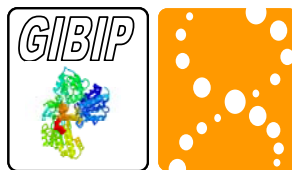


**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS PROTEÍNAS ACTIVAS DE LAS
GLÁNDULAS SALIVALES DE *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi*,
VECTORES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

JENNY LISET RODRÍGUEZ ARDILA

PROYECTO DE GRADO



**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2009**

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS PROTEÍNAS ACTIVAS DE LAS
GLÁNDULAS SALIVALES DE *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi*,
VECTORES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

**Proyecto de grado para optar por el título de
Química**

Autor:

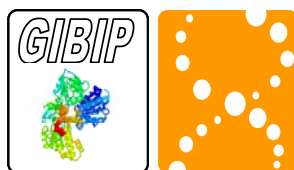
JENNY LISET RODRÍGUEZ ARDILA

Director:

Rodrigo Torres Sáez. PhD.

Co-director:

Gerardo Muñoz Mantilla. PhD.



**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2009

DEDICATORIA

Este triunfo se lo dedico primeramente a Dios, por todas las bendiciones que me ha dado desde el comienzo de mi vida y que de una u otra manera me ayudaron a lograr esta primera meta. En segundo lugar se lo dedico a mi nona, Miriam Jaimes, por haber dedicado parte de su vida en mi enseñanza.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

Al profesor *Rodrigo Torres*, por darme la oportunidad de trabajar en el Grupo de Investigación de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas y por su apoyo y dedicación durante la realización de mi proyecto.

A *César Ariza* por brindarme amor verdadero y hacer mis días más bellos y especiales, por ser irremplazable e inigualable y compartir conmigo todos los momentos de mi vida, triunfos, alegrías y tristezas.

A *Ruth* y *Luz Ángela* por su amistad sincera e incondicional y por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A *Nelson*, *Efraín* y demás amigos de Voley, compañeros de aventuras, por los incontables momentos agradables y por su apoyo emocional siempre que lo necesité.

A *Karime*, *Angelita*, *Saúl* y *Johanna* por compartir conmigo gratos e inolvidables momentos.

Y a todos aquellos que de una u otra manera compartieron conmigo, durante mi vida universitaria, y quienes sé que se alegran por mi logro.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
3. ESTADO DEL ARTE	3
3.1. Marco teórico	3
3.1.1. Componentes salivales presentes en flebótomos	4
3.1.2. Propiedades inmunomoduladoras de la saliva de flebótomos	11
3.1.3. Rol de la saliva de los flebótomos en la transmisión de leishmaniasis	12
3.2. Técnicas empleadas en el estudio	16
3.2.1. Electroforesis SDS-PAGE 1-D	16
3.2.2. Inmunotransferencia	18
4. HIPOTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. PARTE EXPERIMENTAL	27
5.1. Captura e identificación de <i>Lutzomyia spp</i>	27
5.2. Obtención y ruptura de glándulas salivales	28
5.3. Obtención del perfil proteico	29
5.4. Tinción con fluorescencia (SYPRO RUBY)	31
5.5. Identificación de proteínas antigénicas por inmunotransferencia	31
5.6. Análisis de los perfiles proteicos obtenidos de la saliva de las dos especies.	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
6.1. Determinación del perfil proteico de diferentes especies de <i>Lutzomyia</i>	35
6.2. Determinación de la capacidad antigénica de las proteínas salivales de diferentes especies de <i>Lutzomyia</i> .	40
7. CONCLUSIONES	58
8. RECOMENDACIONES	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- **Lu:** *Lutzomyia*
- **Le:** *Leishmania*
- **An:** *Anopheles*
- **LGS:** lisado de glándula salival
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- **HEPES:** Ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
- **BSA:** Albúmina de suero bovino
- **TBS:** Buffer Tris Salino
- **Ph:** *Phlebotomus*
- **IL:** Interleucina
- **CGRP:** Péptido derivado del gen de la calcitonina
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral tipo alfa

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Esquema general de la hidrólisis del ATP.	5
Esquema 2. a) Esquema general de la hidrólisis del AMP.	7
Esquema 3. Esquema general de la conversión de adenosina por acción de la adenosina deaminasa ADA.	9
Esquema 4. Acción de la fosfatasa alcalina con su sustrato específico BCIP.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen de un flebotomotomo macho del género Lutzomyia.	4
Figura 2. Estructura tridimensional de apirasa humana (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1s18.pdb).	5
Figura 3. Estructura tridimensional de 5'-nucleotidasa en su forma abierta (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1hp1.pdb).	6
Figura 4. a) Estructura de las unidades que conforman al ácido hialurónico. b) Estructura tridimensional de la proteína Hialuronidasa (Tomada de Protein Data Bank. Código: 1fcu.pdb).	8
Figura 5. Estructura tridimensional de la adenosina deaminasa en complejo con la adenosina (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1vfl.pdb).	9
Figura 6. Estructura tridimensional de a) Interleucina 4 (IL-4) b) IL-10 c) IL-6. (Tomadas de Protein Data Base códigos: 1iti.pdb, 2h24.pdb, 1il6.pdb).	14
Figura 7. Estructura química del gel de poliacrilamida.	17
Figura 8. Separación de proteínas en SDS-PAGE.	17
Figura 9. Representación de la reacción antígeno-anticuerpo y su detección.	18
Figura 10. Transferencia de proteínas del gel a la membrana.	19
Figura 11. Estructura de la inmunoglobulina G (a) Combinación de las cadenas livianas y pesadas para formar una molécula en forma de Y. Los sitios de enlace al antígeno son formados por la combinación de dominios variables de una cadena liviana (V_L) y una cadena pesada (V_H). (b) Enlace de la Inmunoglobulina G a un antígeno. Para generar un ajuste óptimo para el antígeno, los sitios de unión sufren ligeros cambios conformacionales. Estos ajustes son comunes en las interacciones proteína-ligando.	20
Figura 12: Estructura de la fosfatasa alcalina. (Tomada de Protein Data base código: 1alk.pdb).	21
Figura 13. Sustratos específicos para la fosfatasa alcalina	22

Figura 14. Sistema de captura y almacenamiento de <i>Lutzomyia spp.</i>	28
Figura 15: Disección de las glándulas salivales de <i>Lutzomyia gomezi</i> utilizando un estereoscopio.	28
Figura 16: Corrida de las muestras en la cámara de electroforesis.	30
Figura 17: Montaje para la inmunotransferencia.	33
Figura 18: Imagen del programa Quantity one.	34
Figura 19: Gel de 14% de SDS-poliacrilamida de los LGS de: (A) <i>Lu. trapidoi</i> provenientes del Playón, Santander, (C) <i>Lu. gomezi</i> y (B) <i>Lu. ayrozai</i> .	36
Figura 20: Gel de 14% de SDS-poliacrilamida de LGS de <i>Lu. trapidoi</i> proveniente de Landázuri, Santander. (A) Marcador de peso molecular Invitrogen.	37
Figura 21: Gel de SDS-PAGE al 14% (Tinción con Sypro Ruby) con LGS de: (A) <i>Lu. trapidoi</i> , (B) <i>Lu. gomezi</i> .	39
Figura 22: Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar con sueros de perros infectados y no infectados con <i>Leishmania</i> . Línea 1: Suero 22 (+), Línea 2: suero 67 (-). LGS de: (A) <i>Lu. gomezi</i> , (B) <i>Lu. trapidoi</i> , (C) <i>Lu. ayrozai</i> .	41
Figura 23: Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar con sueros de perros infectados y no infectados con <i>Leishmania</i> . Línea 1: Suero 34 (+), Línea 2: suero 25 (+), línea 3: suero 27 (+). LGS de: (A) <i>Lu. gomezi</i> , y (B) <i>Lu. trapidoi</i> .	43
Figura 24: Bandas obtenidas al incubar, con sueros de perros infectados (+) y no infectados (-), LGS de: (A) <i>Lu. trapidoi</i> , (B) <i>Lu. gomezi</i> .	44
Figura 25: Bandas obtenidas al incubar LGS de: (A) <i>Lu. trapidoi</i> con sueros de perros positivos y (B) LGS de <i>Lu. gomezi</i> con sueros negativos y positivos.	46
Figura 26: Bandas obtenidas al incubar LGS de <i>Lu. gomezi</i> con sueros de perros. A) perros seronegativos, B) perros seropositivos y C) perros seropositivos y seronegativos.	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Componentes y volúmenes para el gel de separación.	29
Tabla 2. Composición buffer de corrido.	30
Tabla 3. Composición de la solución colorante y decolorante.	31
Tabla 4. Composición buffer de transferencia.	32
Tabla 5. Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la inmunotransferencia.	32
Tabla 6. Composición del sustrato y buffer de la enzima	33
Tabla 7. Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para <i>Lu. trapidoi</i> y <i>Lu. gomezi</i> .	36
Tabla 8. Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para <i>Lu. trapidoi</i> y <i>Lu. gomezi</i> .	39
Tabla 9. Proteínas reconocidas, en los LGS de cada especie de <i>Lutzomyia</i> . Línea 1: suero positivo y línea 2: suero negativo.	42
Tabla 10. Proteínas reconocidas, en el LGS de: A) <i>Lu. gomezi</i> y (B) <i>Lu. trapidoi</i> , por tres sueros positivos (Líneas 1, 2 y 3).	42
Tabla 11. Proteínas reconocidas, en el LGS de cada especie de <i>Lutzomyia</i> , por sueros positivos (DVS05-DVS07) y sueros negativos (26-338).	45
Tabla 12. Proteínas reconocidas en el LGS de: (A) <i>Lu. trapidoi</i> por los perros seropositivos y en (B) <i>Lu. gomezi</i> por los sueros positivos (DVS22-PA27) y sueros negativos (16-30).	47
Tabla 13. Proteínas reconocidas en el LGS de <i>Lu. gomezi</i> por: A) sueros negativos codificados del 143 al 604, B) sueros positivos codificados del PYA4 al DVS37 y C) sueros positivos y negativos codificados del DVS40 al 32.	49

- Tabla 14.** Proteínas en kDa reconocidas por los perros infectados y no infectados con *Leishmania spp.* (SP = sueros positivos, SN = sueros negativos). (*. Se evaluaron 19 perros seropositivos con el LGS de *Lu. trapidoi*; **. Se evaluaron 7 perros seronegativos con el LGS de *Lu. trapidoi*). 52
- Tabla 15.** Proteínas en kDa reconocidas por los perros infectados y no infectados con *Leishmania spp.* (SP = sueros positivos, SN = sueros negativos). 52

Título: CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS PROTEÍNAS ACTIVAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi*, VECTORES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA*

Autor: RODRÍGUEZ ARDILA, Jenny Liset**

Palabras claves: *Lutzomyia*, leishmaniasis, proteínas salivales, anticuerpos, sueros.

Contenido:

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania spp* y transmitida a humanos y animales por la picadura de flebótomos infectados. Esta infección representa un grave problema de salud pública en el sur de América y sin embargo, aún no se cuenta con una vacuna.

Los flebótomos se alimentan de fuentes de azúcar, pero las hembras toman como alimento sangre para la maduración de sus huevos. La toma de sangre es precedida por la salivación de éstas con el fin de facilitar la hemorragia del hospedero, ya que su saliva posee una diversidad de proteínas con actividad biológica anticoagulante, antiplaquetaria y vasodilatadora. Además, se ha demostrado que la inyección de la saliva, al momento de la toma del alimento, aumenta la transmisión de *Leishmania spp* y la severidad de la lesión. Pero nuevas investigaciones han probado que proteínas salivales inoculadas por los flebótomos, estimulan la producción de altos niveles de anticuerpos anti-saliva, generando así, un grado de protección contra la infección. Es por ello que en este trabajo identificamos, de manera preliminar, las proteínas salivales de *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia trapidoi*, vectores de leishmaniasis, que generaron una respuesta inmune en sueros de perros infectados con *Leishmania spp*, con el fin de buscar proteínas inmunogénicas que, a futuro, tengan usos farmacéuticos o sean candidatos para un tratamiento contra la infección.

Se encontraron proteínas salivales de diferente masa molecular en *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, que son consistentes con las encontradas en otros flebótomos. Las proteínas con mayor frecuencia de reconocimiento presentan masas moleculares de 18 kDa, 33-35 kDa, 45 kDa y 61-63 kDa. Los resultados obtenidos indicarían un grado de conservación de algunas familias de proteínas presentes en las glándulas salivales, tales como apirinas, YELLOW y 5'-nucleotidasas. Probablemente, estos componentes son claves para el desenvolvimiento favorable en la alimentación, así siendo indispensables para la supervivencia del flebótomo.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. Gerardo Muñoz Mantilla, Ph.D

Title: PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE ACTIVE PROTEIN OF THE SALIVARY GLANDS OF *Lutzomyia gomezi* AND *Lutzomyia trapidoi*, VECTORS OF DERMAL LEISHMANIASIS*

Author: RODRÍGUEZ ARDILA, Jenny Liset**

Keywords: *Lutzomyia*, leishmaniasis, salivary proteins, antibodies, sera.

Content:

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania spp* and transmitted to humans and animals by the bite of infected sand flies. This infection is a serious public health problem in South America, however, still does not have a vaccine.

Sand flies feed on sugar sources, but the females take blood as food for the maturation of their eggs. The taking of blood is preceded by salivation them to facilitate bleeding of the host, as their saliva has a diversity of biologically active proteins with anticoagulant, antiplatelet and vasodilator. Furthermore, it has been shown that injection of the saliva at the time of the seizure of food, increases the transmission of *Leishmania spp* and the severity of the injury. But new research has shown that salivary proteins inoculated by sand flies, they stimulate the production of high levels of anti-saliva, thereby generating a degree of protection against infection. That is why in this work we identified, on a preliminary basis, the salivary proteins of *Lutzomyia (Lu.) gomezi* and *Lutzomyia trapidoi*, vectors of leishmaniasis, which generated an immune response in sera from dogs infected with *Leishmania spp*, to search for immunogenic proteins that future, have pharmaceutical uses or are candidates for treatment against infection.

We found salivary proteins of different molecular mass in *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi*, which are consistent with those found in sand flies. The proteins most frequently recognized show molecular masses of 18 kDa, 33-35 kDa, 45 kDa and 61-63 kDa. The results indicate a degree of conservation of some families of proteins present in the salivary glands, such as apirases, YELLOW and 5'-nucleotidasas. Probably, these components are important to the favorable development in food, and being indispensable to the survival of the sand flies.

* undergraduate thesis

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Rodrigo Torres Sáez, *Ph.D.* Gerardo Muñoz Mantilla, *Ph.D*

INTRODUCCIÓN

Una de las formas que han desarrollado los mosquitos para evadir los procesos inmunológicos celulares de los organismos vertebrados, es el desarrollo de estrategias moleculares de evasión de la respuesta inmune, principalmente a través de la expresión de moléculas con actividad biológica anticoagulante, antiplaquetaria y vasodilatadora. En este sentido, se han realizado muchos esfuerzos en caracterizar algunas de estas moléculas biológicas, especialmente proteínas, las cuales se encuentran presentes en la saliva de artrópodos hematófagos, pero aún existen proteínas secretadas que no han sido caracterizadas debido a la diversidad molecular de estos componentes.

Se han aislado previamente con éxito los componentes de la saliva de hematófagos, tales como *Lutzomyia (Lu.) longipalpis*, *Phlebotomus (Ph.) papatasi*, *Cimex lectularius*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Rhodnius (R.) prolixus* entre otros, y se ha logrado identificar el papel que juegan estos componentes en la transmisión de algunos microorganismos así como sus potenciales usos farmacológicos. Por ejemplo, en el mosquito *Aedes aegypti* se encontró una molécula anticoagulante de 54 kDa que inhibe el factor Xa de la coagulación,¹ mientras que en el mosquito *Anopheles albimanus* está presente una peroxidasa vasodilatadora de 65 kDa.² En el caso de flebótomos se han encontrado apirasa, hialuronidasa, adenosina deaminasa y maxadilan. Estos compuestos no solo ayudan al artrópodo para alimentarse de la sangre del huésped, sino que también facilitan la transmisión de parásitos causantes de enfermedades como la leishmaniasis; sin embargo, su mecanismo de acción no está muy claro.

