudry *et al.*, 2004).

**Figura 1.** Componentes vasodilatadores y antiagregantes de la saliva de insectos sobre los mecanismos hemostáticos.



Fuente: Andrade *et al.* (2005) modificado.

### 2.3.2 Moléculas Vasodilatadoras

Las moléculas vasodilatadoras que producen los insectos evitan la contracción vascular usando mecanismos del óxido nítrico (Figura 2) (Andrade *et al.* 2005). Se encuentran en este grupo prostaglandinas, péptidos y enzimas que además de favorecer la ingesta facilitan el establecimiento de parásitos en el hospedero (Ribeiro *et al.* 1999; Lerner y Shoemaker 1992). Una molécula de 6.5 kDa.

denominada maxadilan es un poderoso vasodilatador con función 500 veces mayor a la calcitonina (Lerner *et al.*, 1991; 1992; Ribeiro 1989, Ribeiro *et al.* 1995; Valenzuela *et al.*, 2001). Fue descrita como un factor inductor de eritema con características funcionales, estructurales y fisiológicas comparables con otros mediadores de vasoactividad como neuroquinina A y B, péptido intestinal vasoactivo y la sustancia P (Lerner y Shoemaker 1992). Por sus características, esta molécula se ha considerado para uso farmacológico en enfermedades caracterizadas por vasoconstricción periférica como el síndrome de Raynaud (Ribeiro *et al.*, 1995).

En este grupo se clasifica el nucleosido de adenosina que inhibe la expresión del gen óxido nítrico sintasa y su precursor el 5'AMP que causa inhibición alosterica de la proteína fosfatasa (Ribeiro *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2007). Adicional a su función mediadora para la vasodilatación, también inhiben la agregación plaquetaria y los derivados de la adenosina son conocidos por tener propiedades inmunosupresoras (Ribeiro *et al.*, 1999) y supresoras de la respuesta inflamatoria (Katz *et al.*, 2000).

La Sialokinina I y II, de 1.4 kDa. inducen la liberación de óxido nítrico y la posterior relajación vascular (Champagne & Ribeiro, 1994). La enzima Peroxidasa presente en saliva genera degradación de vasoconstrictores como serotonina y catecolaminas liberadas por las plaquetas (Ribeiro *et al.*, 1999). La vasodilatación se produce también por relajación del musculo liso como la causada por una proteína presente en saliva de 15 kDa. (Andrade *et al.*, 2005, Cupp *et al.*, 1994;1998) y una proteína de 28 kDa. que produce eritema durante la picadura (Silva, 2009).

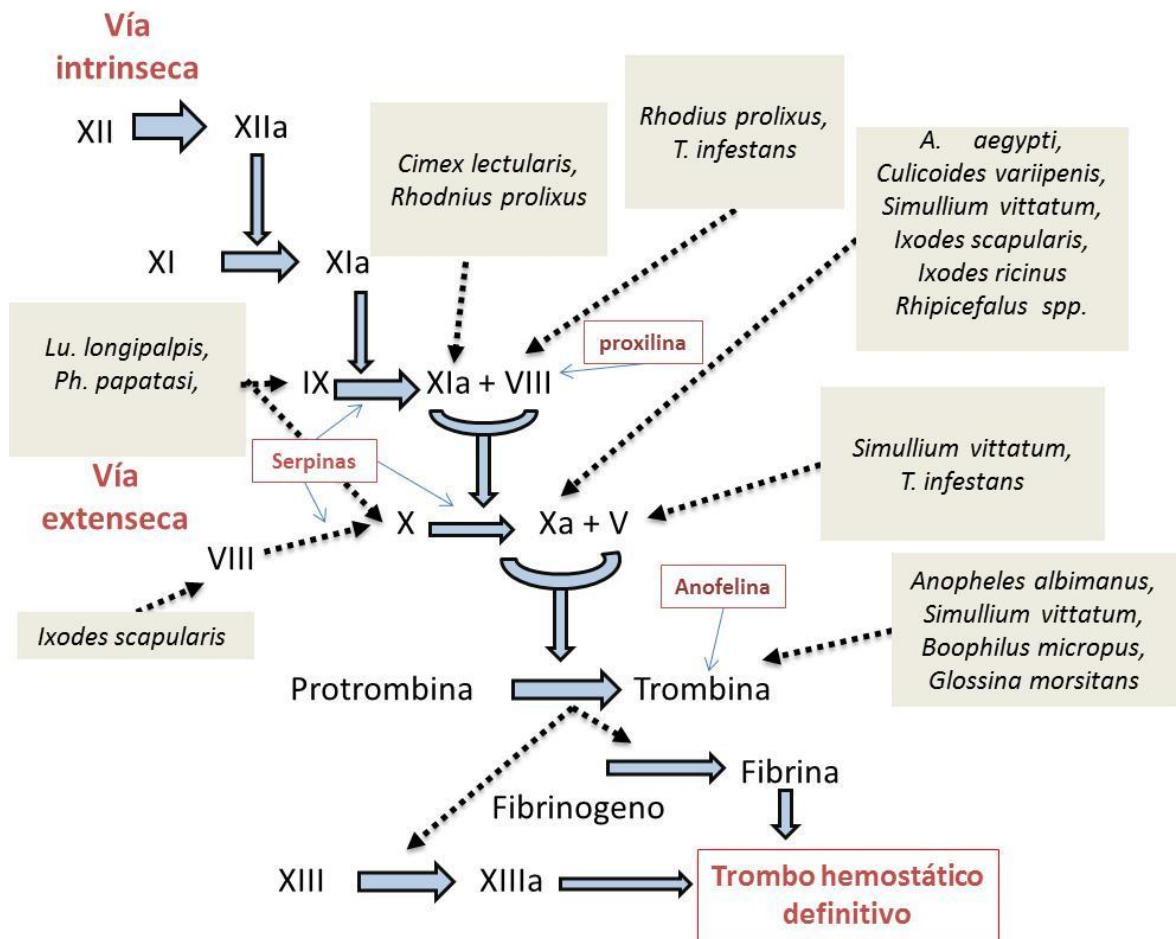
### 2.3.3 Anticoagulantes salivales.

Los anticoagulantes salivales son proteasas que bloquean la cascada de la coagulación y retardan la formación del coágulo. (Ribeiro *et al.*, 1986). Los mecanismos divergen entre artrópodos porque las estrategias en algunos casos se dirigen a la inhibición de diferentes factores de la coagulación (Figura 2). Actúan en estas vías varios péptidos como los inhibidores del factor Xa de 54 kDa. (Stark y James 1998), serpinas de 49 kDa. y proteína tipo C-Lectina de 16.3 kDa. que inhibe el Factor IX/X y Von Willebrand (Charlab *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2004).

La mayoría de componentes con acción anticoagulante que han sido encontrados en artrópodos hematófagos tienen como objetivo factores de la vía común de la coagulación. Por ejemplo, la anofelina, cuya acción es ligarse a la trombina, impidiendo que esta transforme el fibrinógeno en fibrina y consecuentemente evita la formación del coagulo sanguíneo (Valenzuela *et al.*, 1999). De manera similar, *A. aegypti* posee un péptido de 47.8 kDa y 415 aminoácidos en su saliva que es inhibidor del factor Xa, pertenece a la familia de serpina de los inhibidores de proteasas de serina (Stark y James 1998). Los triatomíneos poseen también una gran variedad de potentes agentes anticoagulantes tales como inhibidores del factor V y VIII identificados en *Triatoma infestans* (Pereira *et al.*, 1996) y la triabina, una proteína que interactúa selectivamente con la trombina y que fue identificada en el *Triatoma pallidipennis*. (Fuentes-P *et al.*, 1997).

La hialuronidasa de saliva de varios insectos tiene pesos de 42, 65 y 110 kDa., facilita la difusión de proteínas anti-hemostáticos e incrementa la permeabilidad del tejido, hidrolizando ácido hialurónico (Cerná *et al.*, 2002).

**Figura 2.** Factores de la cascada de la coagulación y la actuación de las proteínas salivales de artrópodos.



Fuente: Andrade et al. (2005) modificado.

En un estudio realizado por Valenzuela et al., (2001) se postularon algunas proteínas salivales como modelo de experimentación en vacunas; moléculas antigénicas que fueron obtenidas de *Phlebotomus patapasi* y que confieren protección contra la infección de *Le. major*. Estas moléculas se dirigen al desarrollo de vacunas que se relacionen a la respuesta DTH.

**Tabla 1.** Listado de proteínas salivales reportadas en estudios con artrópodos hematófagos.

	TAMAÑO (kDa.)	SPP HEMATOFAGA	MOLÉCULA	FUNCION/ACTIVIDAD	REPORTE
Acción antiagregantes	68,35, 35,	<i>A. Aegypti, C. lectularius, Ph. papatasi, An. dirus B</i>	Apirasa	Inhibición agregación plaquetaria	Champagne <i>et al</i> 1995, Valenzuela <i>et al.</i> 1998 Valenzuela <i>et al</i> 2001; Valenzuela <i>et al.</i> , 2004
	60	<i>Lu. longipalpis</i>	Agregación plaquetaria	5'Nucleotidasa	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Prates 2008
	40-50	<i>Culex quinquefasciatus</i>		PAF	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
	35.48	<i>Ph. ariasi</i>	<i>ParSP01</i>	Homólogo apirasa <i>Lu. longipalpis</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
	20	<i>Lu. longipalpis, Cimex lectularius, Ph. ariasi, Rh. prolixus</i>	Agregación plaquetaria	Apirasa	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Valenzuela <i>et al</i> 2001.
	19	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Pallidipina	Inhibe agregación plaquetaria	Noeske-J <i>et al</i> 1994
	19	<i>R. prolixus</i>	RPAI-1	Inhibid agregación	Noeske <i>et al.</i> , 1994; Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
	17	<i>Ornithodoros moubata</i>	Moubatina	Plaqueta	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
Vasodilatadores	20	<i>Cimex lectularius, Rh. Prolixus, T. infestans</i>	Nitroforinas	Producción/transporte, Oxido nítrico (NO)	Valenzuela <i>et al.</i> , 1998
	6.5	<i>Lu. longipalpis</i>	Maxadilan	Vasodilatador	Lerner <i>et al.</i> , 1991
	1.4	<i>A. aegypti</i>	Sialokinina I y II	Vasodilatadores	Champagne <i>et al.</i> , 1994
		<i>An. albimanus</i>	Enzima Peroxidasa	Vasodilatador	Ribeiro <i>et al.</i> , 1999

**Tabla 1.** Continuación

TAMAÑO (kDa.)	SPP HEMATOFAGA	MOLÉCULA	FUNCION/ACTIVIDAD	REPORTE
65	<i>Rhipicephalus</i>		fXa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
65	<i>Chrysops spp.</i>	Crisoptina	GP11bIIIa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
60	<i>Boophilus microplus</i>	BmAP	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
54	<i>A. aegypti</i>		Inhibidor coagulación AFXa	Stark <i>et al.</i> , 1998
29	<i>Lu. longipalpis</i>	Anticoagulante	Antígeno-5	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Prates <i>et al.</i> , 2008
28	<i>Culicoides variipennis</i>	fXa		Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
20	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabina	Interactua con trombina	Fuentes-prior <i>et al.</i> , 1997
19	<i>Rhodnius prolixus</i>	RPAI	ADP	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
17	<i>Cimex lectularius</i>		tenase (fVIII fIXa, PL)	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
17	<i>Hyalomma truncatum</i>		fXa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
16	<i>Lu. longipalpis, A. aegypti</i>	Anticuagulante	Anticoagulante	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Stark <i>et al.</i> , 1998, Prates <i>et al.</i> , 2008.
16	<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	VIIa/FT/fX(a)	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
12	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignina	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
12	<i>Amblyomma americanum</i>	Americanina	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
12	<i>Ornithodoros savignyi</i>		fXa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
11	<i>Rhodnius prolixus</i>	(prolixina-G Rodnina)	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
9.2	<i>Haematobia irritans</i>	Trombostasina	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
7	<i>Ixodes ricinus</i>	Ixina	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
6.8	<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	fXa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
6.8	<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornitodorina	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
6.3	<i>An. albimanus</i>	Anofelina	Impide formación coagulo sanguíneo	Valenzuela <i>et al.</i> , 1999
5	<i>Dermacentor andersoni</i>	Variabilina	GP11bIIIa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitroforina 2	(prolixina-G	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
3,5	<i>Glossina morsitans</i>	TTI	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
1.7	<i>Boophilus microplus</i>	BmAC2	Trombina	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ixodes ricinus</i>	Ixodina	fXa	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003
0.72	<i>Hyalomma dromedarii</i>	F6	<i>Hyalomma dromedarii</i>	Ciprandi <i>et al.</i> , 2003

Acción Anti coagulantes

**Tabla 1.** Continuación

	<b>TAMAÑO (kDa.)</b>	<b>SPP HEMATOFAGA</b>	<b>MOLÉCULA</b>	<b>FUNCION/ACTIVIDAD</b>	<b>REPORTE</b>
Otras moléculas	42	<i>Ph. papatasi</i> , <i>Lu. longipalpis</i>	Permeabilidad	Hialuronidasa	Ribeiro <i>et al.</i> , 2000, Charlab <i>et al.</i> , 1999
	52	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph.duboscqi</i>	Enz Adenosin deaminasa	Adenosin deaminasa	Katz <i>et al.</i> , 2000, Kato <i>et al.</i> , 2007, Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Katz <i>et al.</i> , 2000.
	77	<i>Lu. longipalpis</i>		Enz. convertasa	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004
	45	<i>Lu. longipalpis</i>		Proteína Yellow	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Prates <i>et al.</i> , 2008
	34	<i>Lu. longipalpis</i>		Tioesterasa	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Champagne <i>et al.</i> , 1995, Valenzuela <i>et al.</i> , 1998 Valenzuela <i>et al.</i> , 2001, Prates 2008.

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas existentes en glándulas salivales de *Lutzomyia ayrozai* y establecer su antigenicidad mediante inmunoensayos con sueros de perros (*Canis familiaris*) provenientes de áreas endémicas de leishmaniasis en Santander.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un modelo experimental con *Lutzomyia ayrozai*

Cuantificar la concentración y la composición de proteínas presentes en saliva del modelo *Lutzomyia ayrozai*

Determinar las proteínas antigénicas en saliva relevantes para reservorios domésticos tipo *canis familiaris*

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis en Colombia es causada principalmente por *Leishmania panamensis* en los valles interandinos del río Cauca y Magdalena y en la costa pacífica. En el año 2010 hubo 14.411 casos que demuestran un aumento en la prevalencia así como un proceso acentuado de domiciliación (INS 2010). Los anteriores planes de atención básica no impactaron la incidencia y las acciones de control se limitaron al diagnóstico temprano y tratamiento oportuno. No existen vacunas para los humanos y su desarrollo tardaría varios años y el control de vectores se limita al uso de mosquiteros. Una vía rápida de experimentación con vacunas correspondería al modelo del reservorio doméstico del parásito. Sin embargo la complejidad de la *Leishmania* spp y su perdurabilidad en los reservorios, ha hecho que el *Canis familiaris* no haya sido utilizado todavía. Sin embargo el uso de proteínas antigénicas que favorecen la infección del parásito en el reservorio, han demostrado su utilidad como vacunas (Valenzuela *et al.*, 2004). Dicha vacuna es útil para *Leishmania* del complejo donovani pero no aplicable a los parásitos causantes de la leishmaniasis cutánea como *Leishmania panamensis*. No existen aproximaciones para la experimentación con saliva del vector de dicho parásito *Lutzomyia trapidoi* por las dificultades en su colonización y no existen experimentos con ninguna especie utilizando ejemplares silvestres. El presente trabajo demuestra que es posible el uso de ejemplares silvestres de una especie abundante que cohabita con el vector, pero que a diferencia de este se presenta abundantemente en focos intervenidos cercanos a los laboratorios de experimentación.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en zona rural del municipio del Playón situado al nororiente del departamento de Santander. Esta región tiene ecosistemas de bosque húmedo tropical (Holdridge, 2000), con topografía montañosa, temperatura media 28°C y precipitación anual cercana a 1.900 mm. El municipio está situado en la cordillera oriental que presenta un mosaico de hábitats que van desde bosques altamente conservados hasta sitios dispuestos para la ganadería y la agricultura, siendo el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) una de sus principales actividades económicas. Los especímenes de *Lutzomyia* spp fueron capturadas en el corregimiento de San Pedro de la Tigra, ubicado a 10 Km. de la cabecera municipal (7°28'17" N – 73°12'57" W) a una altitud entre 800 -900 m.s.n.m. en un parche de bosque conservado rodeado por cultivos de cacao, potreros y una carretera.

### 5.2 Estudio entomológico

Se hicieron colectas entre las 18:00 y las 23:00 horas en bosque y cultivo de cacao usando aspiradores bucales sobre cebo humano protegido, conservando los ejemplares en frascos de cría. Estos se guardaron en cavas de polietileno a una temperatura y humedad constante por cuatro días, suministrando agua y solución azucarada (Figura 3). Se estableció un protocolo de pre-cría en el cual los individuos de campo se depositaron en viales para su supervivencia y se hizo el seguimiento y registró por 4 días para asegurar que los especímenes tuvieran el desarrollo completo de sus glándulas entre el 4 y 5 día de desarrollo. Los individuos que presentaron mayor longevidad al momento de la captura no precisaron ningún inconveniente en su estructura glandular que dificultara su disección, salvo casos excepcionales fueron apartados del estudio. Una vez se

cumplió este parámetro se separaron de los viales de cría con el aspirador bucal y se procedió a su disección. El criterio anterior se hizo dado que la composición de las proteínas salivales de flebótomos difiere de acuerdo con el tiempo de desarrollo de sus glándulas (Volf *et al.*, 2000).

Los ejemplares de *Lu. ayrozai* sobrevivientes se pre-clasificaron por caracteres morfológicos externos (ver resultados, Fig. 7), se anestesiaron en cloroformo y una vez dormidos se disectaron sobre cama de hielo en buffer HEPES (10 mM, pH 7.4). Las glándulas, se depositaron en buffer de lisis (80  $\mu$ l cada 80 pares de glándulas) y se pasaron a un termo de nitrógeno líquido en campo para su transporte al laboratorio (Figura 4). El buffer de lisis utilizado para la preservación de las glándulas salivales se preparó con urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, PMSF (Inhibidor de proteasas) y Tris BASE.

**Figura 3.** Sitio de captura y conservación de ejemplares



Método de búsqueda y captura en bosque mediante cebo humano protegido. Recipientes utilizados para la cría de flebótomos.

Los ejemplares se disectaron bajo el microscopio estereoscopio en buffer HEPES (10 mM, pH 7.4) (10 $\mu$ l aprox. por espécimen), haciendo el desmembramiento de la

cavidad cefálica previa eliminación del abdomen, para evitar la tensión del sistema digestivo y poder recuperar junto con la cabeza las glándulas salivales. Una vez apartada la cabeza se separaron las glándulas salivales ubicadas en el extremo cefálico y área proximal del tórax. Cuidadosamente se eliminó el aparato bucal desde la región frontal del individuo, aislando completamente las glándulas salivales. El procedimiento se realizó sobre una cama de hielo para proteger el contenido salival de la desnaturalización. Luego las glándulas separadas se depositaron en viales con buffer de lisis (80  $\mu$ l por cada 80 pares). Por último los viales son transportados en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio.

**Figura 4.** Disección y procesamiento de glándulas salivales de *Lu. ayrozai*.



Mecanismo de obtención de los lóbulos glandulares. Desmembramiento cefálico de ejemplares *Lu. ayrozai* mediante agujas de disección.

Se descartaron del estudio los ejemplares que ingirieron sangre dado que las proteínas salivales pueden ser casi nulas (Valenzuela *et al.*, 2004), además la actividad enzimática decrecen luego de la ingesta (Charlab *et al.*, 1999, 2000; Katz

*et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2000). La determinación taxonómica se realizó aclarando las muestras en lactofenol 1:1 por doce horas, practicándose una clasificación por grupos y se determinaron hasta especie con el criterio de Young & Duncan (1994) y Galatti (2009) (Figura 5). Previo a este proceso se realizó un análisis por morfotipos basado en caracteres externos, el cual permitió separar acertadamente los individuos de *Lu. ayrozai*.

**Figura 5.** Caracteres taxonómicos de *Lu. ayrozai*



Atributos taxonómicos de *Lu. ayrozai*: (izq.) Ejemplar femenino indicando la pigmentación torácica. (Centro) Genitalia Hembra, (Der.) Cibarium.

Previo al proceso de separación de glándulas, se realizó una breve indagación de los aspectos histológicos y anatómicos de los flebótomos hembras, para reconocer su estructura corporal y definir algunos parámetros útiles durante el proceso de disección. En éste reconocimiento se identificaron las glándulas salivales morfológica y anatómicamente además de la musculatura asociada al mecanismo hematofágico; dicho reconocimiento contribuyó al abordaje de la disección con un criterio más claro. La metodología usada para la obtención de los cortes histológicos en las muestras de *Lu. ayrozai* fue: fijación en Alcohol absoluto por 24 horas, inclusión en parafina y cortes histológicos con la ayuda de un micrótopo. Las secciones del tejido obtenidas en láminas de vidrio fueron coloreadas con hematoxilina-eosina. Cada lámina finalmente se fijó con bálsamo de Canadá y se cubrió con una laminilla para su observación al microscopio.