En la saliva del flebótomo *Lutzomyia longipalpis* se encontró una proteína con propiedades vasodilatadoras. La proteína se caracterizó como una molécula que

¹ Stark, K.R.; James, A. "Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*". En: *Biol Chem*. Vol. **273**, 33 (1998); p. 20802-20809.

² Ribeiro, J.M.C.; Nussenzveig, R.H. "The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito, *Anopheles albimanus*". En: *J. Exp. Biol*. Vol. 179 (1993); p. 273-87.

pesa 6800 Daltons, y se denominó Maxadilan. Esta proteína salival inhibe la respuesta inmune del hospedero generada por los macrófagos facilitando la transmisión de *Leishmania major* y demostró ser capaz de inducir vasodilatación temporal, por tanto, hoy en día, puede ser usada en forma nativa o en fragmentos activos en farmacéutica como fármaco de la respuesta inmune o como potente vasodilatador. Además de estos efectos, se ha mostrado que los reservorios expuestos con anterioridad a los componentes salivales de flebótomos, como por ejemplo *Lutzomyia spp* producen cierto tipo de respuesta inmune contra la infección, lo cual genera, a futuro, posibles estrategias para controlar la transmisión del parásito.

En los países Andinos *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi* se encuentran altamente distribuidas, sirviendo como vectores para la transmisión de *Leishmania panamensis*, parásito causante de leishmaniasis cutánea en el humano. Estos vectores tienen varios tipos de reservorios como lobos, monos y perros, siendo este último el mayoritario y el que representa más riesgo para los habitantes de las áreas endémicas, por su cercanía con los humanos. A pesar del impacto sobre la salud generado por las enfermedades transmitidas por vectores, no se tiene ningún control de éstos ni de los principales reservorios. Por esta razón, el principal interés de este estudio fue identificar, de manera preliminar, las proteínas salivales de estos dos flebótomos, por medio de técnicas electroforéticas y detectar su actividad antigénica al ser reconocidas por sueros de perros infectados con *Leishmania spp.*, con el fin de encontrar proteínas con posibles usos farmacéuticos (Ej. posibles candidatos protectores contra la infección) o con usos en diagnóstico molecular de la infección.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 MARCO TEÓRICO

En los últimos 50 años, gracias a los avances en el campo de la bioquímica, entomología y biología molecular, se ha demostrado que los artrópodos hematófagos han desarrollado estrategias para evadir el sistema hemostático, compuesto por la cascada de coagulación, vasoconstricción y agregación plaquetaria, que presenta sus hospederos. Esas estrategias consisten en una serie de compuestos salivales farmacológicamente activos que inhiben la producción de anticuerpos y/o la respuesta celular pro-inflamatoria del vertebrado para hacer más eficiente la toma de alimento y favorecer la transmisión de patógenos.³ Teniendo en cuenta esto, se han llevado a cabo estudios encaminados a conocer o reconocer específicamente qué moléculas presentes en la saliva de los artrópodos son responsables de dichos mecanismos.

Entre los artrópodos que se han estudiado están los flebótomos, conocidos popularmente como moscas de arena e insectos quemadores. Estos dípteros presentan actividad nocturna y algunos son considerados vectores de la leishmaniasis, la cual es una enfermedad zoonótica causada por protozoarios del género *Leishmania spp.* transmitida a humanos y animales por la picadura de flebótomos infectados. Existen diferentes especies, las cuales se clasifican según la distribución geográfica (*Phlebotomus (Ph.)* en el viejo mundo y *Lutzomyia (Lu.)* en el nuevo mundo)⁴ y la diferenciación taxonómica.

³ Wikel, S. "Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods". En: *Bioscience*. Vol. 49 (1999); p. 311–320.

⁴ Killick-Kendrick, R. "The biology and control of *Phlebotomine* sand flies". En: *Clinics in Dermatology*. Vol. 17 (1999); p. 279-8.

Figura 1: Imagen de un flebótomo macho del género *Lutzomyia* spp.



Los flebótomos se alimentan de fuentes de azúcar, pero las hembras toman como alimento sangre de hospederos para la maduración de sus huevos. La toma de sangre es precedida por la salivación de éstas con el fin de facilitar la hemorragia del hospedero, ya que su saliva posee componentes anticoagulantes y vasodilatadores.

3.1.1 Componentes salivales presentes en flebótomos

La saliva de los flebótomos posee una variedad de sustancias implicadas en la toma de sangre y en la transmisión de la leishmaniasis. Por esto, hoy en día se analiza el contenido salival de estos artrópodos hematófagos con el fin de reconocer los componentes responsables de dichos sucesos.

Los flebótomos poseen en su saliva una proteína fosfatasa conocida como apirasa (Ver **Figura 2**), la cual hidroliza tanto ADP como ATP para producir AMP (Ver **Esquema 1**) y ortofosfato disminuyendo sus concentraciones en el sitio de la lesión y evitando la activación plaquetaria.^{5,6} El AMP antagoniza los efectos pro-inflamatorios del ATP y ADP, porque inhibe alostéricamente la desfosforilación de

⁵ Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Rowton, E.; Ribeiro, J.M. "The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases". En: *J Exp Biol*. Vol. **204**,2 (2001); p. 229-37.

⁶ Ribeiro, J.M.C.; Modi, G.B.; and Tesh, R.B. "Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies". En: *Insect biochem*. Vol. 19 (1989); p. 406-12.

la fosfatasa A, la cual inicia los procesos inflamatorios.⁷ En *Lutzomyia longipalpis* se identificó una proteína de secreción denominada LuloAPY^{8,9} similar a la apirasa salival de 35 kDa, descrita en *Cimex Lectularius*.

Esquema 1: Esquema general de la hidrólisis del ATP.

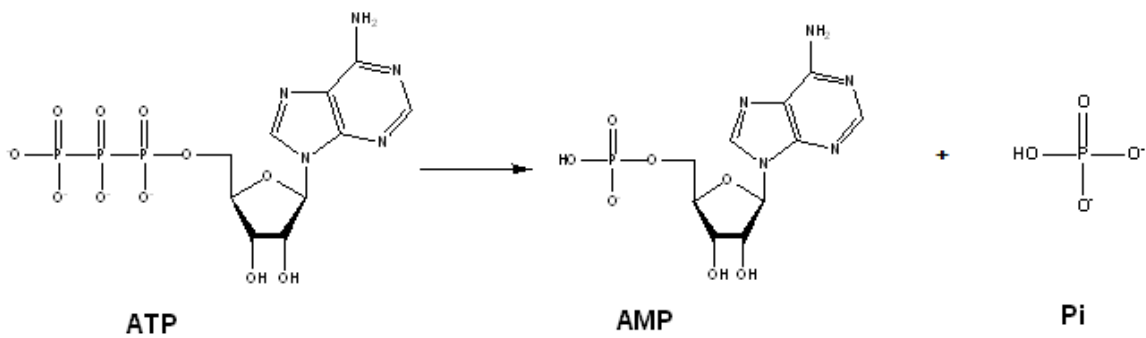


Figura 2: Estructura tridimensional de apirasa humana (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1s18.pdb).



⁷ Ribeiro, J.M.; 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. Vol. **202**, 11 (1999); p. 1551-9.

⁸ Charlab, R.; Valenzuela, J.G.; Rowton, E.D. and Ribeiro, J.M. "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. **96**, 26 (1999); p. 15155-15160.

⁹ Valenzuela, J.G.; Rowton, E.D. "Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*". En: J. Exp. Bio. Vol. **207** (2004); p. 3717-29.

Otras enzimas que hidrolizan el ATP, y que están presentes en la saliva de los flebótomos, son las 5'-nucleotidasas (Ver **Figura 3**). Ellas hidrolizan los enlaces fosfodiésteres, producidos por las apirinasas, generando adenosina,¹⁰ un nucleósido purínico, que generalmente suprime respuestas inflamatorias, regula la producción de citocinas y óxido nítrico (NO) por macrófagos,¹¹ además aumenta la concentración de AMPc, previniendo así, la agregación plaquetaria.

Figura 3: Estructura tridimensional de 5'-nucleotidasa en su forma abierta (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1hp1.pdb).



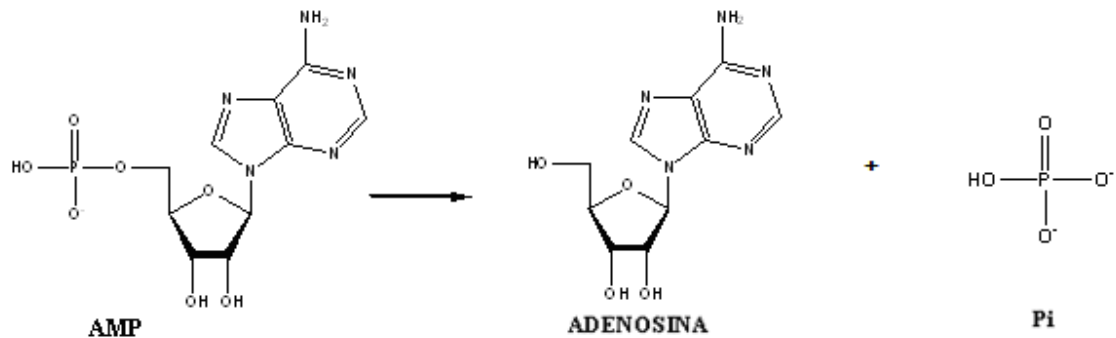
La presencia de 5'-nucleotidasa con actividad fosfodiesterasa en la saliva de *Lu. longipalpis* fue confirmada por Ribeiro y col.¹¹ al realizar la caracterización completa de estas proteínas, realizando ensayos enzimáticos y utilizando cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, la adenosina (Ver **Esquema 2**) además de ser producto de la hidrólisis de las enzimas 5'-nucleotidasas, está

¹⁰ Ribeiro, J.M.C.; Rowton, E.; Charlab, R. "The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*". En: Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 30 (2000); p. 279-85.

¹¹ Katz, O.; Waitumbi, J.N.; Zer, R.; Warburg, A. "Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva". En: Am J Trop Med Hyg. Vol. 62,1 (2000); p. 145-50.

presente en la saliva de los *Phlebotomus papatasi*⁷ y *Ph. argentipes*, vector de leishmaniasis visceral en la India.¹²

Esquema 2: a) Esquema general de la hidrólisis del AMP.



En 1989 se encontró un vasodilatador muy potente conocido como maxadilan, en la saliva de *Lu. longipalpis*. Esta proteína es un péptido de 6.8 kDa, con una capacidad de inducir temporalmente vasodilatación e inmunosupresión en mamíferos. Además, se identificó como péptido por su sensibilidad a la tripsina y por su habilidad para inducir un eritema localizado en la piel sin picazón o edema.^{13,14} Ribeiro y col.¹⁵ caracterizan la actividad vasodilatadora con la relajación de anillos aórticos de conejo y demuestran que es un péptido de la familia del neuropéptido calcitonina (CGRP) con un inmunoensayo, utilizando un anticuerpo específico para CGRP humano. El péptido demostró ser 500 veces más potente que dicho neuropéptido, el cual presentaba mayor actividad vasolidatadora conocida hasta ese momento. La inmunosupresión temporal inducida por esta proteína lleva a la inhibición de la función de los macrófagos

¹² Ribeiro, J.M.; Modi, G. "The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes*, *annandale* and *brunetti*, the main vector of human kala-azar". En: *J Parasitol.* Vol. **87**,4 (2001); p. 915-7.

¹³ Kamhawi, S. "The biological and immunomodulatory properties of sand fly and its role in the establishment of *Leishmania* infections". En: *Microbes and infection.* Vol. 2 (2000); p. 1765-73.

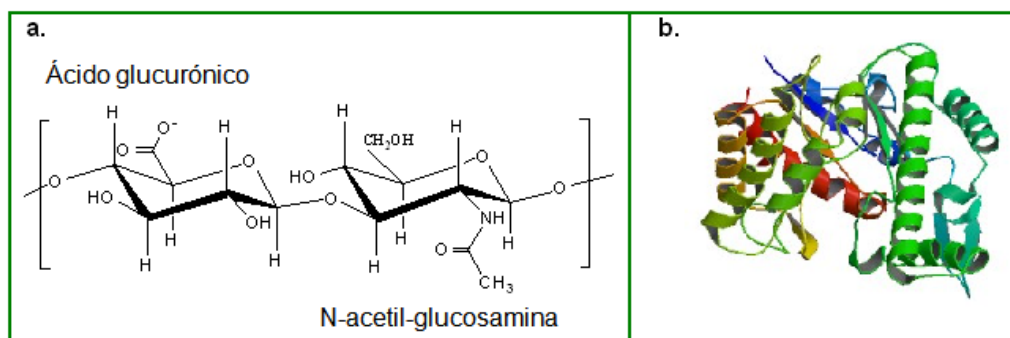
¹⁴ Ribeiro, J.M.C.; Modi, G.B.; and Tesh, R.B. "Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly *Lutzomyia Longipalpis*". En: *Comp Biochem Physiol.* Vol. **83A**,4 (1986); p. 683-6.

¹⁵ Ribeiro, J.M.; Vachereau, A.; Modi, G.B.; Tesh, R.B. "A novel vasodilatory from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: *Science.* Vol. **243**,4888 (1989); p. 212-14.

indicada con la regulación en la producción de H_2O_2 y la incapacidad del macrófago para presentar antígenos a las células T.¹⁶ Por esta razón, este nuevo péptido fue aislado, purificado por cromatografía, clonado su gen y secuenciada su estructura primaria, siendo conocido, actualmente, como maxadilan.¹⁷ Esta proteína ha sido protegida a través de patentes para su uso farmacéutico como droga inmunosupresora o potente vasodilatador por la administración ya sea de la molécula nativa o un fragmento activo análogo.

En las glándulas salivales de *Lu. Longipalpis* también está presente la hialuronidasa¹⁸ (Ver **Figura 4b**). Esta enzima aumenta la permeabilidad del tejido, ayudando a la difusión de agentes antihemostáticos en la vecindad de la herida, influye en el tamaño del hematoma, haciéndolo más grande y puede facilitar el movimiento de ciertos arbovirus a través de la matriz celular de la piel por la depolimerización del ácido hialurónico (Ver **Figura 4a**). Esta enzima también ha sido encontrada en los *Ph. papatasi*, *Ph. duboscqi* y *Ph. sergenti*.¹⁹

Figura 4: a) Estructura de las unidades que conforman al ácido hialurónico. b) Estructura tridimensional de la proteína hialuronidasa (Tomada de Protein Data Bank. Código: 1fcu.pdb).



¹⁶ Ribeiro, J.; Ariz, T.; Lerner, E.; Remold, H. "Vasodilatory peptides from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: Patent number: 5.397.772. código: US005397772A (1995)

¹⁷ 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*". En: *J Biol Chem*. Vol. **266**,17 (1991); p.11234-6.

¹⁸ Ribeiro, J.M.; Charlab, R.; Rowton, E.D.; Cupp, E.W. "*Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity". En: *J Med Entomol*. Vol. **37**,5 (2000); p. 743-7.

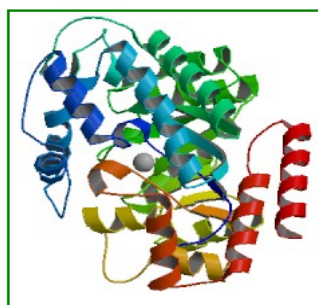
¹⁹ Cerna, P.; Mikes, L.; Volf, P. "Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae)". En: *Insect Biochem Mol Biol*. Vol. **32**,12 (2002); p. 1691-7.

En el *Ph. Duboscqi* y en *Lu. Longipalpis* se detectó, por medio de mediciones espectrofotométricas, la presencia de una enzima, en las glándulas salivales, conocida como adenosina deaminasa que convierte la adenosina en inosina (Ver **Figura 3**). La inosina inhibe la producción de citocinas proinflamatorias incluyendo TNF- α , IL-1 e IL-2 en macrófagos.²⁰ Esta enzima (Ver **Figura 5**) se enlaza al receptor A1 adenosina aumentando la sensibilidad del receptor hacia concentraciones pequeñas de adenosina provocando la vasopermeabilidad cutánea²¹. Los roles inmunosupresores siguen siendo objeto de estudio.

Esquema 3: Esquema general de la conversión de adenosina por acción de la adenosina deaminasa ADA.



Figura 5: Estructura tridimensional de la adenosina deaminasa en complejo con la adenosina (Tomada de Proteína Data Bank. Código: 1vfl.pdb).