### 5.3 Técnicas de laboratorio

#### 5.3.1 Cuantificación y electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE)

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Las glándulas salivales se sometieron a ruptura mediante buffer de lisis y conservadas en nitrógeno líquido. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 g por cinco minutos. Del sobrenadante se cuantificaron proteínas totales usando el reactivo de Bradford (azul de coomasie, etanol & ácido fosfórico) mediante una curva de calibración con albúmina. Para obtener el perfil proteico se hizo uso de una cámara de electroforesis MiniProtean I (Biorad). En geles de poliacrilamida-SDS al 12% se pasaron 80µl de lisado de glándulas salivales (LGS) de *Lu. ayrozai*. Las glándulas fueron tratadas con buffer Tris-HCl 0.5M pH=6.8, Glicerol al 10% (v/v), SDS al 10% (p/v), 4% de mercaptoetanol (v/v) y 1% (p/v) de azul de bromofenol para PAGE. Las muestras se calentaron a ebullición por 10 minutos. Los geles se prepararon de acuerdo a la estandarización previamente realizada.

La mezcla se calentó hasta ebullición por cinco minutos y luego se llevaron a frío por cinco minutos para la electroforesis. Como control de peso molecular se utilizó el marcador SeeBlue™ (Invitrogen ®) que contiene: miosina, BSA, glutámico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, mioglobina, lisosima, aprotinina y cadena β de la insulina en un rango de 6.8 a 198.5 kDa. Para montaje se vertieron 6 ml de gel de corrido entre los vidrios con una capa de isopropanol para hacer más efectiva la polimerización. Una vez polimerizado se lavó con agua destilada tres veces para retirar el isopropanol y la acrilamida sin polimerizar, seguido de secado con papel de filtro. Se vertió el gel de concentración (stacking) y se situó el peine antes de la polimerización. Terminado el proceso se retiró el peine y los geles se introdujeron en la cámara de

electroforesis, cubriéndose con buffer de corrido (tris Base 0.20%, glicina 1.44%, SDS 0.10%). Los pozos se cargaron con las muestras y se aplicó 120V, y se corrió durante 1 hora. La visualización del patrón de bandas se hizo con azul de CoomassieR-250 al 0.25% en metanol 50% y ácido acético.

### 5.3.2 Análisis por “western blot”

Los sueros se tomaron de un banco de muestras de *Canis familiaris* expuestos naturalmente a la picadura de flebótomos, colectados en un estudio precedente desarrollado para la WELCOME TRUTS, en zona rural del municipio de Landázuri Santander. Las muestras fueron diagnosticadas para leishmaniasis por PCR y ELISA utilizando dilución de antígeno 30µg/dl; conjugado 1:1500 y suero 1:100. Se utilizaron 30 sueros: 15 positivos y 15 negativos. Los geles obtenidos por electroforesis se sumergieron en buffer de transferencia durante 20 minutos. A continuación se cortó una pieza de membrana de PVDF marca Biorad de 10cm de largo por 8 de ancho, se humedeció con 10ml de metanol por 3 segundos, se puso en un recipiente con agua destilada por cinco minutos y finalmente se dejó en buffer de transferencia. Se empacó el cassette del blotting y se colocó dentro del recipiente de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 100V por una hora con agitación constante.

Terminada la transferencia de proteínas, la membrana fue bloqueada durante 12 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 12 horas se lavó la membrana con solución de lavado. Luego se incubó con los sueros (dilución 1/50 en solución de dilución) de perros infectados y no infectados del área endémica señalada antes. La cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm<sup>2</sup> de membrana, la incubación se llevó a cabo por dos horas y media con agitación constante. Terminada la incubación la membrana se lavó, nuevamente con solución de lavado. Posteriormente, se incubó con el conjugado anti IgG-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich ®) en una dilución de 1/2500 con solución de dilución, la

cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm<sup>2</sup> de membrana, la incubación se llevó a cabo por una dos horas y media con agitación constante. Finalmente, para revelar, se incubó la membrana con el sustrato de la enzima el (NBT) azul de tetrazolium y (BCIP) cloro, Bromo indol fosfato en el buffer de la enzima (AP), La aparición de las bandas se presentó entre 10 y 30 minutos. Las imágenes producidas en SDS-PAGE y Western se analizaron utilizando el programa gráfico QuantityOne (Biorad ®) para valorar sus pesos moleculares.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estudio entomológico

Durante las colectas se determinó la presencia de ocho especies en total, seis registradas para la zona de bosque y ocho en el área de cultivo (Tabla 2). Las colectas fueron realizadas durante 22 meses en la zona de Bosque y 13 meses en cultivos de cacao, mediante muestreos no sistemáticos, los cuales permitieron encontrar un suministro permanente de individuos de *Lu. ayrozai*, especie más activa y abundante en las zonas de bosque (Figura 6). En la Tabla 2 se listan las especies encontradas en las áreas estudiadas diferenciando entre sexo y presentando el valor total de los especímenes capturados en cada caso.

**Tabla 2.** Listado de especies de *Lutzomyia* colectadas mediante cebo humano protegido en zona de Bosque y cultivo cacao en San Pedro de la Tigra, El Playón.

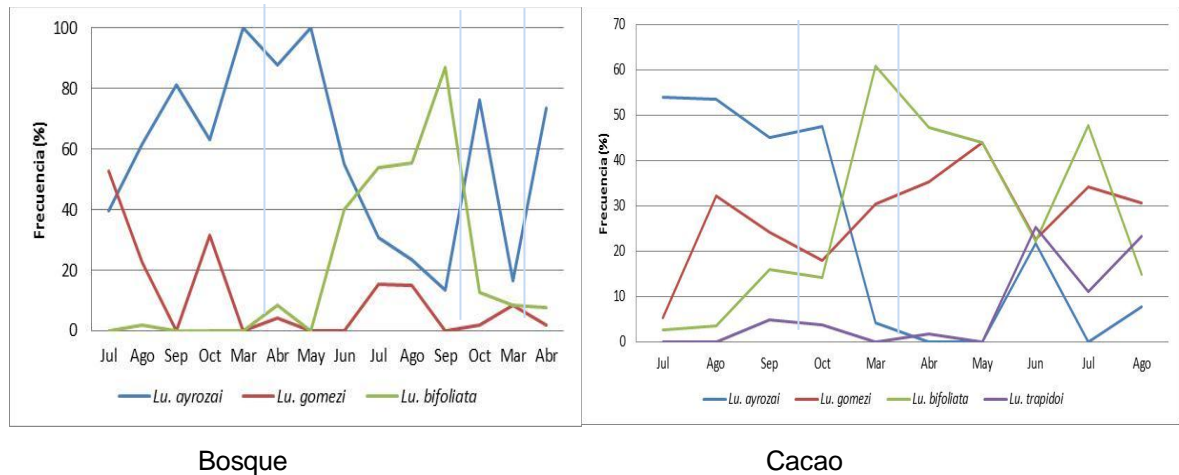
Especie	Colecta en Bosque			Colecta en Cultivo Cacao		
	♀	♂	Total	♀	♂	Total
<i>Lu ayrozai</i> (Barretto, Coutinho, 1940)	972	47	1019	340	18	358
<i>Lu gomezi</i> (Nitzulescu, 1931)	200	5	205	537	116	653
<i>Lu bifoliata</i> Osorno, Morales 1970	260	37	297	423	94	517
<i>Lu trapidoi</i> (Fairchild y Hertig, 1952)	65	0	65	357	26	383
<i>Lu saulensis</i> (Floch, Abonnenc, 1944)	0	0	0	254	59	313
<i>Lu panamensis</i> (Shannon, 1926)	168	0	168	62	0	62
<i>Lu yuilliyuilli</i> Young & Porter, 1972	27	0	27	9	0	9
<i>Serie Townsendi</i>	0	0	0	7	0	7
Total especímenes	1692	89	1781	1989	313	2302

Datos de especímenes colectados durante el transcurso del estudio.

El diseño experimental para la colecta no fue delimitado para medir parámetros ecológicos de rigor dado a que el estudio se hizo en áreas puntuales y con el objeto de obtener el mayor número posible de individuos de *Lu. ayrozai*. Por tanto

los datos obtenidos obedecen al diagnóstico realizado para definir las áreas y las características para el adecuado suministro de especímenes de *Lu. ayrozai*.

**Figura 6.** Registro de colectas realizadas mes a mes para *Lutzomyia* spp, en zona de Bosque y de Cultivo de Cacao. Datos en porcentaje de frecuencia.



La especie que predominó durante las colectas hechas fue *Lu. ayrozai* asociada a los sitios de bosque que fueron utilizados para el estudio. En las colectas llevadas a cabo en un modelo no sistemático en cacao las especies de predominancia en la captura fueron *Lu. bifoliata* y *Lu. gomezi*, mayormente representada que en las colectas de bosque. *Lu. ayrozai* en el bosque representa más del 60% de los flebotomos colectados teniendo una amplia diferencia en la frecuencia de captura respecto a las demás especies registradas, mientras que en las capturas hechas en el cultivo de cacao no es tan frecuente como *Lu. gomezi*, *Lu. bifoliata*, *Lu. saulensis* y *Lu. trapidoi*, predominantes en este último. Fueron colectados pocos especímenes de *Lu. panamensis*, *Lu. yuilli yuilli*, *Lu. serie towsendi*. Dada la favorabilidad del bosque para la captura de *Lu. ayrozai* fue definido después de las 6 primeras colectas como el lugar de trabajo y suministro de especímenes.