²⁰ Charlab, R.; Rowton, E.D.; Ribeiro, J.M. "The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: *Exp Parasitol.* Vol. **95**,1 (2000); p. 45-53.

²¹ 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". En: *J Exp Biol.* Vol. **210**,5 (2007); p. 733-40.

La construcción de librerías del cDNA de las glándulas salivales de los artrópodos, ha sido una herramienta útil para, de algún modo, conocer el complejo proteico de los flebótomos y confirmar lo expuesto por los investigadores al evaluar la presencia de los componentes salivales mediante ensayos biológicos o técnicas electroforéticas y espectrofotométricas.

Con la librería cDNA de las glándulas salivales de *Ph. papatasi*²² se identificaron ciertas proteínas como apirinas, descritas por primera vez en *Cimex Lectularius*,⁸ proteínas pertenecientes a la familia Yellow, el gen codificado para esta proteína fue descrito en *Drosophila melanogaster* y una proteína denominada PpSP15 la cual, según estudios realizados, confiere protección contra *Le. major*.²³ Del mismo modo en *Lu. longipalpis*, además de identificar las mismas familias de proteínas encontradas en *Ph. papatasi*, se detectó una proteína conocida como maxadilan; una proteína perteneciente a la familia D7 y una proteína de la familia 5'-nucleotidasa.

Kato y col.²⁴ construyeron una librería de cDNA salival con *Ph. duboscqi* y encontraron familias de proteínas similares a las descritas para *Lu. longipalpis* y *Ph. papatasi*. Conjuntamente se identificaron proteínas similares a la denominada PpSP12, encontrada en *Ph. papatasi* y una proteína denominada adenosina deaminasa (ADA).

Con los estudios realizados hasta hoy, se demuestra que cada especie tiene su propio contenido proteico en la saliva y su estrategia específica para poder obtener su alimento, razón por la cual existe diversidad molecular de estos

²² Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Garfield, M.K.; Mendez, S.; Kamhawi, S.; Rowton, E.D.; Sacks, D.L.; Ribeiro, J.M. "Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein". En: J Exp Med. Vol. 194,3 (2001); p. 331-42.

²³ Belkaid, Y.; Kamhawi, S.; Modi, G.; Valenzuela, J.; Noben-Trauth, N.; Rowton, E.; Ribeiro, J.; 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. Vol. 188,10 (1998); p. 1941-53.

²⁴ Kato, H.; Anderson, J.M.; Kamhawi, S.; Oliveira, F.; Lawyer, P.G. "High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant Phlebotomus duboscqi sandflies populations (Mali and Kenya)". En: BMC Genomics. Vol. 7,226 (2006).

compuestos. Las garrapatas, por ejemplo, tienen grandes cantidades de prostaglandinas salivales. Los mosquitos *Anopheles* tienen una peroxidasa vasodilatadora de aproximadamente 65 kDa.² Dentro de los agentes hemostáticos se encuentra la antitrombina, identificada en hemípteros como *Rhodnius*⁵ y mosquitos como *Anopheles albimanus*.²⁵ Se han identificado también bloqueadores de la coagulación que actúan inhibiendo el factor Xa, como es el caso de una proteína de 48kDa identificada en *An. albimanus*.²⁶ Para el caso de los flebótomos han sido estudiados hasta el momento: *Phlebotomus papatasi*, *Ph. argentipes*, *Ph. sergenti*, *Ph. duboscqi* y *Ph. perniciosus*; y *Lutzomyia longipalpis*.

3.1.2 Propiedades inmunomoduladoras de la saliva de flebótomos

Los artrópodos hematófagos han desarrollado factores inmunomoduladores que impiden que el hospedero lo rechace o se vuelva sensible a las sustancias vasomoduladoras que le facilitan la extracción de sangre.²⁷ Por ejemplo, los artrópodos pertenecientes a la familia *Ixodoidea* (garrapatas) se alimentan por extensos períodos de tiempo (3±10 días) en el hospedero vertebrado y posteriormente pueden retornar al mismo hospedero sin que se haya desarrollado una respuesta inmune eficaz en su contra.²⁸ La saliva de *Lutzomyia spp* y *Phlebotomus spp* modulan la respuesta inmunitaria del hospedero a diferentes niveles incluyendo la respuesta inmune innata y adquirida.²⁹

La saliva de *Lu. longipalpis* afecta la activación del complemento, la proliferación de células T, la hematopoyesis y varias funciones de las células presentadoras de antígenos (p. ej. monocitos, macrófagos y células dendríticas). De acuerdo con

²⁵ Valenzuela, J.G.; Francischetti, I.M.; Ribeiro, J.M. "Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*". En: *Biochemistry*. Vol. 38 (1999); p. 11209–15.

²⁶ Ward, Richard D. "Some aspects of the biology of phlebotomine sandfly vectors". En: *Advances in Disease Vector Research*. Vol. 6 (1990); p. 91-126.

²⁷ Gillespie, R. Dean.; Mbow, M. Lamine. ; Titus, Richard. "The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva". En: *Parasite immunology*. Vol. 22 (2000); p. 319-331.

²⁸ Wikel, S. "Tick modulation of host cytokines". En: *Exp. Parasitology*. Vol. 84 (1996); p. 304-9.

²⁹ Rohoušová, I. and Volf, P. "Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* Transmission". En: *folia parasitologica*. Vol. 53 (2006); p. 161–171.

las características inmunomoduladoras presentadas por la saliva de *Lu. longipalpis*, se estudió más a fondo cuál era el factor responsable de dichas características. En 1994 se encontró que maxadilan inhibe la producción de NO, H₂O₂ y TNF- α en macrófagos, y que aumenta la producción de IL-6.³⁰ Esta enzima se enlaza a receptores de superficie en tejidos neuronal y vascular, y es un antagonista específico del receptor tipo 1 para el neuropéptido activador de adenilato-ciclasa pituitaria (PACAP).^{31,32} Además demostró tener efecto relajante endotelial independiente a través de la acumulación intracelular de AMPc en músculo liso vascular, acompañado por una reducción en la concentración de cationes de calcio,³³ por el contrario, para los flebótomos del género *Phlebotomus spp.* los efectos vasodilatadores y antiplaquetarios se deben a la presencia de adenosina y su precursor 5'-AMP en las glándulas salivales.⁷

A partir de ese momento, los investigadores han basado sus trabajos en el artrópodo *Lu. longiplapis* ya que este género cuenta con una amplia distribución, facilidad en la estandarización de la colonización y en su manejo en el laboratorio lo que permite profundizar en el descubrimiento de la actividad vasodilatadora presente en la saliva de este artrópodo.

3.1.3 Rol de la saliva de los flebótomos en la transmisión de leishmaniasis

Los componentes salivales de los artrópodos hematófagos también hacen más eficiente la habilidad para transmitir patógenos.³ Solo a partir de los 80s se iniciaron estudios sobre el comportamiento de diversos virus en los flebótomos. En

³⁰ Soares, M.B.; Titus, R.G.; Shoemaker, C.B.; David, J.R.; Bozza, M. "The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor". En: J Immunol. Vol. **160**,4 (1998); p. 1811-6.

³¹ 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. Vol. **272**,2 (1997); p. 966-70.

³² Eggenberger, M.; Born, W.; Zimmermann, U.; Lerner, E.A.; Fischer, J.A.; Muff, R. "Maxadilan interacts with receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide in human SH-SY5Y and SK-N-MC neuroblastoma cells". En: Neuropeptides. Vol. **33**,2 (1999); p. 107-14.

³³ Jackson, T.S.; Lerner, E.; Weisbrod, R.M.; Tajima, M. "Vasodilatory properties of recombinant maxadilan". En: Am J Physiol. Vol. **271**,3 (1996); p. 924-30.

1988 Titus y Ribeiro fueron los primeros en demostrar que la saliva de estos artrópodos aumenta la capacidad de infección de *Leishmania*, patógeno causante de leishmaniasis.³⁴

Estudios mostraron que la co-inoculación de *Leishmania spp* con lisado de glándulas salivales de flebótomos aumenta considerablemente la infectividad de algunas especies de *Leishmania spp* en ratones. En una co-inoculación de *Le. braziliensis* con lisado de glándulas salivales de *Lu. longipalpis* en ratones BALB/c, se encontró que aumentaba la infección y a su vez el tamaño de las lesiones. Además, los niveles de interleucina-4 (IL-4) (Ver **Figura 6a**) estaban aumentados en ratones que presentaban exacerbación de la enfermedad, concluyendo que, la inmunomodulación llevada a cabo por el lisado de glándulas salivales (LGS) era determinante en el proceso infeccioso producido por *Le. major*.³⁴ Posterior a estos experimentos, se propuso que maxadilán podría ser el péptido responsable por el aumento en la infectividad de *Leishmania spp* en presencia de LGS de *Lu. longipalpis*. Para comprobar esta hipótesis fue realizado un estudio inoculando Maxadilán sintético (3ng) con *Le. major* en ratones. Se observó una exacerbación en el tamaño de las lesiones así como en la carga parasitaria con la aplicación de LGS de *Lu. longipalpis*, pero además se demostró que en animales vacunados con maxadilán se producen anticuerpos contra esta proteína salival, lo que resulta en animales protegidos contra la infección con *Le. major*.³⁵ De este modo se concluyó que maxadilán parece ser el principal péptido en la saliva de *Lu. longipalpis* responsable por el potenciamiento de la infección con *Le. major*. Maxadilán tiene diversos efectos sobre los macrófagos que pueden explicar su habilidad para exacerbar la infección con *Le. major* en ratones y para prolongar la supervivencia del parásito en el hospedero. Inhibe la producción de NO, H₂O₂ y

³⁴ Titus, Richard G.; Ribeiro, Jose M. C. "Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* infectivity". En: Science. Vol. **239**,4845 (1988); p. 1306-1308.

³⁵ Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C.; and Titus, R. G. "Sandfly maxadilán exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection". En: J.Immunol. Vol. 167 (2001); p. 5226-5230.

TNF- α por los macrófagos³⁶ y adicionalmente, aumenta la producción de IL-10 (Ver **Figura 6b**) y prostaglandina E, las cuales se relacionan con un aumento en la supervivencia de *Le. major*.

Figura 6: Estructura tridimensional de **a)** Interleucina 4 (IL-4) **b)** IL-10 **c)** IL-6. (Tomadas de Protein Data Base códigos: 1iti.pdb, 2h24.pdb, 1il6.pdb).



A partir de los estudios llevados a cabo con *Lu. longipalpis*, se empezó a estudiar el efecto de LGS del género *Phlebotomus* spp, mostrando que, además del aumento en el tamaño de la lesión, la utilización de LGS de *Phlebotomus* spp exagera la infección con todas las especies de *Leishmania* spp evaluadas.^{37,38} Los efectos potenciadores de la saliva del flebótomo en la transmisión de la *Leishmania* spp están asociados con su capacidad para inhibir algunas funciones de los macrófagos, incluyendo la presentación antigénica, la producción de NO y la capacidad de los macrófagos para eliminar a *Le. major* intracelular.³⁹

Además de evaluar la exacerbación de la infección, se ha evaluado la capacidad protectora de la saliva mediante la preinmunización de animales experimentales.

³⁶ Warburg, A.; Saraiva, E.; Lanzaro, G.C.; Titus, R.G.; Neva, F. "Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis". En: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Vol. **345**,1312 (1994); p. 223-30.

³⁷ Theodos, C.M.; Ribeiro, J.M.; Titus, R.G. "Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice". En: *Infect Immun.* Vol. 59 (1991); p. 1592-8.

³⁸ Samuelson, J.; Lerner, E.; Tesh, R.; Titus, R. "A mouse model of Leishmania braziliensis braziliensis infection produced by coinjection with sand fly saliva". En: *J Exp Med.* Vol. **173**,1 (1991); p. 49-54.

³⁹ Hall, L.R. and Titus, R. "Sand Fly Vector Saliva Selectively Modulates Macrophage Functions That Inhibit Killing of *Leishmania major* and Nitric Oxide Production". En: *J Immunology.* Vol. **155**,7 (1995); p. 3501-06.

De forma similar a la protección adquirida contra la infección de *Le. major* de animales vacunados con maxadilán,³⁵ se encontró que en ratones preinmunizados con una proteína de 15 kDa denominada PpSP15,⁴⁰ identificada en *Ph. papatasi*, se produce una fuerte respuesta inmune localizada (DTH) al exponer, experimentalmente, a los animales a picaduras de flebótomos. En consecuencia, se ha podido comprobar que animales experimentalmente expuestos a picaduras repetidas del flebótomo desarrollan anticuerpos contra la saliva.^{41,42}

Se ha demostrado que la saliva de los vectores, ya sea del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, aumenta la infectividad con *Leishmania* y produce respuestas inmunes. Es por ello que se ha generado el interés por saber cuáles de las proteínas salivales de los flebótomos poseen actividad biológica y son reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de hospederos y/o reservorios infectados, con el objetivo de reconocer qué proteínas pueden ser posibles candidatos potenciales para el desarrollo de una vacuna contra la leishmaniasis.⁴³ Para tal fin, se ha evaluado la capacidad antigénica de las proteínas salivales, identificadas por medio de perfiles electroforéticos de algunos flebótomos.

En *Lu. longipalpis*, dos proteínas salivales reaccionaron con sueros de perros infectados con *Leishmania spp.*, una de 28.6 kDa y otra de 47.3 kDa.⁴⁴ En otro estudio se reportó una proteína de 45 kDa, la cual fue el antígeno más reconocido por sueros de individuos expuestos a flebótomos,⁴⁵ también se han observado

⁴⁰ Belkaid, Y.; Valenzuela, J.G.; Kamhawi, S.; Rowton, E.; and Ribeiro, J. "Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?". En: PNAS. Vol. **97**,12 (2000); p. 6704-09.

⁴¹ Ghosh, K.N.; and Mukhopadhyay, J. "The effect of anti-sandfly saliva antibodies on argentipes and *Leishmania dmovani*". En: International Journal for Parasitology. Vol. 28 (1998); p. 275-281.

⁴² Volf, P.; Rohousova, I. "Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies". En: Parasitology. Vol. **122**,1 (2001); p. 37-41.

⁴³ Rogers, K.A.; Titus, R.G. "Immunomodulatory effects of Maxadilán and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses". En: Parasite Immunol. Vol. **25**,3 (2003); p. 127-34.

⁴⁴ Bahia, D.; Gontijo, N.F.; Leon, I.R.; Perales, J. "Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*". En: Parasitol Res. Vol. **100**,3 (2007); p. 449-54.

⁴⁵ Gomes, R.B.; Brodskyn, C.; de Oliveira, Cl.; Costa, J.; Miranda, J.C.; Caldas, A.; Valenzuela, J. "Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity". En: J Infect Dis. Vol. **186**,10 (2002); p. 1530-4.

reconocimientos de antígenos salivales de 15, 32, 44 y 45 kDa.⁴⁶ De forma similar, en *Ph. papatasi* se detectaron proteínas de 30, 36 y 42 kDa; en *Ph. perniciosus* se encontraron proteínas entre 36 y 39 kDa y en *Ph. halepensis* proteínas entre 31 y 42 kDa.⁴⁷

3.2 Técnicas empleadas en el estudio

3.2.1 Electroforesis SDS-PAGE 1-D

La determinación del perfil proteico del lisado de glándula salival se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE). El gel se forma por la reacción de co-polimerización de la acrilamida y N,N'-metilen-bisacrilamida. Esta reacción es catalizada por TEMED (tetrametiletilendiamina) y por el persulfato de amonio.

El persulfato, en solución acuosa, genera radicales libres, los cuales activan la acrilamida. El monómero activado de acrilamida puede entonces reaccionar con los monómeros inactivados y producir cadenas lineales de poliacrilamida (Ver **Figura 7**). La polimerización de la acrilamida sola no origina el gel, para que se forme propiamente es necesario que se creen uniones covalentes entre esas cadenas; para ello se añade al medio la N,N' metilén-bis-acrilamida (BIS), molécula capaz de formar puentes cruzados.

En SDS-PAGE, la mezcla de proteínas es desnaturalizada por calentamiento a 100°C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercapto-etanol que se emplea para romper los enlaces disulfuro. Bajo estas condiciones, todos los polipéptidos

⁴⁶ Gomes, R.B.; Mendonc, I.L.; Silva, V.; Ruase, J. "Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*". En: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 101 (2006); p. 127-33.