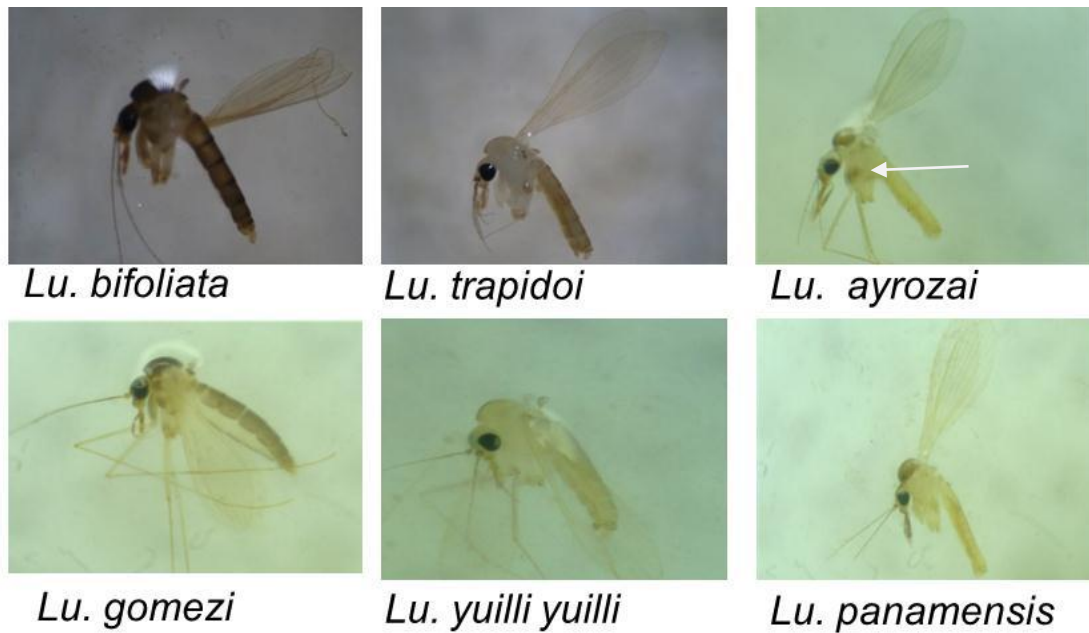
El proceso taxonómico para la identificación de *Lu. ayrozai*, fue abordado teniendo en cuenta un carácter morfológico del tórax que por su pigmentación es útil para su discernimiento a nivel de especie. Dicho carácter permitió discriminar a *Lu. ayrozai* de otras especies previo al proceso de disección. Esta característica se señala en el primer segmento torácico como una pigmentación en el Catepisterno y coxas anteriores (Young & duncan 1994; Galatti 2009). El proceso de determinación de los morfotipos se hizo con estricto cuidado en especímenes de *Lu. ayrozai* y *Lu. panamensis* los cuales son muy cercanos jerárquicamente, compartiendo el mismo grupo taxonómico (*Psychodopygus*) y perteneciendo a la serie *panamensis*. Su historia de vida, genera una similitud tanto en su morfología interna como externa que dificulta su determinación rápida. Sin embargo el carácter descrito permitió seleccionar eficazmente los ejemplares para el estudio. En la figura 7 se muestra los diferentes morfotipos producto de los muestreos de la localidad de Bosque.

## 6.2 Separación de glándulas salivales

Las imágenes histológicas permiten identificar que las glándulas salivales cuentan con un ducto de secreción que se dirige desde la hipofaringe por la parte ventral del flebótomo hasta la cavidad anterior del tórax. Consiste de un epitelio simple que termina en un lóbulo glandular asociado en la parte proximal a un inyector o bomba muscular (Figura 8).

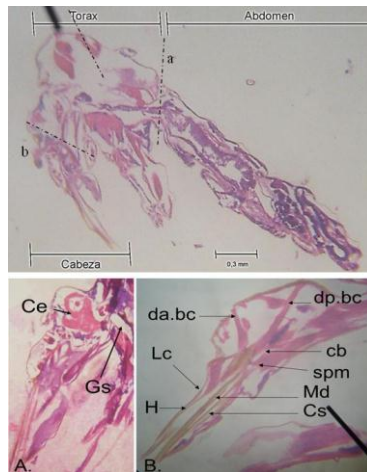
El extremo cefálico de *Lu. ayrozai* está compuesto por un complejo de músculos aductores y abductores en la mandíbula y del área del cibarium propios de la función hematófaga y ventralmente dispone de un ducto paralelo al digestivo con un músculo impulsor salival (spm) que conduce la saliva de las glándulas salivales hacia la hipofaringe (H) por el canal salival (Cs) (Figura 9).

**Figura 7.** Diferenciación de morfotipos de *Lutzomyia* spp.



La imagen de *Lu. ayrozai* permite Observar la pigmentación en los escleritos coxales del primer par de patas que lo diferencia de *Lu. panamensis* quien comparte el grupo taxonómico (subgénero).

**Figura 8.** Análisis anatómico de *Lu. ayrozai* con técnicas histológicas a 4 µm.  
Corte sagital en Tinción hematoxilina – Eosina.



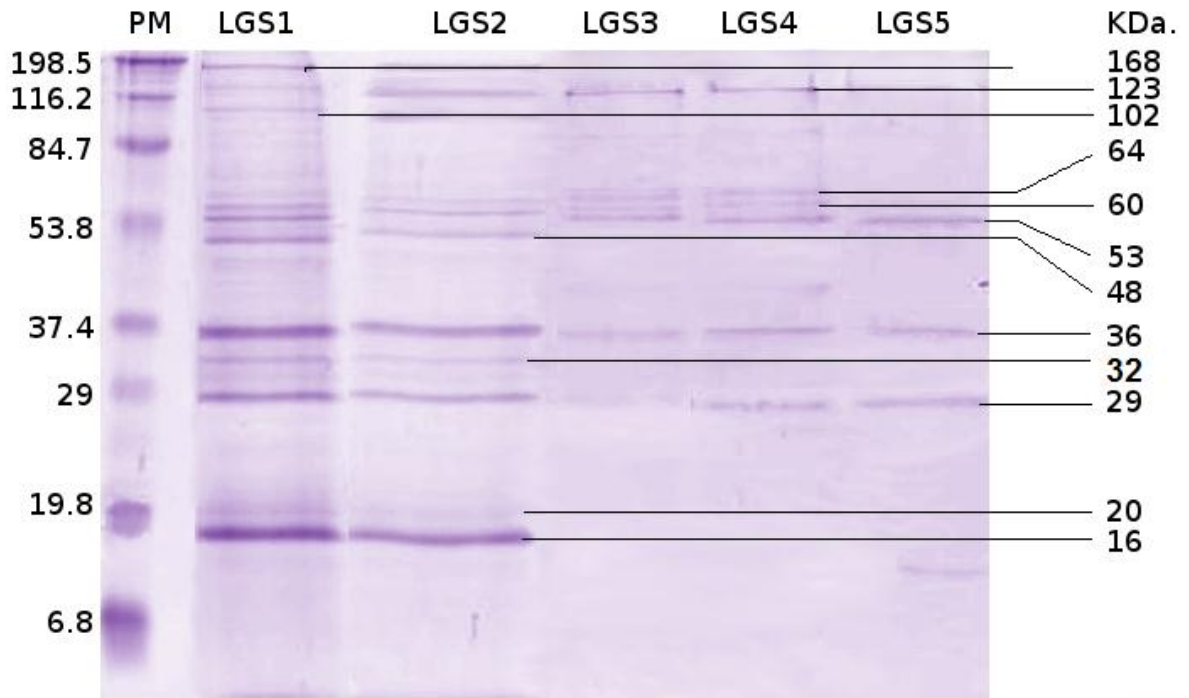
a. Cabeza: (**Ce**) cerebro, (**Gs**) Glándulas salivales. b. Aparato bucal y musculatura (**da.bc**) aductor anterior del cibarium, (**dp.bc**) aductor posterior del cibarium, (**cb**) Cibarium, (**spm**) musculo impulsor salival, (**md**) Mandíbula, (**H**) Hipofaringe, (**Lc**) lacinia, (**Cs**) canal salival.

### 6.3 Análisis de proteínas de glándulas salivales

#### 6.3.1 Electroforesis SDS-PAGE

La concentración de proteínas en los lisados de glándulas realizados estuvo en un rango entre 0.11 – 0.15 mg/ml (Anexo A), considerando que cada uno de los patrones medidos hizo parte del mismo número de glándulas salivales pero de insectos colectados en diferentes momentos, presentando distintos valores para contenido proteico en los ensayos. En la Figura 9 se observan los resultados de los geles para proteínas de saliva de *Lu. ayrozai*, detectando bandas en un amplio rango de pesos moleculares y se destaca una mayor proporción de franjas proteicas entre 29 y 36 kDa. y entre 48 y 64 kDa. Los perfiles electroforéticos 3, 4 y 5 presentan bandas tenues debido a que la tinción con azul de Coomassie R-250, detecta cantidades del orden de 30ng de proteína, por lo que las proteínas que se encuentran en menor concentración no se pueden observar muy bien con esta tinción. Este colorante orgánico forma complejos fuertes con las proteínas, interaccionando electrostáticamente con los grupos aminos. El número de posibles uniones se correlaciona más con la cantidad de aminoácidos básicos de las proteínas, como lisina, arginina, histidina y tirosina, que con su masa total. Los datos respecto a las masas moleculares de las proteínas obtenidas a partir de las imágenes de los geles SDS-PAGE se muestran en la Tabla 3. No obstante se realizaron ensayos preliminares que describieron el mismo patrón de bandas obtenido mediante tinción con fluorescencia (SYPRO RUBY) que representa alta sensibilidad y más asequible que otros métodos. En este caso no se tuvo en cuenta realizar pruebas en tinción con plata.

**Figura 9.** Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas de glándulas salivales de *Lu. ayrozai*. Registro para cinco muestras.



Registro para cinco muestras del lisado de glándulas salivales (LGS). Las SDS-PAGE 12% obtenidas representan una migración de proteínas característica definiendo 12 fracciones de diferente peso molecular, las cuales tuvieron una ligera variación entre muestras obtenidas en diferentes épocas del año.

El rango de proteínas varió en peso entre 16 y 168 kDa con 12 bandas en total visualizadas en todos los geles hechos con los ejemplares en diferentes épocas del año (Figura 9). Existen bandas tenues en los geles con mayor concentración de proteínas que no son reproducibles en todos los geles, y que podrían corresponder a ruido de fondo durante la migración por ruptura de algunas de ellas. La diferencia en la concentración de proteína que se expresa en la intensidad de la señal, puede deberse a las características de los especímenes colectados, donde la longevidad de las hembras y la época del año, podrían representar variaciones en el contenido salival. Las proteínas de 29, 36, 53, 60, 64

y 123 se mantienen presentes en todas las épocas del año, mientras que las restantes son al parecer dependientes de la longevidad del vector.

**Tabla 3.** Registro de proteínas salivales visualizadas sobre los geles de SDS – PAGE de *Lu. ayrozai*.

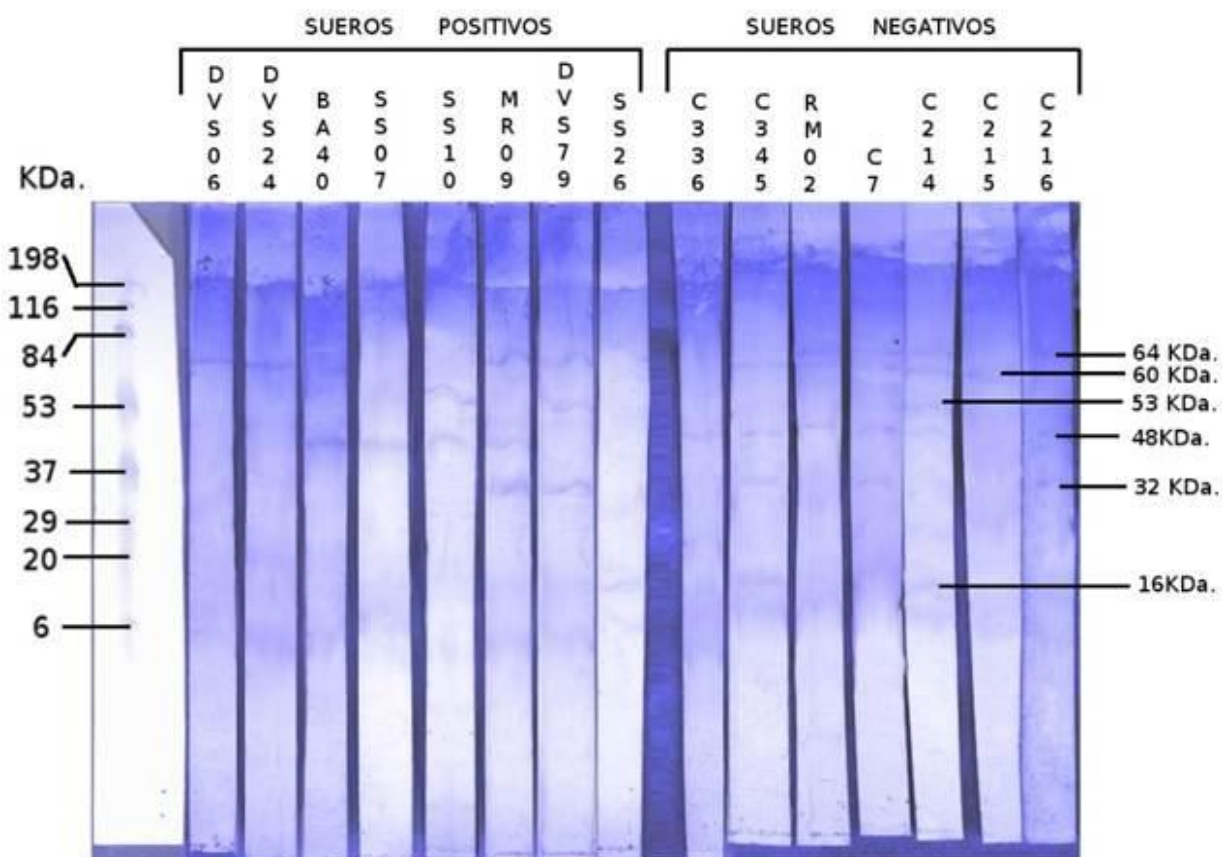
P M kDa.	LSG 1	LSG 2	LSG 3	LSG 4	LSG 5
168	X	X			
123	X	X	X	X	
102	X	X			
64	X	X	X	X	
60	X	X	X	X	
53	X	X	X	X	X
48	X	X			
36	X	X	X	X	X
32	X	X			
29	X	X		X	X
20	X	X			
16	X	X			

Registro visual obtenido mediante el programa Quantity One. Se observa la presencia/ausencia de las fracciones proteicas en las diferentes muestras del LGS. Se observa un registro marcado de las fracciones de 64, 53 y 36 kDa. en todos los Lisados hechos.

### 6.3.2 Análisis por Western Blot (WB).

Un total de seis proteínas fueron identificadas con los sueros de perros en ambos grupos: 64, 53, 48, 32, y 16 kDa. y la proteína de 60 KDa. fue reconocida únicamente por los sueros de perros negativos (Tabla 4). En la Figura 10 se muestran WB de sueros de ambos grupos donde la banda de 60 KDa. es reconocida por el programa gráfico QuantityOne en perros negativos.

**Figura 10.** Western blot de LGS *Lu. ayrozai* con sueros negativos y positivos.



Bandas producto del western blot que indican los antígenos presentes en el patrón de proteínas salivales de *Lu. ayrozai*. Las proteínas de 48 y 64 kDa. se observan en la mayoría de las muestras, mientras que la proteína de 60 kDa. aparece revelada únicamente en sueros negativos del experimento.

La proteína de 60 kDa se encontró consistentemente positiva en sueros de perros no infectados con *Leishmania* spp. Esta proteína correspondería una nucleotidasa con función antiagregante, pero que al despertar una respuesta antigénica de alguna manera podría interferir la infección del parásito.

**Tabla 4.** Valores kDa. registrados para proteínas antigénicas en LGS *Lu. ayrozai*.

Sueros / Estatus infección <i>Leishmania</i> spp.		Sueros Positivos								Sueros Negativos						
		D V S 0 6	D V S 2 4	B A 4 0	S S 0 7	S S 1 0	M R 0 9	D V S 7 9	S S 2 6	C 3 3 6	C 3 4 5	R M 0 2	C C 7	C 2 1 4	C 2 1 5	C 2 1 6
Peso de proteína en kDa.	64	X	X				X	X				X	X	X		X
	60										X	X	X	X	X	
	53	X		X										X		
	48		X	X	X	X				X	X	X	X	X		X
	32	X	X								X		X			X
	16							X			X			X		

Datos originados desde el programa grafico QuantityOne. Los antígenos obtenidos en la conjugación con sueros de perros infectados y no infectados de una zona endémica. Indica la antigenicidad de la proteína de 60 kDa solo para los sueros negativos utilizados.

## 7. DISCUSIÓN

*Lu. ayrozai* es la especie más abundante en bosque durante los periodos seco y lluvioso y su captura con cebo humano es eficiente obteniéndose abundante material en cortos periodos de tiempo. Apareció a tempranas horas mostrando un patrón de picadura crepuscular (Rangel & Lainson, 2003; Afonso *et al.*, 2007; Rangel *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2001, Azevedo *et al.*, 2008, Gomes y Galatti, 1989). El abundante registro de esta especie se resalta además porque los flebótomos pertenecientes al subgénero *Psychodopygus*, presentan un comportamiento marcadamente antropofílico (Viveros *et al.*, 2009).

En Colombia se ha reportado *Lu. ayrozai* en varias regiones (Sandoval *et al.*, 2006; Cabrera *et al.*, 2009) pero no se ha profundizado en su análisis ecológico. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que en la zona geográfica del departamento de Santander donde se realizó el estudio no se había registrado ésta especie, lo cual sugiere que el registro de especies aun es parcial en muchas áreas endémicas donde podría ampliarse los reportes con nuevos y más exhaustivos estudios entomológicos. Las demás especies encontradas en la zona *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. bifoliata*, y *Lu. panamensis* no se colectaron en la totalidad de los muestreos y predominaron en las capturas en cultivo de cacao. Él área de bosque dado el alto registro en la colecta de *Lu. ayrozai* se definió como sitio de muestreo, objetivo primordial de esta actividad entomológica. Las colectas realizadas sugieren que las poblaciones de *Lu. trapidoi* y *Lu. ayrozai* comparten en ésta zona nichos de la misma naturaleza, lo cual permite considerar el uso de esta última como modelo de experimentación para la búsqueda de moléculas de interés. El uso de *Lu. trapidoi* se dificulta por su vulnerabilidad a la fragmentación del hábitat, conservándose en focos lejanos y de difícil acceso. La variedad de microhábitats y especies de plantas nativas disponibles, pueden ser factores adicionales que condicionan la competencia entre especies por sitios de

descanso, aspectos que limitan la supervivencia de especies con márgenes de tolerancia reducidos. (Alexander, 1992).

*Lu. ayrozai* mostró alta sobrevivencia luego de su captura durante cuatro días en condiciones de humedad y temperatura estables, dentro de recipientes herméticos previos a su disección. Igualmente durante su procesamiento y aislamiento de glándulas, se expusieron antes del sacrificio a condiciones ambientales normales, exhibiendo su óptimo estado y resistencia a la pre-cría. En estudios previos el uso de colonias ha contribuido enormemente al conocimiento de los individuos en diferentes aspectos de su biología y su rol en la transmisión de enfermedades. No obstante se ha descrito que los individuos que han sufrido un proceso de colonización pierden la variabilidad genética natural y por ende su respuesta efectiva a las condiciones que realmente se presenta en la naturaleza (Andrade *et al.*, 2005).

El criterio definido para garantizar la supervivencia de los especímenes silvestres por cuatro días, permitió obtener individuos adultos con un contenido salival suficiente para el procesamiento. No obstante el parámetro de longevidad y por ende el contenido proteico de la saliva, no resultaron homogéneos en las distintas muestras. Los factores que producen la variación en la cantidad de contenido salival observado en los perfiles electroforéticos, presumiblemente son debidos a diferencias de edades entre las poblaciones muestreadas en distintos momentos del año. Esto resulta en perfiles proteicos menos abundantes en flebotomos capturados coincidentemente en temporadas de lluvia. Los resultados encontrados para LGS1 y LGS2 sugieren que las muestras fueron obtenidas en ejemplares de mejores condiciones fisiológicas, abundante contenido salival y escenario climático favorable para la captura de especímenes, considerando que se muestreó en época de verano, donde las poblaciones suelen tener ambientes más apropiados para su desarrollo que durante los meses de invierno.

En varios estudios se ha encontrado que la producción de saliva en flebótomos se incrementa considerablemente desde el tercer día de emergencia del adulto y durante este proceso aparecen paulatinamente las diferentes proteínas del coctel hasta logarse el 94% del contenido salival después del quinto día (Prates *et al.*, 2008). La composición de la saliva es directamente proporcional a la longevidad en los primeros días (Volf *et al.*, 2000) pero decrece según el número de ingestas sanguíneas. En un trabajo previo hecho en Landázuri las hembras longevas se colectaron en diciembre, coincidiendo con una mayor casuística de casos de leishmaniasis. Para futuros trabajos con ejemplares silvestres de *Lutzomyia trapidoi* se debe estimar su longevidad inspeccionando el tracto reproductor.