⁴⁷ Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbek, Y.; Volf, P. "Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies". En: *Parasitology*. Vol. 130,5 (2005); p. 493-9.

se enlazan al SDS, el cual se enlaza a los residuos de aminoácidos creando una carga negativa uniforme y proporcional a su masa para que todas las proteínas se desplacen hacia el ánodo. En la **Figura 8** se muestra un esquema general de la separación de proteínas en SDS-PAGE.

Figura 7: Estructura química del gel de poliacrilamida.

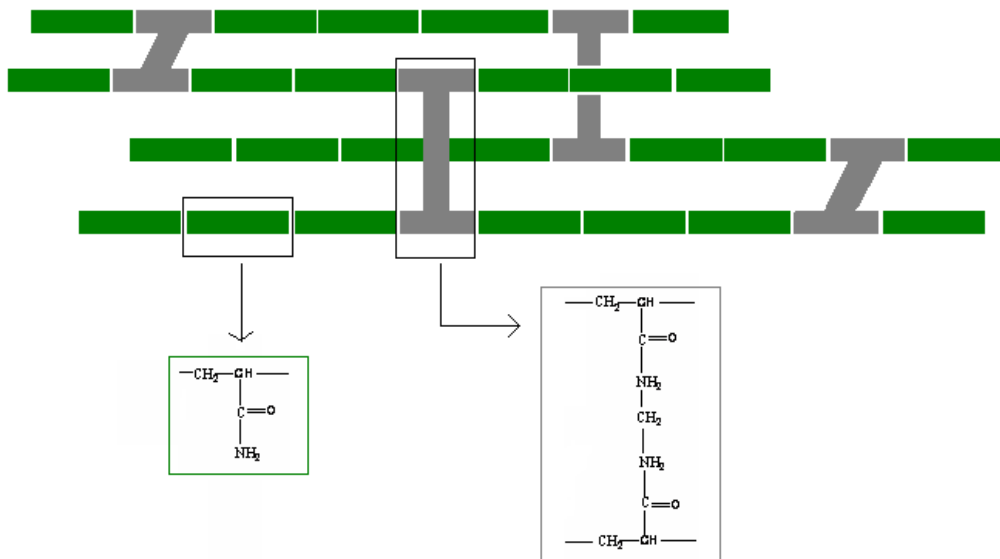
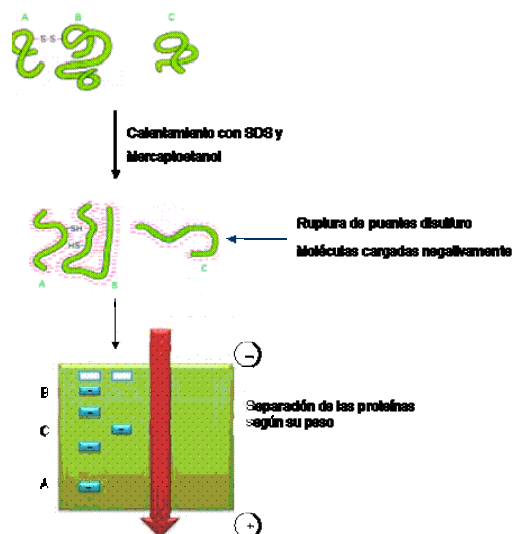


Figura 8: Separación de proteínas en SDS-PAGE.

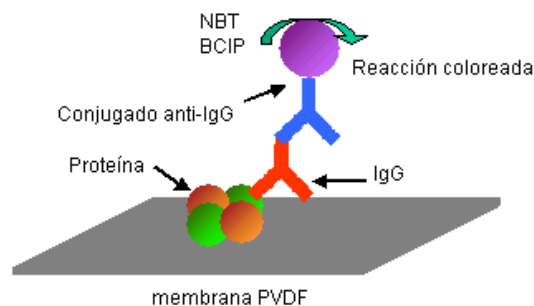


La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional a la masa de la proteína, puesto que las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular, lo cual permite conocer el peso de las proteínas obtenidas al comparar con patrones de peso molecular.⁴⁸

3.2.1 Inmunotransferencia o Western Blotting

Para determinar la capacidad antigénica de las proteínas presentes en las glándulas salivales de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi* se utilizó la técnica denominada “*Western Blotting*”. El término “blotting” hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Esta técnica fue descrita por primera vez por Towbin et al. en 1979 y en la actualidad es una técnica de rutina en todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas (Ver **Figura 9**), lo cual hace del Western Blotting un criterio de identificación de proteínas

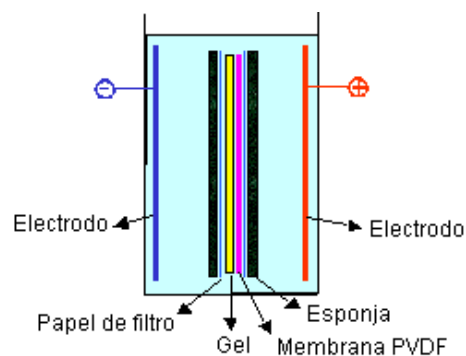
Figura 9: Representación de la reacción antígeno-anticuerpo y su detección.



⁴⁸ Shapiro, A.L.; Viñuela, E.; Maizel, J.V. Jr. "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels". *En: Biochem Biophys Res Commun*. Vol. **28,5** (1967); p. 815-820

El primer paso del “Western Blotting” es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis; después de esto, las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una segunda matriz, una membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno). Para transferir las proteínas desde el gel hasta la membrana se pone en contacto directo el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas con la membrana de PVDF, formando un sandwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida (Ver **Figura 10**). La eficacia de la transferencia puede variar enormemente entre las diferentes proteínas dependiendo de la capacidad de la proteína de migrar fuera del gel, su tendencia a unirse a la membrana, la composición del gel y si éste está en completo contacto con la membrana o no, etc.

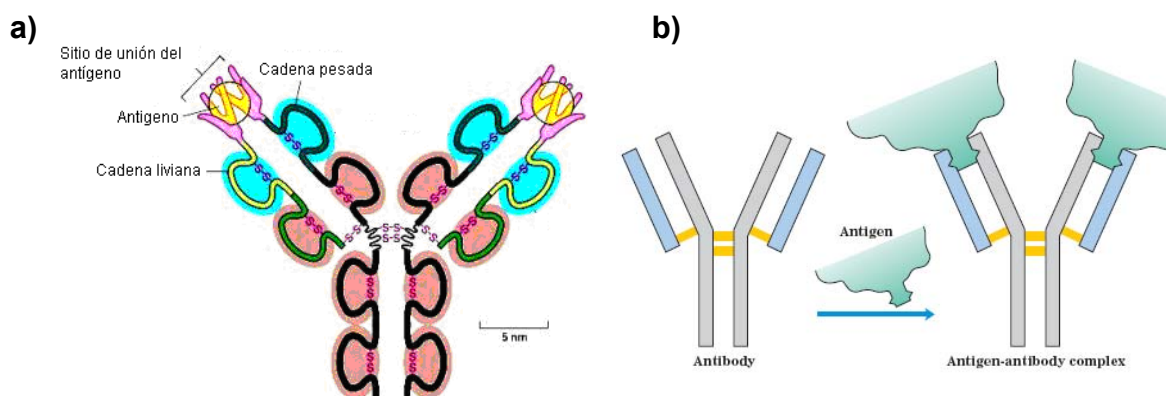
Figura 10: Transferencia de proteínas del gel a la membrana.



Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. Los tampones de bloqueo incrementan la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo (background).

En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo primario, que en nuestro caso corresponde a la Inmunoglobulina G que se encuentra en el suero de perros infectados con *Leishmania*. La inmunoglobulina G (Ver **Figura 11**) hace parte del grupo de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD y IgE) que se encuentran en el plasma sanguíneo entre las cuales la IgG es la más abundante y mejor conocida.

Figura 11: Estructura de la inmunoglobulina G: **(a)** Combinación de las cadenas livianas y pesadas para formar una molécula en forma de Y. Los sitios de enlace al antígeno son formados por la combinación de dominios variables de una cadena liviana (V_L) y una cadena pesada (V_H). **(b)** Enlace de la inmunoglobulina G a un antígeno. Para generar un ajuste óptimo para el antígeno, los sitios de unión sufren ligeros cambios conformacionales. Estos ajustes son comunes en las interacciones proteína-ligando. (Tomada de Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, 2004).



Después de la unión de la proteína transferida con el anticuerpo primario, se añade el anticuerpo secundario con un tipo de marcaje incorporado. Hace algunos años se utilizaban radioisótopos, pero poseen una vida media muy corta y requieren una manipulación especial, entonces se han desarrollado como marcajes alternativos los marcajes con biotina, fluoróforos o enzimas. El marcaje con enzimas se utiliza más ampliamente y, aunque necesita algunos pasos extra, suelen ser bastante sensibles. Las dos enzimas que más se utilizan son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP) y existe una amplia

variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes disponibles comercialmente para cada enzima.

El tipo de marcaje que se utiliza en este estudio es enzimático, utilizando fosfatasa alcalina (AP), una enzima de 40.000 Da (Ver **Figura 12**), que normalmente se aísla del intestino de carnero y que cataliza la hidrólisis de los grupos fosfato de la molécula de sustrato originando un producto coloreado (Ver **Esquema 4**). Su actividad óptima es a un pH básico (pH 8 – 10) y puede inhibirse con cianidas, arsenatos, fosfato inorgánico y quelantes de cationes divalentes como, por ejemplo, el EDTA. Su principal ventaja es que su tasa de reacción permanece lineal por lo que se puede incrementar la sensibilidad de la detección simplemente dejando la reacción durante más tiempo.

Esquema 4: Acción de la fosfatasa alcalina con su sustrato específico BCIP.

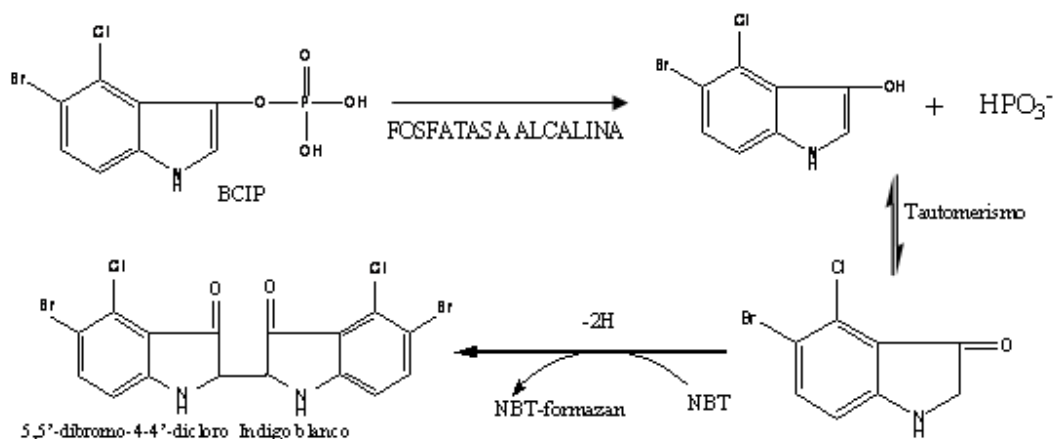
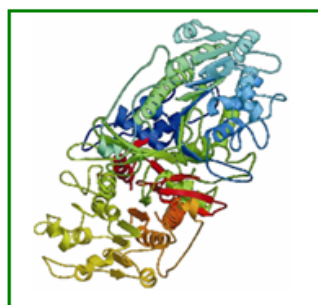
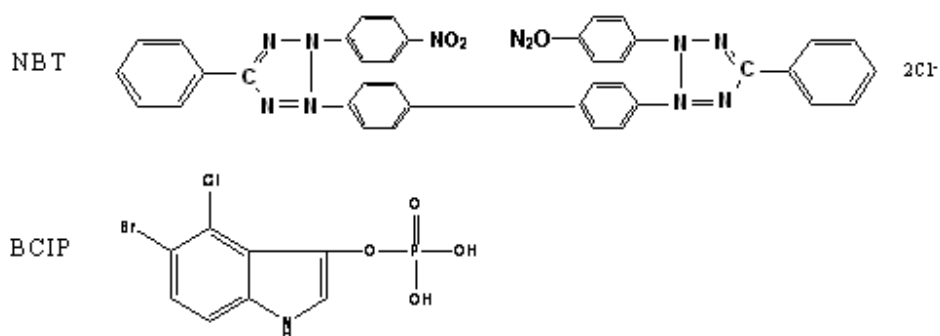


Figura 12: Estructura de la fosfatasa alcalina. (Tomada de Protein Data base código: 1alk.pdb).



Finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana. Los sustratos cromogénicos son los más ampliamente utilizados y proporcionan el método de detección más barato y sencillo; cuando estos sustratos entran en contacto con la enzima correspondiente, se transforman en productos insolubles coloreados que precipitan sobre la membrana, por lo que no necesitan ninguna instrumentación especial para realizar la visualización de los resultados. Para la AP, los más utilizados son el NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) y el BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) (Ver **Figura 13**).

Figura 13: Sustratos específicos para la fosfatasa alcalina.



El NBT tiene un peso molecular de 817,6 Da y pertenece al grupo de las sales de tetrazolio; después de su reducción, da un precipitado de color azul púrpura insoluble en agua que tiene la gran ventaja de ser lineal y estable con la concentración a lo largo de un enorme rango dinámico. El BCIP tiene un peso molecular de 433,6 Da y su hidrólisis por la AP origina un precipitado de color azul púrpura que se deposita en las membranas. La combinación ideal para el Western Blot es BCIP/NBT ya que juntos originan un precipitado negro púrpura muy intenso con mucha mayor sensibilidad que cualquiera de ambos sustratos por separado.

Otra ventaja de la combinación de los dos sustratos es que proporcionan bandas mucho más definidas y con mucho menos ruido de fondo⁴⁹.

Las bandas obtenidas tanto en los geles de poliacrilamida como en las membranas de PVDF se analizan con los programas especializados que se encuentran en el mercado y así se puede realizar la comparación de los perfiles proteicos de la saliva de cada una de las especies estudiadas.

⁴⁹ Burnette, W.N. "Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *En: Analytical Biochemistry*. Vol. **112,2** (1981); p. 195–203.

4. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la saliva de los flebótomos posee funciones hemostáticas, inflamatorias e inmunomoduladoras que alteran, de una u otra manera, las condiciones naturales del hospedero suprimiendo su respuesta inmune, facilitando así no solo la obtención del alimento sino el establecimiento de un medio favorable para la supervivencia de los patógenos *Leishmania spp.*, los cuales producen la enfermedad de leishmaniasis.^{13,23,28,50} Esta infección representa un problema grave de salud pública en el sur de América. Así, por ejemplo, se han reportado cerca de 79.000 casos de leishmaniasis desde el año 1990 hasta 2003, y solo entre el 2003 y 2004 se reportaron 12.000 casos.

La saliva de estos vectores modula la presentación de anticuerpos de los macrófagos en el sitio de la lesión, lo cual influencia todo el proceso de la infección. Además se ha demostrado que la inyección de su saliva aumenta la transmisión de *Leishmania spp* al momento de la toma de sangre, incrementando tanto el tamaño de las lesiones en la piel como la carga parasitaria^{27,35,39}. Dada las propiedades de la saliva, se han aislado algunas proteínas salivales de ciertos flebótomos como *Phebotomus (Ph.). papatasi*, *Ph. duboscqui*, y *Lu. longipalpis*. Además, se ha logrado identificar el papel que juegan dichas proteínas en la transmisión de patógenos.^{27,30,35,37}

La mayoría de investigaciones se han centrado en una especie específica, *Lu. longipalpis*, debido a su fácil colonización y manejo en el laboratorio. Recientemente, se descubrió una proteína de 6.8 kDa derivada de lisado de glándula salival de este artrópodo, denominada maxadilán. Se demostró que esta molécula posee propiedades vasodilatadoras¹⁵ por ende sus descubridores patentaron dicha molécula y las metodologías de purificación y clonación que permiten la producción de esta proteína a gran escala en la industria

⁵⁰ Ribeiro, J.M.; Francischetti, M.B. "Role of arthropod saliva in blood feeding". *En: Annu. Rev. Entomol.* Vol. 8 (2003); p. 73-88.

farmacéutica.¹⁶ Maxadilan inhibe la capacidad de los macrófagos para presentar respuesta inmune a los antígenos de *Leishmania major* y en el 2001 se demostró que animales vacunados con maxadilan producen anticuerpos contra esta proteína, lo que resultó en protección inmunológica de animales experimentales contra la infección con *Le. major*.³⁵

De igual manera este efecto protector experimental se observa al estudiar el lisado de glándula salival de *Ph. papatasi*, puesto que al pre-inmunizar ratones con una proteína salival de 15 kDa, encontrada en este díptero y denominada PpSP15, éstos presentaron una reacción inmune localizada, llamada DTH, cuando fueron expuestos a picaduras de flebótomos.