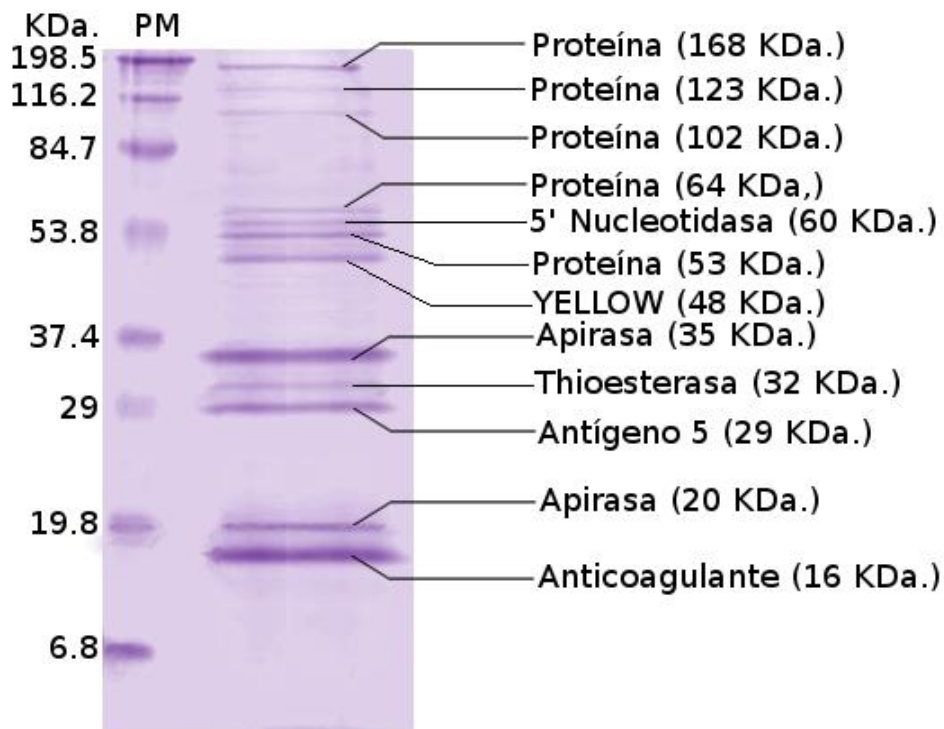
La diferencia en el número y concentración de bandas en la electroforesis se podría deber a cantidades variables de péptidos, no detectados de manera homogénea por la técnica de coloración aún cuando se usaron 80 pares de glándulas por ensayo. A pesar de la variabilidad entre lisados los perfiles electroforéticos permitieron detectar fracciones entre 16 y 168 kDa. (figura 9). Las bandas entre 16 y 20 kDa. corresponderían a las proteínas salivales de *Lu. longipalpis* con función anticoagulante o a la fracción de 20 kDa. registrada en triatomíneos con acción antitrombótica (Tabla 5). Las bandas de 29 y 32 kDa encontradas en cuatro de los cinco LGS presentados, se podrían asociar con actividad anticoagulante de proteínas D7 (LuLo-D7) encontradas en dípteros de la familia Culicidae dirigidas a bloquear el factor Xa y en otros casos a inhibir del factor XII de la coagulación, o una posible tioesterasa en el caso de la banda de 32 kDa. (Tabla 5). La proteína de 36 kDa. está presente en todos los LGS y se encontró en abundante concentración en todos los perfiles electroforéticos. Homólogos de similar peso molecular se han identificado como apirinas, inicialmente en *Cimex lectularius* y luego en *Lu. longipalpis*, *Ph. perniciosus* y en *Ph. papatasi* como potentes antiplaquetarios que hidrolizan ADP. Las proteínas de 48 kDa. tienen registro parcial en los geles, podría tener similitud con una anti proteasa descrita en saliva de *Lu. longipalpis* de actividad anticomplementaria,

**Tabla 5.** Correspondencia de los pesos moleculares de proteicas de *Lu. ayrozai*, con aquellas identificadas previamente

<b>Peso kDa.</b>	<b>Proteína</b>	<b>Artrópodo</b>	<b>Referencia</b>
60	5'Nucleotidasa	<i>Lu. longipalpis</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Prates 2008
53	Adenosindeaminasa	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Ph. duboscqi</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Katz <i>et al.</i> , 2000, Kato <i>et al.</i> , 2007.
48	Proteína YELLOW / Serpin proteasas	<i>Lu. longipalpis</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004
36	Apirasa	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Ph. ariasi</i> , <i>A. aegypti</i> , <i>C. lectularius</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004 Champagne <i>et al.</i> , 1995, Valenzuela <i>et al.</i> , 1998 Valenzuela <i>et al.</i> , 2001, Prates <i>et al.</i> , 2008
32	D7/Tioesterasa	<i>Lu. longipalpis</i>	Valenzuela <i>et al.</i> 2001, Bahia <i>et al.</i> , 2007, Valenzuela <i>et al.</i> , 2004,.
29	D7 / proteína unión a colágeno	<i>Lu. longipalpis</i> / <i>P. papatasi</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2004, Prates <i>et al.</i> , 2008
20	Triabina	Triatominos	Noeske-J <i>et al.</i> , 1995
16	SP15-specific	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>A. Aegypti</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2001

responsable de la regulación de la respuesta inmune del insecto (Tabla 5). Las apirasas por sus importante actividad enzimática como ADPasa y ATPasa, la hace atractiva como agente terapéutico para el tratamiento de patologías trombóticas así como un reactivo para una gran variedad de propósitos de investigación.

**Figura 11.** Perfil electroforético de *Lu. ayrozai* indicando de forma presuntiva las proteínas que guardan similitud con las registradas en la literatura. No fue tenido en cuenta para este ensayo el uso de un control positivo.



**Tabla 6.** Fracciones antigénicas en *Lu. ayrozai* con peso molecular igual a péptidos antigénicos encontrados en otros estudios.

Peso kDa.	Posible Proteína	Artrópodo	Referencia
48	Proteína Yellow	<i>Lu. longipalpis</i>	Bahía <i>et al.</i> , 2007, Gomes <i>et al.</i> , 2002
35	Apirasa	<i>Lu. longipalpis</i> ,	Gomes <i>et al.</i> , 2002
32	Lulo D7	<i>Lu. longipalpis</i>	Valenzuela <i>et al.</i> 2001, Bahía <i>et al.</i> , 2007.
16	Anticoagulante	<i>Lu. longipalpis</i>	Gomes <i>et al.</i> , 2002

La fracción de 53 kDa. podría tratarse de una adenosina deaminasa (ADA), que metaboliza adenosina a inosina, mientras que proteínas de 60 - 61 kDa. tendrían similitud con proteínas encontradas en *Lu. longipalpis*, posiblemente pertenecientes a la familia de 5'-nucleotidasas que hidrolizan los enlaces fosfodiésteres, incrementando la concentración de cAMP, inhibidor de la agregación plaquetaria (Tabla 5). Las proteínas que presentaron una mayor concentración fueron las fracciones de 16, 29, 36 kDa. seguidas de la fracción de 48 y 60 kDa. Los componentes proteicos de 168 a 102 kDa. no tienen registros en la literatura, las que podrían corresponder a proteínas del epitelio glandular. Se ilustran en la figura 11 el perfil de proteínas obtenidas en nuestro estudio y que guardan congruencia con las descritas en la literatura.

La antigenicidad de las fracciones proteicas usando sueros de caninos con serología negativa para leishmaniasis, sucedió con las bandas de 64, 60, 53, 48, 32, 16 kDa., destacándose la de 60 kDa. que es exclusiva en este grupo. La detección de la banda de 32 kDa es semejante a la obtenida en *Ph. papatassi* que confiere efecto protector a la transmisión de *Leishmania spp.* Este antígeno se cree puede inhibir la infección de parásitos y fue identificada como LuLo-D7 en *Lu. longipalpis* (Tabla 6). En este caso esta molécula puede ser tenida en cuenta para análisis posteriores dada su importante papel en los estudios experimentales con parásitos. No se detectó la antigenicidad de las proteínas de 36 y 48 kDa., aunque en reportes previos son reconocidas por sueros de humanos expuestos y han sido propuestas como posible vacuna contra la infección por *Leishmania chagasi* (Bahía *et al.*, 2007). En otros estudios previos con sueros de humanos y perros usando saliva de *Lu. longipalpis*, observaron fracciones antigénicas de 45, 44, 43, 36, 27 y 16kDa. (Rohousava *et al.*, 2005; 2000, Gomes *et al.*, 2007; 2002, Bahía *et al.*, 2007, Barral *et al.*, 2000). Las proteínas que son reconocidas sirven además como marcadores de exposición o marcador de riesgo en la transmisión de *Leishmania spp* en áreas endémicas (Rohoušová *et al.*, 2005).

## 8. CONCLUSIONES

El establecimiento de condiciones experimentales en campo para el procesamiento de glándulas salivales de especímenes silvestre permitió un abundante registro y captura de ejemplares de *Lu. ayrozai* en zona de bosque para la extracción de saliva, no obstante la cantidad de saliva registrada en los ejemplares no permitió obtener una muestra del contenido salival homogéneo en todos los muestreos y tratamientos dada la diferencia en la madurez de las hembras colectadas. Sin embargo se logró obtener un contenido salival que permitió desarrollar los diferentes ensayos con las proteínas salivales.

La obtención de las muestras del lisado de glándulas salivales de *Lu. ayrozai* permitió detectar la presencia de 12 proteínas salivales en los perfiles electroforéticos aunque estos difirieron en su contenido en épocas distintas del año y de acuerdo a su madurez y longevidad de los especímenes procesados. El contenido proteico encontrado en la saliva de *Lu. ayrozai* se pudo comparar en un contexto general con las moléculas obtenidas en otros estudios presentando una consistente similitud en pesos molecular con las proteínas salivales de *Lu. longipalpis* y otros insectos, que permite un acercamiento presuntivo a las propiedades de algunas de las moléculas en flebótomos neotropicales. Las proteínas de mayor peso molecular 168, 123 y 102 kDa., son proteínas que consideramos hacen parte del tejido glandular por cuanto no han sido registradas en estudios previos.

El estudio logró determinar una abundante presencia de proteínas de 36, 29 y 16 kDa. en los perfiles electroforéticos seguido del registro de fracciones de 64, 60, 53, 48, 32, 20 kDa. las cuales no tuvieron una aparición homogénea en todos los lisados hechos. Varias proteínas salivales presentaron acción antigénica: 64, 60, 53, 48, y 32 kDa., sin embargo no todos los sueros reaccionaron a los antígenos.

Con los resultados obtenidos se abre la posibilidad de indagar más profundamente sobre proteínas de 64, 60, 53, 48, 32 y 16 kDa. mediante técnicas más sofisticadas y sensibles, que podrían ser útiles como marcadores de exposición de los animales domésticos al vector. Presumiblemente se podría indicar que las proteínas encontradas de 36, 29 y 20 kDa., no son antigénicas y sobre las cuales se podría presumir una actividad moduladora a la respuesta inmune.