Para el caso particular de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, vectores de leishmaniasis cutánea, aunque están altamente distribuidas en regiones de Colombia y poseen un amplio rango de hospederos vertebrados, como humanos, perros (siendo éste el reservorio más importante y mayoritario), *Didelphides spp*, monos, entre otros. Sin embargo, hasta ahora no existe información sobre sus componentes salivales ni actividad biológica de sus proteínas, y por lo tanto, se desconoce el rol que juega éstas en la transmisión de *Le. panamensis*.

En áreas endémicas, la cercanía de los humanos, en especial de los niños con los perros, genera un factor de riesgo muy alto y desafortunadamente implementar un control de vectores o reservorios resulta muy costoso. En este sentido, el presente trabajo pretende mostrar la existencia de proteínas salivales biológicamente activas de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, reconocidas por anticuerpos de sueros de perros infectados con *Leishmania*, con el fin de detectar qué proteínas exhiben actividad inmunomoduladora y que presumiblemente podrían contribuir al desarrollo de una protección contra la infección por *Leishmania spp*.

La caracterización bioquímica de las proteínas activas de la saliva de estos flebótomos será el primer paso para la búsqueda de proteínas con uso

farmacéutico y/o con actividad protectora contra leishmaniasis. Los resultados de esta investigación serán los primeros que se reporten en toda Latinoamérica con *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, debido a que todos los trabajos usan como referencia *Lu. longipalpis*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Captura e identificación de *Lutzomyia spp*

Los muestreos se realizaron en zonas de bosque y en el peridomicilio de una vivienda ubicada en La Vereda San Pedro de La Tigra, Santander (7°28' N; 73°12' W; 200 a 2200 m.s.n.m.). Las zonas de muestreo fueron inspeccionadas en horas del día y de la noche, buscando los posibles sitios de reposo de los flebótomos de la zona. En esta área rural se llevaron a cabo las capturas de *Lutzomyia spp*. Se realizaron capturas desde las 19:00 horas a las 24:00 horas, haciendo uso de aspiradores bucales y sebo animal (porcino). El sitio de captura estaba aproximadamente a 14 metros del domicilio.

Igualmente, se capturaron algunos especímenes del género *Lu. trapidoi* en la Vereda de la Dorada, en el municipio de Landázuri, al sur occidente del departamento de Santander (6°, 20' N; 73°, 48' W; 1100 m.s.n.m.), para llevar a cabo las capturas se hizo uso de sebo equino.

Las colectas realizadas se depositaron en frascos de cría, las cuales contenían algodones con solución de sacarosa (5% p/v). La identificación se basó en los morfotipos a nivel macroscópico y se realizó con ayuda de un estereoscopio (Zeizz) y un microscopio (Zeizz). La **Figura 14** muestra el proceso de almacenamiento de las especies en los frascos de crías.

Figura 14: Sistema de captura y almacenamiento de *Lutzomyia* spp.



5.2. Obtención y ruptura de glándulas salivales

Las glándulas salivales fueron disectadas, haciendo uso de un estereoscopio (Ver **Figura 15**), de hembras del género *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, capturadas en áreas endémicas. Las glándulas salivales se guardaron en lotes de 20 pares en 20µl de buffer de lisis. Luego en tubos eppendorf se centrifugaron a 10000 rpm en una centrífuga de tubos (Jencons) durante 5 minutos y los sobrenadantes fueron utilizados para los estudios subsiguientes.

Figura 15: Disección de las glándulas salivales de *Lu. gomezi* utilizando un estereoscopio.



5.3. Obtención del perfil proteico

Para obtener el perfil proteico se hizo uso de una cámara de electroforesis MiniProtean I (Biorad). En geles de poli(acrilamida)-SDS al 14% se pasaron 20µl de lisado de glándulas salivales (LGS) de las diferentes especies en estudio, 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. Las muestras se calentaron a ebullición por 10 minutos. Los geles se prepararon de acuerdo a la estandarización previamente realizada, sus componentes y cantidades se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1: Componentes y volúmenes para el gel de separación.

GEL DE CORRIDO AL 14%		GEL DE STACKING AL 5%	
Agua destilada	1,983 ml	Agua destilada	2,170 ml
Acrilamida-Bisacrilamida	2,333 ml	Acrilamida-Bisacrilamida	0,537 ml
Tris-HCl pH= 8,8	1,458 ml	Tris-HCl pH= 8,8	0,857 ml
Persulfato de Amonio	0,029 ml	Persulfato de Amonio	0,070 ml
SDS	0,029 ml	SDS	0,035 ml
Temed	0,010 ml	Temed	0,010 ml

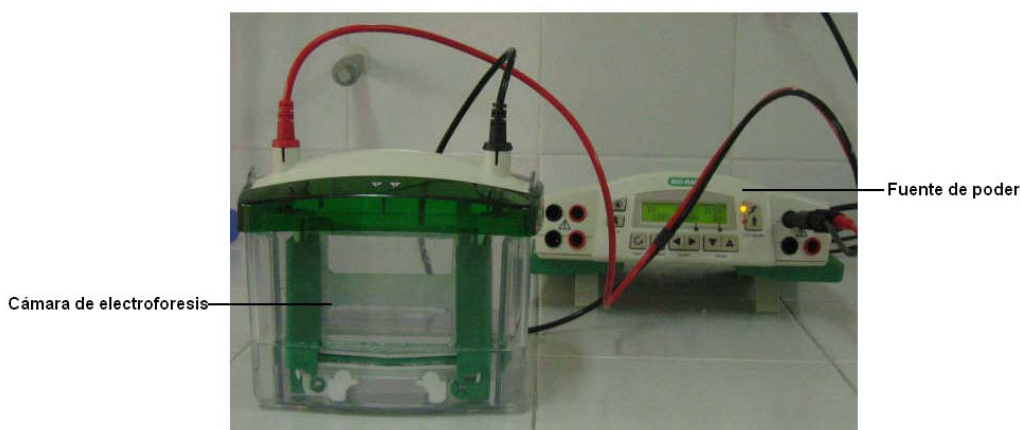
Se realizó el montaje de acuerdo a las especificaciones respectivas y se vertió 6 ml de gel de corrido entre los vidrios cubriéndole con una capa de isopropanol para hacer más efectiva la polimerización. Una vez polimerizado el gel de corrido se lavó con agua destilada 3 veces para retirar el isopropanol y porciones de acrilamida sin polimerizar, se secó con papel de filtro, se vertió el gel de concentración (gel de stacking), se introdujo el peine en la solución y se dejó polimerizar. Terminada la polimerización se retiró el peine se introdujo el montaje en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido. La composición del buffer de corrido se describe a continuación:

Tabla 2: Composición buffer de corrido.

BUFFER DE CORRIDO	
Tris Base	0,20%
Glicina	1,44%
SDS	0,10%

Finalmente se cargaron los pozos con las muestras previamente preparadas, se aplicó un voltaje de 120V y se dejó correr durante 1 hora.

Figura 16: Corrida de las muestras en la cámara de electroforesis.



Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.25% y luego con nitrato de plata, con el fin de determinar el peso molecular de las proteínas presentes en la saliva. Para conocer el respectivo peso molecular se utilizó como marcador de peso FERMETAS, que contiene proteínas entre 200 y 10 kDa. En la tabla 3 se muestra la composición de la solución colorante y decolorante para la tinción con azul de coomassie R250.

Tabla 3: Composición de la solución colorante y decolorante.

SOLUCIÓN COLORANTE		SOLUCIÓN DECOLORANTE	
Metanol	50%	Ácido Acético	10%
Ácido Acético	10%		
Azul de coomassie	0,25%		

5.4. Tinción con fluorescencia (SYPRO RUBY): El gel de 14 % de acrilamida obtenido por electroforesis se cubrió con SYPRO RUBY (50 ml) y se agitó suavemente durante 3 horas. Culminado el tiempo de tinción, se lavó el gel con una solución de 7% de ácido acético y 10% de metanol por 1 hora, para eliminar el ruido de fondo. Finalmente, se mantuvo el gel en agua destilada antes de ser escaneado.

5.5. Identificación de proteínas antigénicas por inmunotransferencia

Con el fin de detectar la presencia de proteínas activas en la saliva de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, se realizaron perfiles proteicos en geles de poliacrilamida al 14%, descritos anteriormente. Posteriormente, estos geles fueron transferidos a una membrana de PVDF utilizando el equipo de transferencia Miniprotean II (Biorad). La transferencia se llevó a cabo durante una hora a 100V.

Los geles obtenidos por electroforesis se sumergieron en buffer de transferencia (su composición se describe en la tabla 5) 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.

Tabla 4: Composición buffer de transferencia.

BUFFER DE TRANSFERENCIA	
Tris Base	0,30%
Glicina	1,44%
Metanol	15%

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 (su composición se describe en la tabla 6). Luego se incubó con los sueros (dilución 1/50 en solución de dilución) de 34 perros infectados con Leishmaniasis y de 35 perros no infectados de áreas endémicas. La cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm² de membrana, la incubación se llevó a cabo por dos horas y media con agitación constante. La composición de la solución de dilución se relaciona en la tabla 5.

Tabla 5: Composición de las diferentes soluciones utilizadas en la inmunotransferencia

SOLUCIÓN DE BLOQUEO		SOLUCIÓN DE LAVADO		SOLUCION DE DILUCIÓN		TBS	
Leche descremada	5%			Leche descremada	0,5%	NaCl	0,9%
Tween 20	1%	Tween 20	0,5%	Tween 20	0,2%	Tris-HCl	2%
TBS	Aforar a 100ml	TBS	Aforar a 100ml	TBS	Aforar a 100ml	(1M pH= 7,4)	

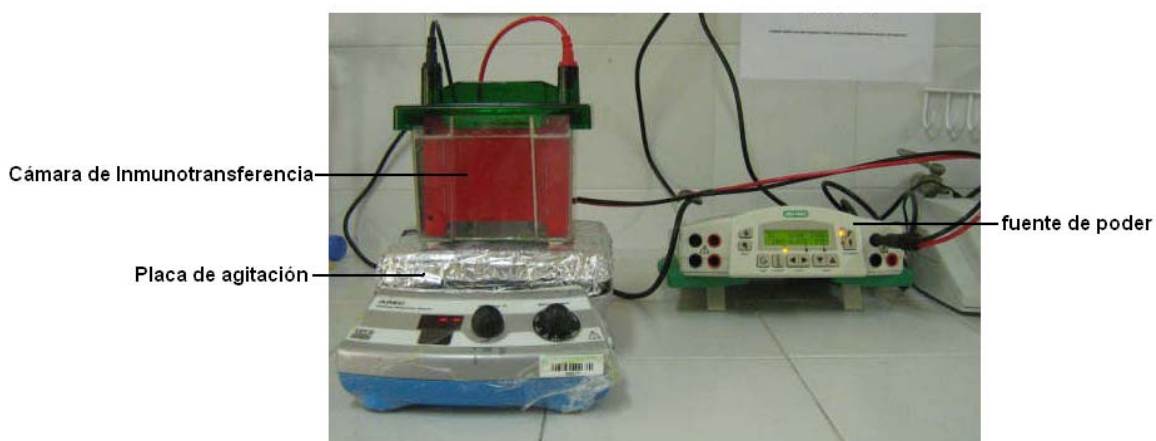
Terminada la incubación la membrana se lavó, nuevamente con solución de lavado. Posteriormente, se incubó con el conjugado anti IgG-fosfatasa alcalina en una dilución de 1/2500 con solución de dilución, la cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm² de membrana, la incubación se 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 cantidades específicas y la composición del buffer AP se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Composición del sustrato y buffer de la enzima

BUFFER FOSFATASA ALCALINA (AP)		SUSTRATO FOSFATASA ALCALINA	
NaCl 1M	1%	NBT (0,5% p/v en dimetilformamida al 70%)	0,66%
MgCl ₂ 1M	0,5%	BCIP (0,5% p/v en dimetilformamida al 70%)	0,33%
Tris-HCl 1M pH= 9,5	19%	Buffer con AP	

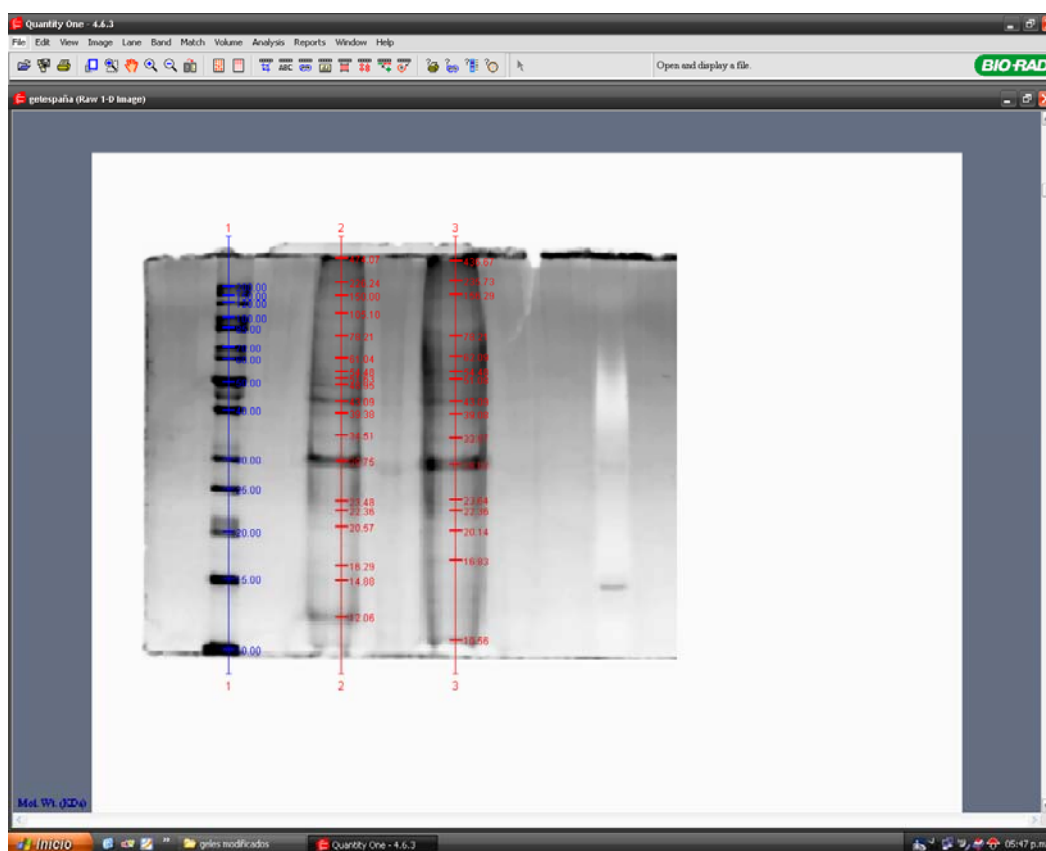
Figura 17: Montaje para la inmunotransferencia.



5.6. Análisis de los perfiles proteicos obtenidos de la saliva de las dos especies

Mediante el programa "Quantity one", se determinaron los pesos moleculares de las proteínas salivales de las especies en estudio.

Figura 18: Imagen del programa Quantity one.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para identificar qué fracciones proteicas de la saliva producen los efectos inmunomoduladores, se iniciaron estudios de los componentes salivales de los vectores de leishmaniasis, por medio de técnicas tales como electroforesis 1D y/o 2D, inmunotransferencia, cromatografía, HPLC, espectrometría de masas, proteómica, entre otras. Aunque este interés ha aumentado debido a sus interesantes hallazgos, existen algunas especies de *Lutzomyia* que, siendo considerados vectores y encontrándose abundantemente en zonas rurales, generando así un alto riesgo de contraer la enfermedad para los habitantes de la zona, en especial para los niños, no se han estudiado hasta el día de hoy.