La proteína de 60 kDa. únicamente presentó antigenicidad en sueros de perros negativos, un aspecto que resulta de interés y genera interrogantes respecto a su posible actividad en el reconocimiento celular como producto antigénico. Con un análisis exhaustivo se puede definir si representa un atributo molecular que sea reconocido por el sistema inmune del hospederos y que permite generar un mecanismo de protección.

## BIBLIOGRAFIA

Abebe M., Cupp M.S., Champagne D., Cupp E.W. Simulidin: a Black Fly (*Simulium vittatum*) Salivary Gland Protein with Anti-thrombin Activity. En: J. Insect Physiol. 1995. vol. 41 no. 11, p. 1001-1006.

Afonso M.M.S., Costa W.A., Azevedo A.C.R., da Costa S.M., Vilela M.L., Rangel E.F. Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Tatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil. En: Cad. Saúde Pública. 2007. Vol. 23 no. 3, p. 725-730.

Ahmed S.B., Chelbi I., Kaabi C., Cherni S., Derbali M., Zhioua E. Differences in the Salivary Effects of Wild-Caught Versus Colonized *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) on the Development of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. En: J. Med. Entomol. 2010. vol. 47 no. 1, p. 74-79.

Alexander B., Ferro. C., Young D.G., Morales A. Tesh R.B. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* in northeastern Colombia. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992. vol. 87 no. 3, p. 387-395.

Anderson J.M, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, Lawyer P, Garfield M, Pham M, Valenzuela JG. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. En: BMC Genomics. 2006. vol. 15 no. 7, p. 52.

Andrade B.B., Teixeira C.R., Barral A., Barral-Netto M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. En: Acad. Bras. de Ciê. 2005. vol. 77, no.4 665-693.

Arévalo A., Carranza J. C., Guhl F., Vallejo G.A. Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (hemiptera, reduviidae, triatominae). En: Biomedica 2007. vol. 27, Supl. 1, p. 137-42.

Azevedo A.C.R., Costa S.M., Pinto M.C.G., Souza J.L., Cruz H.C. Vidal J. Rangel E.F. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. En: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008. vol. 103, no. 8, p. 760-767.

Bahía D., Figueiredo G.N., Rodríguez León I., Perales J., Pereira M.H., Oliveira N. E.G., Corrêa-Oliveira R., Barbosa-Reis A. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. En: Parasitol Res. 2007. vol. 100, p. 449–454.

Barral A., Honda E., Caldas A., Costa J., Vinhas V., Rowton E.D., Valenzuela J.G., Charlab R., Barral-Netto M., y Ribeiro J.M. Human immune response to sandfly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000. Vol. 62 p. 740-745.

Bejarano E.E. Lista Actualizada de Psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Folia Entomol. Mex. 2006. vol. 45 no. 1, p. 47-56.

Belkaid Y., Valenzuela J.G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks DL., Ribeiro JMC. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. vol. 97, no. 12, p. 6704-9.

Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J., y Sacks D. L. 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. En: J. Exp. Med. 1998. vol. 188, no. 10, p. 1941-53.

Cabrera O. L., Mosquera L., Santamaría E., Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamentode Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. En: Biomédica. 2009. vol. 29 no. 1, p. 73-86.

Cerná P., Mikes L., Volf P. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). En: Insect Biochem Mol Biol. 2002. vol. 32, no. 12, p. 1691-1697

Chagas A.C., Fernandes-Mederiros J., Astolfi S.V., Py-Daniel V. Anticoagulant activity in salivary gland homogenates of *Thyrsofelma guianense* (Diptera: Simuliidae), the primary vectorof onchocerciasis in the Brazilian Amazon. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2010. vol. 105, no.1, p. 174-178,

Champagne D.E., Ribeiro J.M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. vol. 91, no.1, p. 138-42.

Champagne D.E., Smartt C.T., Ribeiro J.M., James A.A. The salivary gland specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. vol. 92, no. 3, p. 694-8.

Champagne D.E. Antihemostatic molecules from Saliva of Blood-Feeding Arthropods. En: Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2005. vol. 534, no. 4-5, p. 221-7.

Chaniotis B.H. Sugar-Feeding Behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) Under Experimental conditions. En: J. Med. Entom. 1974. vol. 11, no. 1, p. 73-79.

Chaniotis B.N. A new method for rearing *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), With observations on its development and behavior in the Laboratory. En: J. Med. Entomol. 1975. vol. 12, no. 2, p. 183-188.

Chaniotis B.H. Successful Colonization of Sandfly *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) with enhancement of its gonophoric activity. En: J. Med. Entomol. 1986. vol. 23, no. 2, p. 163-166

Chaniotis N., Neely J., Correa M., Tesh R., Johnson K. Natural Populations Dynamics of Phlebotomine Sandflies in Panama. En: J. Med. Entomol. 1971. vol. 8, no. 4, p. 339-352.

Charlab R., Valenzuela J.G., Rowton E.D., Ribeiro J.M.C. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. En: Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1999. vol. 96, p. 15155-15160.

Charlab R., Rowton E.D., Ribeiro J.M.C. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. En: Exp. Parasitol. 2000. vol. 95, p. 45-53.

Ciprandi A., Horn F., Termignoni C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. En: Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2003. vol. 25, no4, p. 250-262.

Clements M.F., Gidwani K., Kumar R., Hostomska J., Dinesh D.S., Kumar V, Das P., Müller I, Hamilton G., Volfova V., Boelaert M., Das M, Rijal S., Picado A., Volf

P., Sundar S., Davies C. R., Rogers M E. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. En: Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010. vol. 82, no. 5, p. 801–807.

Costa DJ, Favali C, Clarencio J, Afonso L, Conceicao V, Miranda JC, Titus RG, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn CI. Lutzomyia longipalpis salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. En: Infect. Immun. 2004. vol. 72, no. 3, p. 1298–1305.

Cupp M.S., Ribeiro J.M.C., Cupp E.W. Vasodilative activity in black fly salivary glands. A. En: J. of Trop. Med. and Hyg., 1994. vol. 50, p. 241-246.

Cupp M.S., Ribeiro J.M.C., Champagne D., Cupp. E.W. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. En: J. Exp. Biol. 1998. vol. 201, p. 1553–1561

Dantas T.F. Review. Canine leishmaniosis in South America. En: Parasit Vectors. 2009. vol. 2, Suppl. 1, p. 1-8

Demeure C. E., Brahim K., Hacini F., Marchant F., MécheriSt.-Mezard J.-F. N., Paul B. G. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory Response and Lymph Node Hyperplasia. En: J. Immunol. 2005. vol. 174, no. 7, p. 3932-3940.

Eggenberger M., Born W., Zimmermann U., Lerner E.A., Fischer J.A., Muff R. Maxadilan interacts with receptors for pituitary adenylyl cyclase activating peptide in human SH-SY5Y and SK-N-MC neuroblastoma cells. En: Neuropeptides. 1999. vol. 33 no. 2: 107-114.

Faudry E., Lozzi S. P., D'Souza A. S., Kieffer S., Felix C. R., Ricart C. A. Sousa M. V. Vernet T. *Triatoma infestans* Apyrases Belong to the 5-Nucleotidase Family. En: J. Biol. Chem. 2004. vol. 279, no. 19, p. 19607–19613.

Fernández A. M.J (Rev). Atlas de Fisiología. Versión I en español de la 5a edición de la obra original en alemán *Taschenatlas der Physiologic*. MI Georg Thieme Verlag. Ediciones Harcourt, S.A. Madrid. España. 2001. p. 785

Ferrer V.D., Jorge F.C., García R.E., Martínez A.P.F. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. En: Medisan. 1998. vol. 2, no. 3, p. 45-53.

Fuentes-Prior P, Noeske-Jungblut C, Donner P, Schleuning WD, Huber R, Bode W. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. En: Proc Natl Acad Sci USA. 1997. vol. 94, p. 11845– 11850.

Furie B, Furie B.C. Molecular basis of blood coagulation. En: Churchill Livingstone ed. Hematology: Basic Principles and Practice. Hoffman R. 3rd Ed. 2000. p. 1783-1803.

Galatti E. apostila é uma atualizacão do capítulo 2- Morfología e Taxonomía: 2,1, Classificacão de Phlebotominae, p. 23-51 e 2.2 Morfología, terminología de adultos e identificacão dos táxons da América. 2009. p. 53-75. In Rangel EF & Lainson R. (org.) Flebotómíneos do Brasil, Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2003, 367 p.

García G.A., Clavijo D., Mejía O.R., García A., Vittorino M., Casadiego C.A., Hernández S., Cobos C., Tovar J., Rey C.A., Zamudio C. Aspectos biomédicos de

la familia de las lipocalinas. En: Universitas Médica. 2007. vol. 48, no. 2, p. 118-128.

Gillespie R.D., M bow M.L., Titus R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. En: Parasit Immun. 2000. vol. 22, p. 319-331.

Gomes A.C., Galati E.A. B. Aspectos ecológicos da Leishmaniose tegumentar americana. 7- Capacidade vectorial flebotomínea em ambiente florestal primario do sistema da Sierra do Mar, Regiao, do vale do ribera, estado de Sao Paulo, Brasil. En: Rev. Saúde Públ. São Paulo. 1989. vol. 23, no. 2, p. 136 – 142.

Gomes, R.B., Brodskyn C., de Oliveira C.I., Costa J., Miranda J.C., Caldas A., Valenzuela J.G., Barral-Netto M., y Barral A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-Leishmania chagasi delayed-type hypersensitivity. En: J. Infect. Dis. 2002. vol. 186, no.10, p. 1530-1534.

Gomes R.B., Mendonc I.L., Silva V.C., Ruase J., Silva M.B., Cruzd M.S.P., Barral A., Costa C.H.N. 2007. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. En: Trans R. Soc. Trop. Med. and Hyg. vol. 101, no. 2, p. 127-133.

González L., Vélez I.D. Tratamiento con Miltefosina de la leishmaniosis cutánea diseminada. En: Biomédica. 2006. vol. 26, Supl. 1, p. 13-16.

Hamasaki R., Kato H., Terayama Y., Iwata H., Valenzuela J.G. Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. En: J. Insect Physiol. 2009. vol. 55, no. 11, p. 1044–1049.

Higgs G.A., Vane J.R., Hart R.J., Porter C., Wilson R.G. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina, Ixodidae). En: Bull. Entomol. Res. 1976. vol. 66, p. 665– 670.