Una de las razones por las cuales se llevó a cabo esta investigación fue la ausencia de estudios en *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*. Por consiguiente, este trabajo reporta el análisis del contenido proteico de estas especies, vectores de leishmaniasis y abundantes en algunas regiones de Colombia como Amazonas, Antioquia, Bolívar, Caquetá, Chocó, Risaralda, Santander, Sucre, Tolima, Valle del Cauca, entre otras.

6.1 Determinación del perfil proteico de diferentes especies de *Lutzomyia*

En la **Figura 19** se observan los resultados de la separación de proteínas, en los geles denaturantes, para cada especie de *Lutzomyia*, observándose bandas entre un rango de 14 y 61 kDa (Ver **Figura 19**). Los perfiles electroforéticos no presentan un gran número de bandas de proteínas, debido a que la tinción con azul de coomassie R-250 detecta solo por el orden de 0.5 µg de proteína, por tanto, las proteínas que se encuentran en menor concentración en las glándulas salivales no se pueden observar con esta tinción. Este tipo de detección se basa en la formación de complejos fuertes con las proteínas, interaccionando electrostáticamente con los grupos aminos y se correlaciona más con la cantidad

de aminoácidos básicos de las proteínas que con su masa total.⁵¹ Las masas moleculares de las proteínas se calcularon haciendo uso del software Quantity One, a partir de las imágenes de los geles SDS-PAGE de las tres especies. Las masas moleculares se muestran en la tabla 7.

Figura 19: Gel de 14% de SDS-poliacrilamida con los LGS de: (A) *Lu. trapidoi* provenientes del Playón, Santander, (C) *Lu. gomezi* y (B) *Lu. ayrozai*.

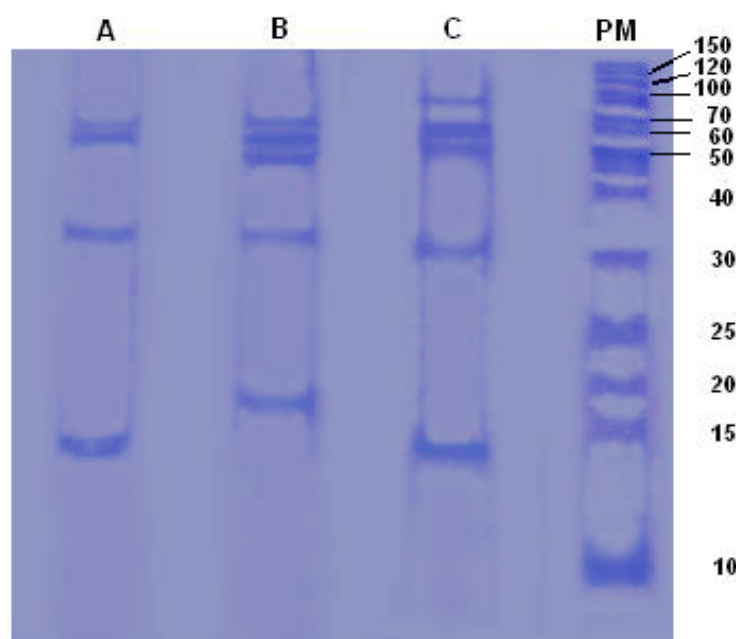


Tabla 7: Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para *Lu trapidoi* y *Lu. gomezi*.

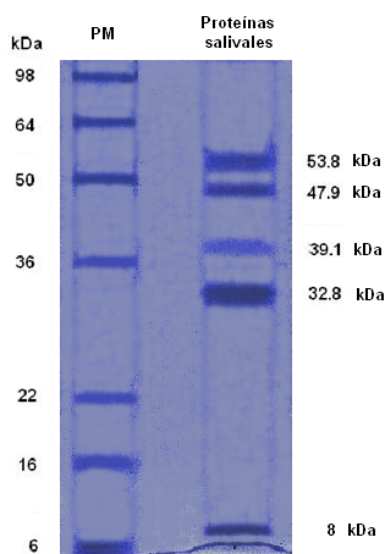
Proteínas en kDa obtenidas por SDS-PAGE		
<i>Lu gomezi</i>	<i>Lu. ayrozai</i>	<i>Lu. trapidoi</i>
77	61	61
58	54	54
51	48	33
32	18	14
14		

⁵¹ Brush, M. "Dye Hard: Protein Gel Staining Products". En: *The Scientist*. Vol. 12,10 (1998); p.16

Los perfiles proteicos de las especies estudiadas difieren en por lo menos 2 bandas. Vemos que la proteína salival más pequeña del LGS de *Lu. ayrozai* es de 18 kDa y del LGS de *Lu. trapidoi* y de *Lu. gomezi* es una banda de 14 kDa. Probablemente, la saliva de *Lu. ayrozai* no contiene esta proteína o posee una mínima concentración de ella, y por esta razón no se observó con la tinción de azul de Coomassie.

Al comparar los perfiles proteicos de lisado de glándula salival de dos poblaciones de *Lu. trapidoi* diferentes geográficamente (una proveniente de El Playón y otra de El Landazuri, Santander) se observan dos bandas con pesos moleculares aproximadamente iguales de 54 y 32 kDa (Ver **Figura 20**). Sin embargo, el perfil proteico de LGS de *Lu. trapidoi* proveniente de El Landázuri, muestra una banda de 8 kDa que no se observa en el perfil de *Lu. trapidoi* proveniente de El playón. Estas observaciones pueden estar relacionadas con la diferencia de concentración de las proteínas salivales para cada población, ya que proteínas con concentraciones bajas ($< 0.5 \mu\text{g}$) no se detectan mediante la tinción con Coomassie.

Figura 20: Gel de 14% de SDS-poliacrilamida de LGS de *Lu. trapidoi* proveniente de Landázuri, Santander. (A) Marcador de peso molecular Invitrogen.



Además, en el perfil electroforético del LGS de las muestras provenientes de El Playón, no se observa la banda correspondiente a 48 kDa ni la correspondiente a 39 kDa. Esto indica que, posiblemente estas proteínas salivales están en diferentes concentraciones para cada población de *Lu. trapidoi*, de manera similar a la descrita para *Lu. longipalpis* al evaluar la concentración de maxadilan en distintas poblaciones.⁵²

Se llevó a cabo una tinción con fluorescencia a un nuevo gel de SDS-PAGE al 14% con muestras de LGS de *Lu. trapidoi* y de *Lu. gomezi*, con el fin de obtener un perfil electroforético más completo (Ver **Figura 21**). Este tipo de tinción reveló varias bandas de proteínas que no se vieron con azul de Coomassie. De este modo, se revelaron proteínas con pesos moleculares de 16, 20, 22, 34, 39, 43 y 77 kDa. Esto permite deducir que estas proteínas están en bajas concentraciones en la saliva del flebótomo.

En la **Figura 21** se visualizan las bandas de proteínas entre el rango de 12 a 230 kDa, siendo unas más predominantes que otras con respecto a la intensidad de la banda, por ejemplo, la banda de proteína con peso molecular de 29 kDa presenta la mayor intensidad con respecto a las demás, por tanto se podría decir que esta proteína salival está presente en una concentración mayor; por el contrario las bandas con masas moleculares de 16, 20, 22, 23 kDa están presentes en los LGS, pero sus intensidades son muy débiles. El LGS de *Lu. trapidoi* contiene proteínas de 12 y 105 kDa que no están presentes en *Lu. gomezi*. A su vez, *Lu. gomezi* posee una proteína de peso molecular de 10 kDa que no se observa en el perfil electroforético del LGS de *Lu. trapidoi* (Ver **Tabla 8**).

Basados en los resultados obtenidos mediante la separación de las proteínas presentes en el lisado de glándula salival de *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, se indicaría que los LGS son un complejo cóctel de proteínas, el cual necesariamente debe ser

⁵² Yin, H.; Norris, D.E.; Lanzaro, G.C. "Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan". *En: Insect Mol Biol.* Vol. 9,3 (2000); p.309-14.

analizado por técnicas inmunológicas para ver el aporte probable de cada proteína al proceso de infección por *Leishmania spp.* y los procesos de vasodilatación e inmunomodulación en la relación vector-huésped.

Figura 21: Gel de SDS-PAGE al 14% (Tinción con Sypro Ruby) con LGS de: (A) *Lu. trapidoi* , (B) *Lu. gomezi* .

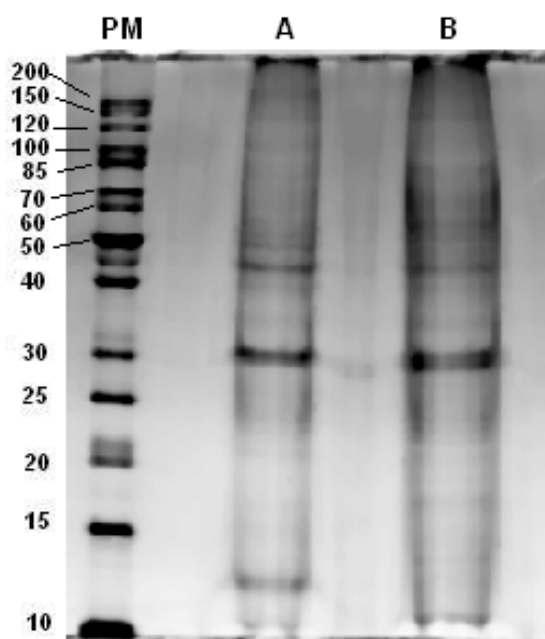


Tabla 8: Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para *Lu trapidoi* y *Lu. gomezi*.

Proteínas en kDa obtenidas por SDS-PAGE	
<i>Lu. trapidoi</i>	<i>Lu gomezi</i>
77	77
61	61
54	54
51	51
48	43
43	39
39	34
34	29
29	23
23	22
22	20
20	16
16	10
14	
12	

Estas observaciones son coherentes, al compararlas con las reportadas por Valenzuela y col.²², el cual, conociendo que la saliva de *Ph. papatasi*, vector de *Leishmania major*, aumenta la infección parasitaria⁴⁰ y que además, confiere una respuesta inmune localizada,⁴² analizó el LGS de este flebótomo por electroforesis SDS-PAGE y de igual manera, encontró un conjunto de proteínas salivales con pesos moleculares entre 13 y 200 kDa.²²

6.2 Determinación de la capacidad antigénica de las proteínas salivales de diferentes especies de *Lutzomyia*

El estudio de las proteínas salivales de *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, vectores de leishmaniasis cutánea, proporciona información importante al determinar cuáles proteínas de estos artrópodos hematófagos son inmunogénicas con posibles usos farmacéuticos o inclusive, como posibles candidatos para inmunización o proteínas de diagnóstico.

Algunas publicaciones muestran que los flebótomos además de transmitir patógenos, secretan proteínas en su saliva que causan un grado de protección contra la infección, ya que al inmunizar ratones con este contenido salival y exponerlos posteriormente a picaduras de estos insectos infectados, se genera una disminución tanto en la carga parasitaria como en la severidad de la lesión^{13,37}. Además, se ha comprobado que la saliva juega un rol importante en la infectividad de *Leishmania spp.* pero nuevas investigaciones han probado que antígenos salivales inoculados por flebótomos (hembras), durante la toma del alimento, estimulan la producción de altos niveles de anticuerpos anti-saliva^{42,44-47}.

El presente estudio reporta la primera evidencia de una población de perros, de un área endémica de leishmaniasis cutánea, que exhibe anticuerpos IgG contra antígenos presentes en las glándulas salivales de los vectores *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, ya que al evaluar los LGS de estas especies con perros seropositivos y

seronegativos para *Leishmania spp*, se detecta un conjunto de componentes inmunogénicos. Se evaluaron 66 sueros de perros (32 sueros positivos y 34 sueros negativos).

La **Figura 22** muestra que el flebótomo *Lu. ayrozai*, el cual hasta hoy no es considerado vector de leishmaniasis, presenta un antígeno salival de 77 kDa que genera una respuesta inmunogénica en los sueros de perros. Por el contrario, estos sueros reconocen un antígeno de 62 kDa presente en los LGS de *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, vectores de la enfermedad. La **Tabla 9** muestra las proteínas reconocidas en cada especie por los sueros 22 y 67.

Figura 22: Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar con sueros de perros infectados y no infectados con *Leishmania*. Línea 1: Suero 22 (+), Línea 2: suero 67 (-). LGS de: (A) *Lu. gomezi*, (B) *Lu. trapidoi*, (C) *Lu. ayrozai*.

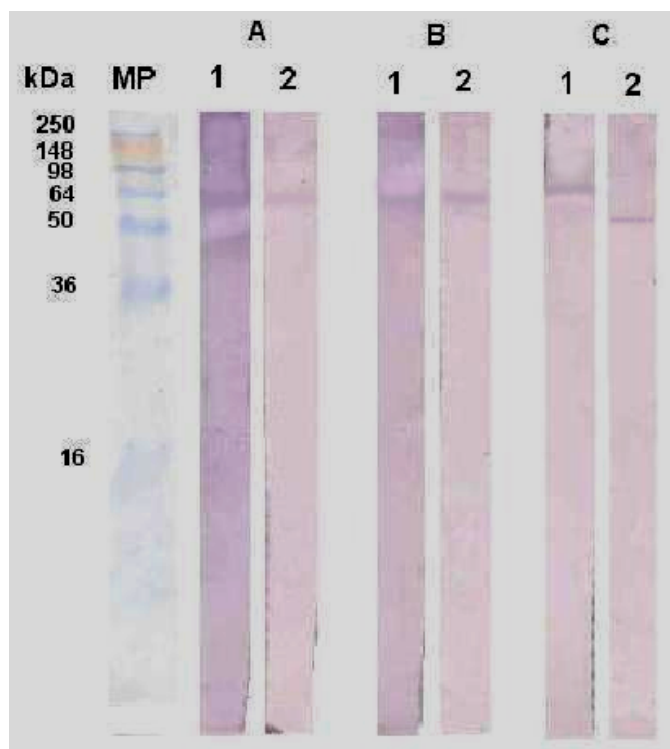


Tabla 9: Proteínas reconocidas, en los LGS de cada especie de *Lutzomyia*. Línea 1: suero positivo y línea 2: suero negativo.

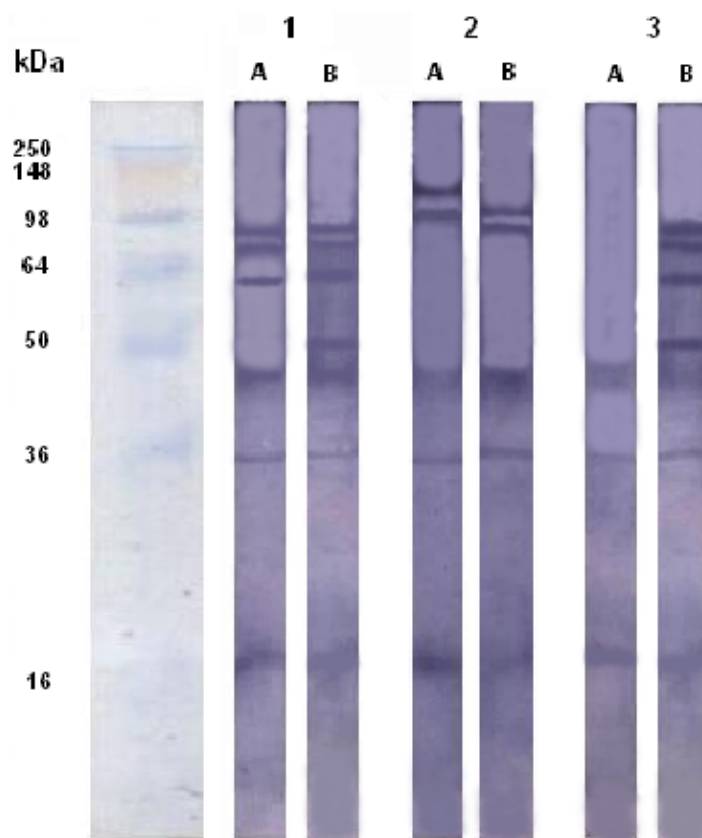
Masas Moleculares en kDa reconocidas por cada perro					
<i>Lu. gomezi</i>		<i>Lu. trapidoi</i>		<i>Lu. ayrozai</i>	
1	2	1	2	1	2
62	62	62	62	77	54
45					

Las bandas de proteínas observadas en la **Figura 23** indican que los anticuerpos de perros seropositivos presentan reactividad con varios antígenos (≥ 3 bandas), contenidos en el LSG de las especies evaluadas. La **Tabla 10** reporta las proteínas salivales reconocidas, en *Lu. gomezi* y en *Lu. trapidoi*, por los anticuerpos de los perros seropositivos. En esta tabla se puede observar que los patrones de reconocimiento son similares, al evaluar el mismo suero con los LGS de las dos especies.

Tabla 10: Proteínas reconocidas, en el LGS de: A) *Lu. gomezi* y (B) *Lu. trapidoi*, por tres sueros positivos (Líneas 1, 2 y 3).

Masas Moleculares en kDa reconocidas por cada perro					
1		2		3	
A	B	A	B	A	B
90	90	120	100	45	90
71	73	100	90	34	73
61	45	45	45	18	61
45	51	34	35		51
34	35	18	18		45
18	18				35
					18

Figura 23: Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar con sueros de perros infectados y no infectados con *Leishmania*. Línea 1: Suero 34 (+), Línea 2: suero 25 (+), línea 3: suero 27 (+). LGS de: (A) *Lu. gomezi*, y (B) *Lu. trapidoi*.



La **Figura 24** muestra los antígenos, presentes en el LGS de *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, reconocidos por perros infectados y no infectados con *Leishmania spp.* Los sueros positivos reconocen proteínas salivales con pesos moleculares similares tanto en *Lu. trapidoi* como en *Lu. gomezi*, proteínas de 18, 34 y 61 kDa son detectadas en los homogeneizados; mientras que los sueros negativos no reaccionaron con ningún antígeno salival. Las bandas de proteínas contenidas en los LGS de las especies evaluadas, que presentaron actividad inmunogénica al reaccionar con anticuerpos de perros seropositivos y seronegativos, se muestran en la **Tabla 11**.

Figura 24: Bandas obtenidas al incubar, con sueros de perros infectados (+) y no infectados (-), LGS de: (A) *Lu. trapidoi*, (B) *Lu. gomezi*.

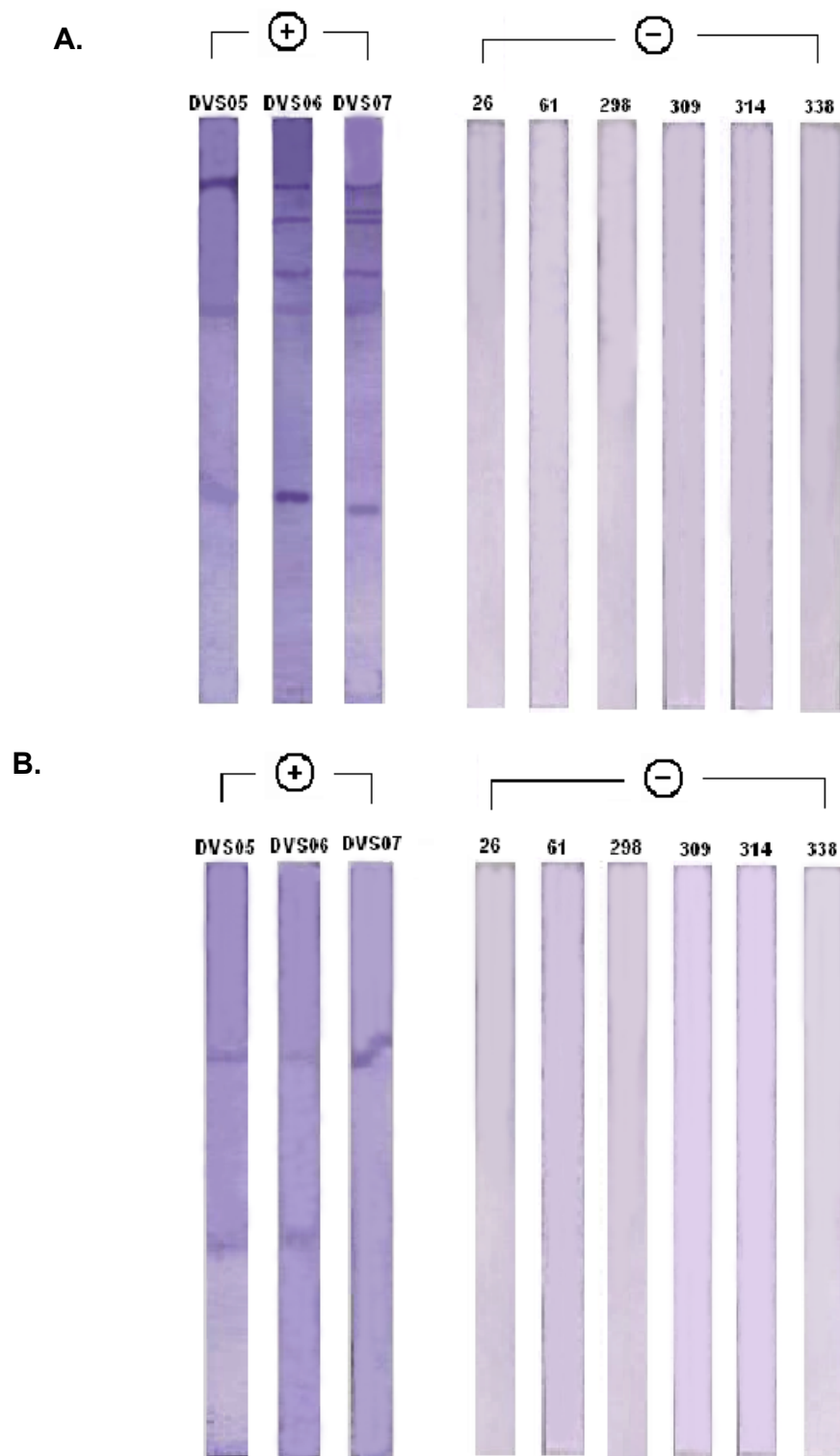


Tabla 11: Proteínas reconocidas, en el LGS de cada especie de *Lutzomyia*, por sueros positivos (DVS05-DVS07) y sueros negativos (26-338).

Masas Moleculares en kDa reconocidas por cada perro								
<i>Lu. trapidoi</i>								
DVS05	DVS06	DVS07	26	61	298	309	314	338
61	61	61						
34	45	51						
18	39	34						
	34	18						
	18							
<i>Lu. gomezi</i>								
DVS05	DVS06	DVS07	26	61	298	309	314	338
34	34	35						
18	18							

A partir de la **Figura 25** se observa que al evaluar el mismo suero con los homogeneizados salivales de las dos especies por aparte, los perros exhiben patrones de reconocimiento diferentes para cada especie, siendo el LGS de *Lu. trapidoi* más reactivo ante los anticuerpos de los perros seropositivos. Los sueros DVS79, BA40, 274, PYA3, 517, DVS 22 y DVS24 presentan un rango de bandas distinto, en *Lu. trapidoi* y en *Lu. gomezi*, en cuanto al peso molecular, intensidad de la banda y al número de proteínas reconocidas. Sin embargo, se observan algunas semejanzas en una o dos bandas de proteínas reconocidas. Por ejemplo, el suero BA40 detecta, en las dos especies, una proteína de 73 kDa. Lo mismo ocurre con otros sueros exhibiendo igualdad en proteínas de 71-73 kDa y 90-92 kDa. La **Tabla 12** muestra las masas moleculares de las bandas de proteínas reconocidas por los sueros DVS79 al PA27 y por los sueros 16 al DVS24.

Figura 25: Bandas obtenidas al incubar LGS de: (A) *Lu. trapidoi* con sueros de perros positivos y (B) LGS de *Lu. gomezi* con sueros negativos y positivos.

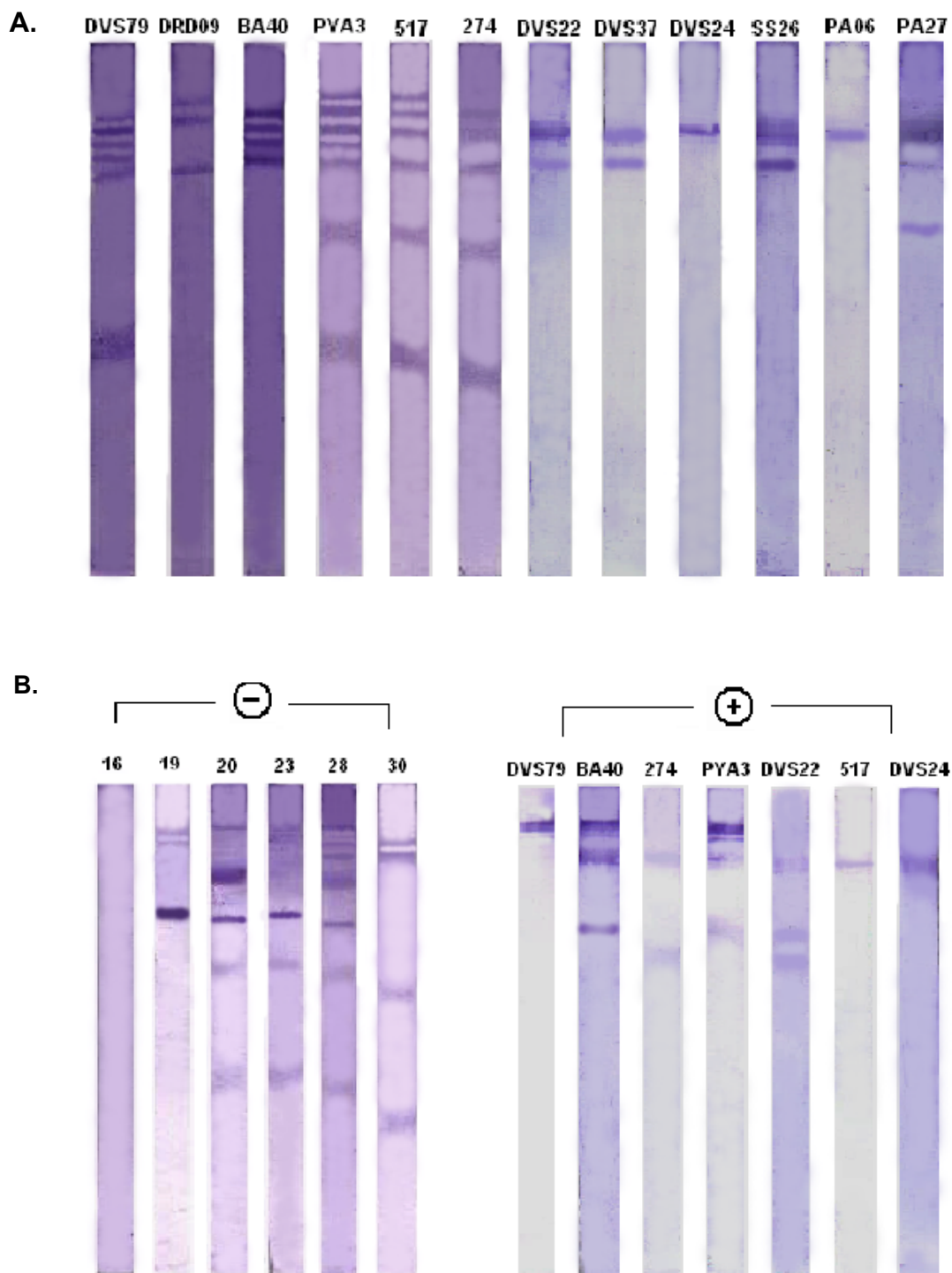


Tabla 12: Proteínas reconocidas en el LGS de: (A) *Lu. trapidoi* por los perros seropositivos y en (B) *Lu. gomezi* por los sueros positivos (DVS79-DVS24) y sueros negativos (16-30).

A.

Proteínas en kDa reconocidas por cada perro											
DVS79	DRD09	BA40	PYA3	517	274	DVS22	DVS37	DVS24	SS26	PA06	PA27
71	90	73	92	92	71	61	61	63	61	45	61
61	71	62	73	73	45	45	45				45
54	39	54	62	61	34						35
45		45	54	45	14						
39			45	35							
18			35	16							
			18								

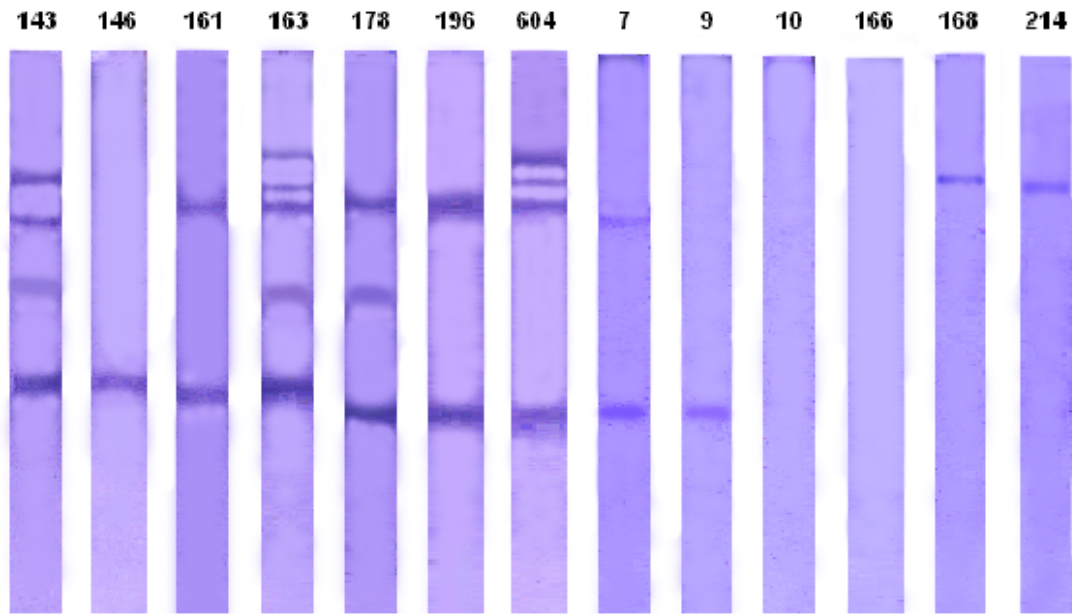
B.

Proteínas en kDa reconocidas por cada perro												
16	19	20	23	28	30	DVS79	BA40	274	PYA3	DVS22	517	DVS24
	100	110	110	110	90	110	110	73	110	71	71	71
	90	61	90	73	73		73	35	90	39		
	45	43	45	61	29		39		73	35		
		34	35	43	14				39			
		20	20	33								
				18								

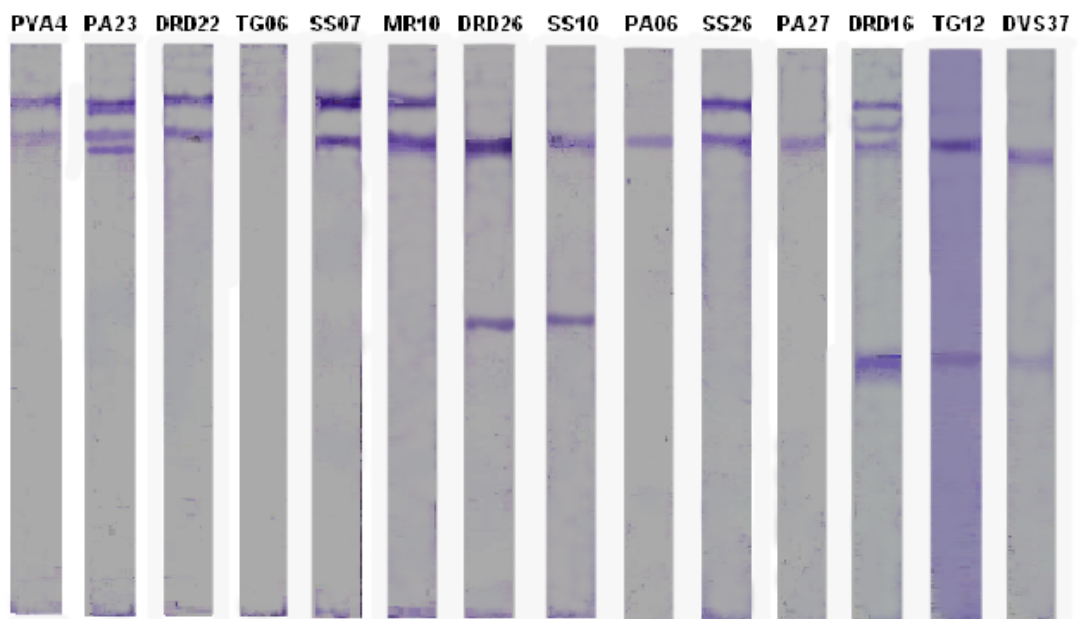
Los resultados del análisis mediante la técnica de inmunotransferencia revelaron un total de 11 proteínas antigénicas comprendidas entre 14 a 100 kDa para *Lu. trapidoi*.