Holdridge, L.R. Ecología basada en zonas de vida. 1er. Ed (5ta reimp). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2000. 216 p. ISBN 92-9039-131-6.

Jackson T.S., Lerner E., Weisbrod R.M., Tajima M., Loscalzo J., Keaney J.F Jr. Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. En: Am. J. Physiol. 1996. vol. 271, no. 3, p. 924-930.

Jones L. D., Hodgson E., y Nuttall P. A. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. En: J. Gen. Virol. 1989. vol. 70, p. 1895-1898

Kato H., Jochim R.C., Lawyer P.G., Valenzuela J.G. Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan. Africa. J. Exp. Biol. 2007. vol. 210, no. 5, 733-740.

Katz O., Waitumbi J.N., Zer R., Warburg A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. En: Am. J. Trop Med. Hyg. 2000. vol. 62, no. 1, p. 145-50.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: A review. En: Med. & Vet. Entomol. 1990. vol. 4, p. 1-24.

Killick-Kendrick R. The biology and control phlebotomine sand flies. En: Clinics in Dermatology. 1999. vol. 17, no. 3, p. 279–289.

Lainson R., Shaw J.J. *Leishmania (Vianna) naiffi* sp. n., a parasite of armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. En: Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1989. vol. 64, p. 3-9.

Lainson R., Shaw J.J., Silveira F.T., de Souza A.A., Braga R.R., Ishikawa E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the, eco-epidemiology of the disease in amazonia. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1994. vol. 9, no. 3, p. 435-443.

Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, R.J., Lerner, M.R., Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. En: J. Biol. Chem. 1991. vol. 266, no. 17, p. 11234-36.

Lerner E.A., Shoemaker C.B. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. En: J. Biol. Chem. 1992. vol. 267, no. 2, p. 1062-1066.

Moreira M.A.B., Luvizotto M.C.R., Garcia J.F., Corbett C.E.P., Laurenti M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. En: Vet. Parasit. 2007. vol. 145, no. 3-4, p. 245–252.

Moro O., Lerner E. A. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. En: J Biol. Chem. 1997. vol. 272, no.2, p. 966-70.

Morris R.V., Shoemaker C.B., David J.R., Lanzaro G.C., y Titus R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. En: J. Immunol. 2001. vol. 167, no. 9, p. 5226-5230.

Muñoz G., Davies C. *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. En: Biomédica. 2006. vol. 26, Supl. 1, p. 133-144.

Naiff, R.D.; Freitas, R.A.; Naiff, M.F.; Arias, J.R.; Barrett, T.V.; Momen, H.; Grimaldi, G.Jr. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1991. vol. 86, no. 3, p. 317-321.

Noeske-J.C., kratzschmar J., Haendler B., Alagon A., Possani I., Verhallen P., Donner P., y Schleuning W. D. Aninhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. En: J. Biol. Chem. 1994. vol. 269, no. 7, p. 5050– 5053.

Oliveira F., Kamhawi S., Seitz A.E., Phama V.M., Guigal P.M., Fischer L., Ward J., Valenzuela J.G. From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library . En: Vaccine. 2006. vol. 24, no. 3, p. 374–390.

Oliveira F., Jochim R.C., Valenzuela J.H., Kamhawi H. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. En: Parasitology International. 2009. vol. 58, no. 1, p. 1–5.

Pereira MH, Souza ME, Vargas AP, Martins MS, Penido CM , Diotaiuti L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). En: Acta Trop. 1996. vol. 61: 255– 261.

Prates D.B., Santos I.D., Miranda J.C., Souza A.P.A., Palma M.S., Barral-N M. Barral S. Changes in Amounts of Total Salivary Gland Proteins of *Lutzomyia*

longipalpis (Diptera: Psychodidae) According to Age and Diet. En: J. Med. Entomol. 2008. vol. 45, no. 3, p. 409-413.

Porter C.H., DeFoliart R. The man biting activity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a tropical wet forest environment in Colombia. En: Arq.Zool., Sao Pablo. 1981. vol. 30, p. 81-158.

Rangel E.F., Azevedo A.C., Andrade C.A., Sousa N.A., Wermelinger E.D. Studies on sandfly fauna (Diptera:Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro, Brazil. En: Mem. Int. Oswaldo Cruz. 1990. vol. 85, no. 1, p. 39-45.

Rangel E.F y Lainson R. (Eds) Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, FIOCRUZ. 2003. 367 p.

Reithinger R, Davies CR: Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. En: Am J Trop Med Hyg. 1999, vol. 61, p. 530-541.

Ribeiro J.M.C., Rossignol P.A., Spielman A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly *Lutzomyia longipalpis*. En: Comp. Biochem. Physiol. 1986. vol. 83, no. 4, p. 683 -686.

Ribeiro J.M.C. Role of Saliva in Tick/Host Interactions. En: Experimental & Applied Acarology. 1989. vol. 7, p. 15-20

Ribeiro J.M.C., Ariz T., Lerner E., Remold H. Vasodilatory peptides from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Patent number: 5.397.772. code: US005397772A.

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

Ribeiro J.M.C., Rowton E.D., Charlab R. The salivary 5'-nucleotidase / phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. Insect En: Biochem. Mol. Biol. 2000. vol. 30, p. 279-285.

Ribeiro J.M.C., Modi G. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes*, *annandalei* and *brunetti*, the main vector of human kala-azar. En: J. Parasit. 2001. vol. 87 no. 4, p. 915-917.

Ribeiro J.M., Francischetti I.M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post sialome perspectives. En: Annu. Rev. Entomol. 2003. vol. 48, p. 73 – 88.

Ribeiro F.C., Schubach A.O., Mouta-Confort E., Schubach T.M.P., Madeira M.F., Marzochi M.C.A. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. En: Vet. Parasit. 2007. vol. 148, p. 200 – 206.

Ribeiro J.M.C., Mans B.J., Arcà B. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. En: Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2010. vol. 40, p. 767-784.

Rohousová I., Volf P., Lipoldová M. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. En: Paras. Immun. 2005. vol. 27, no. 12, p. 469–473.

Rohousová I, Volf P. Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. En: Folia parasitol. 2006. vol. 53, no. 3, p. 161-171

Sandoval C.M. Gutiérrez R., Cárdenas R., Ferro C. Especies del género *Lutzomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. En: Biomédica. 2006. vol. 26, Supl. 1, p. 218 – 227.

Schwarz A., Medrano-M. N., Billingsley P. F., Schaub G.A., Sternberg J.M. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. En: Int. J. Parasitol. 2010. vol. 40, no. 11, p. 1295–1302.

Shaw J.J, Faria D.L, Basano S.A., Corbett E.C.; Rodriguest C.J., Ishikawa E.A., Camargo I.M. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. En: Ann. Trop. Med. Parasitol. 2007. vol. 101, no. 8, p. 681-688.

Silva F.S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos Hematófagos. En: Rev. Tróp Ciên. Agr. e Biol. 2009. vol. 3, no. 3, p. 3 – 17.

Souza N.A., Andrade-C.C.A., Vilela M.L., Rangel E.F. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two atlantic rain forest reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001. vol. 96, no. 3, p. 319-324.

Souza R., Henriquez C. Investigation of a protein expression profile by high-resolution bidimensional electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. En: Anal. Biochem. 2007. vol. 365, no. 1, p. 144-146.

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*. En: J. Biol. Chem. 1998. vol. 273, no. 33, p. 20802 - 20809.

Theodos CM, Titus RG. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. En: Parasit. Immunol. 1993. vol. 15, no. 8, p. 481 - 487.

Titus R.G., Ribeiro J.M.C. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* infectivity. En: Science. 1988. vol. 239, no. 4845, p. 1306-1308.

Titus RG, Theodos CM, Shankar AH, Hall LR. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. En: Immunol Ser. 1994. vol. 60, p. 437-459.

Titus R., 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. En: Exp Parasitol. 1998. vol. 89, no. 1, p. 133–136

Valente M.C.R., Rodriguez de A.A.C., Miranda C.S., Alexandre C.W., y Ferreira R.E. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. En: J. Vector. Ecol. 2002. vol. 27, no. 2, p. 207-214.

Valenzuela J.G., Charlab R., Galperin M.Y., Ribeiro J.M. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. En: J. Biol. Chem. 1998. vol. 273 no. 46, p. 30583-30590.

Valenzuela J.G., Francischetti I.M., Ribeiro J.M. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary antithrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. En: Biochemistry. 1999. vol. 38, no. 34, p. 11209-15.

Valenzuela J.G., Belkaid Y., Garfield M.K., Mendez S., Kamhawi S., Rowton E.D., Sacks D.L., Ribeiro J.M.C. Toward a defined anti- *Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. En: J. Exp. Med. 2001. vol. 194, no. 3, p. 331-342.

Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzalez, E.C., de Miranda-Santos, I. K., Marinotti, O., Francischetti, I. M. and Ribeiro, J. M. The D7 family of salivary proteins in blood-sucking Diptera. En: Insect Mol. Biol. 2002.vol. 11 no. 2, p. 149-155.

Valenzuela J.G., Garfield M., Rowton E.D., Pham V. M. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. En: J. Exp. Biol. 2004. vol. 207, no. 21, p. 3717-3729.

Vaughan J.A., Scheller L.F., Wirtz R.A., y Azad A.F. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials. En: Infect. Immun. 1999. vol. 67, no. 8, p. 4285-4289.

Velasco S, López-Pedreira C. Activación de la vía extrínseca de la coagulación en la coagulación intravascular diseminada: fisiopatología y control terapéutico. En: Rev Iberoamer Tromb Hemost. 2000. vol. 13, Supl. 1, p. 99-102.

Viveros R.J., bejarano E.E., Castro M., Vélez A., Pérez J.E., Pérez-Doria A., Vélez I.D. y Carrillo L.M. Trece registros nuevos de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae)

para el departamento de Vichada, Orinoquia Colombiana. En: Biota Neotrop, 2009. vol. 10, no. 2, p. 401-404.

Viso M, López Fernandez MF. Coagulopatías. Criterios diagnósticos y tratamiento. En: Medicine. 2001. vol. 53, no. 8, p. 2809-2816.

Volf P, Tesarová P, Nohýkova EN. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. En: Med Vet Entomol. 2000. vol. 14, no. 3, p. 251-256.

Volf P., Rohoušová I. Species-specific antigens in salivary glands of Phlebotomine sandflies. En: Parasitology. 2001. vol. 122, no. 1, p. 37–41.

Young D.G., Duncan M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, central and South America (Diptera: Psychodidae). En: Mem. Am. Entomol. Inst. 1994. vol. 54, pp. 1-881.