Figura 26: Bandas obtenidas al incubar LGS de *Lu. gomezi* con sueros de perros. A) perros seronegativos, B) perros seropositivos y C) perros seropositivos y seronegativos.

A.



B.



C.

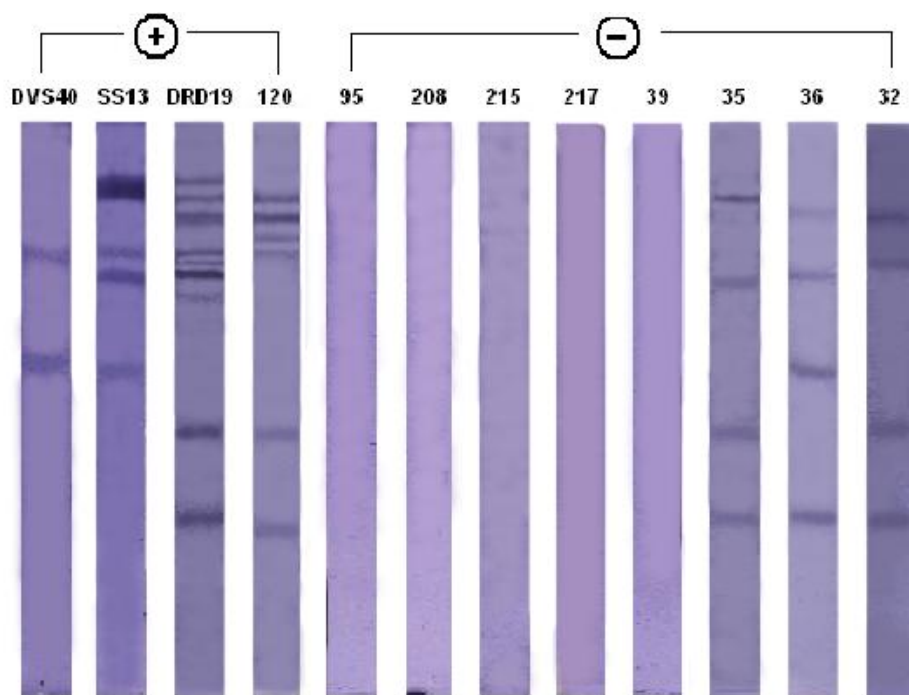


Tabla 13: Proteínas reconocidas en el LGS de *Lu. gomezi* por: A) sueros negativos codificados del 143 al 604, B) sueros positivos codificados del PYA4 al DVS37 y C) sueros positivos y negativos codificados del DVS40 al 32.

A.

Proteínas en kDa reconocidas por cada perro													
143	146	161	163	178	196	604	7	9	10	168	196	604	
61	22	44	73	44	45	73	39	18			62	61	
39		20	54	34	18	61	18						
35			45	18		44							
22			34			18							
			21										

B.

Proteínas en kDa reconocidas por cada perro													
PYA4	PA23	DRD22	TG06	SS07	MR10	DRD26	SS10	PA06	SS26	PA27	DRD16	TG12	DVS37
90	90	92		92	92	61	62	61	90	61	90	61	54
61	61	62		61	61	29	30		62		73	20	20
	54										61		
											20		

C.

Proteínas en kDa reconocidas por cada perro											
DVS40	SS13	DRD19	120	95	208	215	217	39	35	36	32
54	90	90	73						73	61	61
35	73	73	61						45	45	52
	54	61	54						29	34	29
	45	54	29						18	18	18
	34	45	18								
		39									
		29									
		18									

Con base en los datos reportados en las tablas 9 a 13, se observa que tanto los sueros positivos como negativos reconocen, en el LGS de *Lu. gomezi*, bandas con pesos moleculares similares. La diferencia radica en la frecuencia de reconocimiento de dichas bandas. Los sueros positivos detectan con mayor frecuencia proteínas entre el rango de 71-73 kDa (11 sueros) y aunque los sueros negativos reconocen proteínas en este rango, lo hacen de forma inconsistente (sólo 5 sueros). Por el contrario, 11 sueros negativos reconocen bandas en el rango de 43-45 kDa y solo 6 sueros positivos las detectan. Lo mismo ocurre con proteínas en el rango de 90-92, 61-63, 53-55 y 33-35 kDa, las cuales son más

reconocidas por los sueros positivos. Otras proteínas fueron reconocidas con menos frecuencia (≤ 1 sueros) y algunas presentan bandas débiles, debido a bajas concentraciones de la proteína reconocida o a reacciones cruzadas con antígenos de otros artrópodos.⁵³

Esta similitud también se observa con el LGS de *Lu. trapidoi*. Las proteínas con pesos moleculares entre 61-63 kDa son detectadas por perros tanto seropositivos (8 sueros) como seronegativos (1). En general, los resultados indican que los perros con baja reactividad en ELISA reconocen antígenos por inmunotransferencia, efecto igualmente observado en los estudios realizados por Gomes y col.,⁴⁷ y por Valenzuela y col.⁵³

En la **Tabla 14** y **Tabla 15** se muestran las frecuencias de reconocimiento de las proteínas, presentes en las glándulas salivales para cada especie estudiada, por perros seronegativos y seropositivos. Aproximadamente, el 97% y 59% de los perros seropositivos y seronegativos, respectivamente, muestran anticuerpos contra el homogeneizado salival de *Lu. gomezi* y el 100% de perros seropositivos exhiben anticuerpos para el LGS de *Lu. trapidoi*. Aunque en este estudio solo se evaluaron 7 sueros negativos con el LGS de *Lu. trapidoi*, solo un suero reaccionó con antígenos salivales de este flebótomo.

La frecuencia de proteínas antigénicas reconocidas por los sueros de perros de áreas endémicas para la leishmaniasis, muestra un conjunto de proteínas consistentes en la mayoría de sueros evaluados, incluyendo antígenos con pesos moleculares entre 18 y 90 kDa. Este reporte es semejante con el mostrado por Volf,⁴⁴ al evaluar LGS del *Ph. halepensis* con sueros de conejos. Este autor reporta un rango sobresaliente de bandas de proteínas entre 31 y 42 kDa.

⁵³ Barral, A.; Honda, E.; Caldas, A.; Costa, J.; Vinhas, V.; Rowton, E.; Valenzuela, J.; Charlab, R.; Ribeiro, J.M. "human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?". En: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. **62**,6 (2000); p. 740–745.

Tabla 14: Proteínas en kDa reconocidas por los perros infectados y no infectados con *Leishmania spp.* (SP = sueros positivos, SN = sueros negativos). (*. Se evaluaron 19 perros seropositivos con el LGS de *Lu. trapidoi*; **. Se evaluaron 7 perros seronegativos con el LGS de *Lu. trapidoi*).

PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO EN LOS SUEROS DE PERROS		
PROTEÍNAS kDa	<i>Lu. trapidoi</i>	
	SP*	SN**
100-98	1	
92-90	5	
73-71	7	
63-61	13	1
54-52	5	
45-43	12	
39	3	
35-33	10	
18	8	
16	1	
14	1	

Tabla 15: Proteínas en kDa reconocidas por los perros infectados y no infectados con *Leishmania spp.* (SP = sueros positivos, SN = sueros negativos).

PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO EN LOS SUEROS DE PERROS		
PROTEÍNAS kDa	<i>Lu. gomezi</i>	
	SP	SN
100-98	1	1
92-90	11	3
73-71	11	5
63-61	15	9
54-52	6	2
45-43	6	11
39	4	2
35-33	10	7
30-29	4	3
22-20	3	5
18	7	9
15-14		1

Dentro de las proteínas reconocidas por los perros evaluados en este estudio, existen varias que poseen pesos moleculares similares a los reportados en la literatura por otros investigadores. En el presente trabajo, al evaluar la capacidad antigénica de las proteínas salivales de dos especies de flebótomos, se reporta que 17 sueros de perros (positivos y negativos), reconocieron proteínas en el rango de 43-45 kDa para *Lu. gomezi* y 12 sueros para *Lu. trapidoi*. A su vez, 17 sueros detectaron proteínas en el rango de 32 a 35 kDa de LGS de *Lu. gomezi* y 10 sueros en *Lu. trapidoi*; 8 sueros reaccionaron con una proteína de 18 kDa en *Lu. trapidoi* y 16 sueros detectaron proteínas de LGS de *Lu. gomezi*. Estos resultados son consistentes con los reportados por Gomes y col.⁴⁵ Ellos evaluaron la capacidad antigénica de las proteínas salivales de *Lu. longipalpis* con sueros de perros, encontrando fuertes reacciones con proteínas de pesos moleculares de 44 y 45 kDa, mientras que otros sueros reaccionaron con unas de 15 y 32 kDa. Analizaron también el reconocimiento de las proteínas en sueros de humanos, seropositivos y seronegativos, que vivían en áreas endémicas,⁴⁶ reportando proteínas entre 6 y 200 kDa, destacándose: una proteína de 45 kDa que fue reconocida por 12 sueros y proteínas de 44, 43 y 35 kDa detectadas por 8 sueros.

Al comparar los componentes inmunogénicos detectados por los sueros de perros con los reportados con sueros de humanos,⁴⁶ vemos que existe cierto grado de similitud entre las proteínas reconocidas, ya que los dos tipos de sueros (perros y humanos) reconocen proteínas de 35 y 43-45 kDa con frecuencias de reconocimiento aproximadamente iguales. Estos resultados sugieren que en animales y personas, expuestas a picaduras de flebótomos, se generan patrones de respuesta inmune semejantes puesto que conservan el reconocimiento de ciertos antígenos salivales.

Los sueros evaluados no reconocieron bandas en el rango de 6-7 kDa, peso molecular aproximado de maxadilán, sugiriendo que en estos flebótomos ésta proteína no estaría presente en su contenido salival o no induce una respuesta fuerte debido a su baja concentración y/o potencia inmunogénica.

Al observar las **Tablas 14 y 15**, vemos que los rangos de detección predominantes fueron los comprendidos entre 32-35, 43-45, 61-63 y 71-73 kDa, incluyendo pesos moleculares de 18 kDa.

Los homogeneizados salivales de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi* presentan antígenos de 29, 35 y 43 kDa, datos similares a los reportados por Rohousova y col.⁵⁴ al evaluar anticuerpos de humanos y ratones con los homogeneizados salivales de *Ph. Papatasi* y *Ph. sergenti*. Ellos hallaron antígenos salivales con masas moleculares semejantes en los dos homogeneizados, con diferencias solo en la intensidad de la reacción. Los resultados reportan proteínas con pesos moleculares de 30, 36 y 42 kDa. El antígeno salival de 29 kDa, observado en los LGS de *Lu. gomezi*, también fue identificado en las glándulas salivales de *Lu. longipalpis*.⁴⁶

El presente estudio muestra que los anticuerpos reconocen preferencialmente proteínas de 18, 32-35, 43-45, 61-63 y 71-73 kDa, sugiriendo que estas proteínas son los mejores antígenos de la saliva de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, y que induciría la mayor respuesta inmune en los perros. Sería interesante conocer si los anticuerpos de dichas proteínas confieren el efecto protector en la transmisión de *Leishmania spp.* y si la inmunización por este antígeno inhibiría la infección de la misma manera que la SP15 de *Ph. papatasi*.

La posible descripción de las proteínas salivales de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, detectadas por anticuerpos de sueros de perros infectados y no infectados, mediante la técnica de inmunotransferencia, se expone a continuación:

- Proteínas de 14 kDa: Identificada en otros flebótomos pero no en otros insectos. En la saliva de *Lu. longipalpis* se encontró una proteína del mismo peso molecular al antígeno salival de 15 kDa, presente en la saliva

⁵⁴ Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; Volf, P. "Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies". En: Parasitology. Vol. **130**,5 (2005); p. 493-9.

de *Ph. papatasi* y generador del efecto protector contra la infección con *Le. major*. Aunque su función aún es desconocida, esta proteína está relacionada con una respuesta inmune localizada (DTH). Se ha reportado también en *Ph. argentipes*, *Ph. ariasi* y *Ph. perniciosus*.⁵⁵ Por tanto, las proteínas de 14 kDa aquí encontradas pueden presentar similitud con este tipo de moléculas. Esta familia no ha sido encontrada en otros insectos, sugiriendo que es específica de los flebótomos, y desarrolladas durante su evolución, para la adaptación y toma de alimento.

- ▶ Proteínas de 18 kDa: Posiblemente semejantes a la proteína de 16 kDa encontrada en *Lu. longipalpis* con función anticoagulante.¹⁰

- ▶ Proteínas de 29-30 kDa: Podrían pertenecer a la familia de proteínas D7. Se han encontrado en *An. gambiae* y *Ae. aegypti* con actividad anticoagulante debido a que inhibe la activación del factor XII, uniéndose a aminas biogénicas como serotonina, histamina y norepinefrina,⁴⁸ las cuales están involucradas en vasoconstricción, agregación plaquetaria e inducción del dolor. La proteína D7 reportada en *An. stephens*, mostró tener un carácter inhibitorio de la coagulación.⁹ Aunque se tienen estas observaciones, la función exacta en flebótomos es desconocida. Este tipo de moléculas presentan en su estructura 13 dominios alfa hélice.⁴⁸

- ▶ Proteínas de 32 a 35 kDa: Pertenecientes, posiblemente, a la familia de apirinas salivales. Este tipo de proteínas fue identificada por primera vez en *Cimex lectularius*. Se ha demostrado la presencia de estas proteínas en *Lu. longipalpis*,⁹ *Ph. perniciosus*⁵⁶ y en *Ph. papatasi* e igualmente se reportó dependencia de éstas a los iones calcio.⁶ Las apirinas secretadas son potentes factores antiplaquetarios debido a que hidrolizan el ADP, el

⁵⁵ Anderson, J.M.; Oliveira, F.; Kamhawi, S.; Mans, B.J.; Reynoso, D.; Seitz, A.E.; Lawyer, P.; Garfield, M.; Pham, M.; Valenzuela, J.G. "Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis". En: *BMC Genomics*. Vol. 7,52 (2006); p. 1-23.

cual es un activador plaquetario. Las apirinas encontradas en humanos hidrolizan preferencialmente GDP. Esta especificidad puede ser consecuencia de sustituciones de aminoácidos.

- ▶ Proteínas de 39 kDa: Proteínas con función desconocida encontradas en *Lu. longipalpis*, *Ph. ariasi* y *Ph. perniciosus*.⁵⁶
- ▶ Proteínas de 43 a 45 kDa: Parece ser que este tipo de proteínas es derivado de un ancestro común de proteínas Royal Jelly presentes en abejas. Pertenecen a la familia de proteínas YELLOW y han sido descritas en otros flebótomos.^{55,56} El gen que codifica esta proteína fue identificado por primera vez en *Drosophila melanogaster*. Un homólogo de esta familia fue purificado en *Aedes aegypti*, exhibiendo actividad dopa decarboxilasa.⁵⁶ Estas moléculas podrían estar implicadas en el desarrollo de la inmunidad celular a *Leishmania spp.* de la misma manera como se observó con el antígeno salival de 45 kDa de *Ph. papatasi*. Sin embargo, la función concreta de este tipo de proteínas sigue en estudio.
- ▶ Proteínas de 54 kDa: Puede corresponder a una Adenosina Deaminasa (ADA), enzima que metaboliza adenosina a inopina. Este tipo de proteína han sido identificada en *Ph. duboscqi*.²²
- ▶ Proteínas de 61 a 63 kDa: Proteínas pertenecientes a la familia de 5'-nucleotidasas. Esta proteína es semejante a la encontrada en *Lu. longipalpis* de 61 kDa. Este tipo de proteínas hidrolizan los enlaces fosfodiésteres, incrementando la concentración de cAMP, inhibidor de la agregación plaquetaria.
- ▶ Proteínas de 71 a 73 kDa: Pesos moleculares similares reportados en *An. gambiae*, *Drosophila melanogaster*, pollos y humanos. Puede ser similar a las enzimas convertidoras de la angiotensina,⁹ pero su función concreta sigue en estudio.

Proteínas de pesos moleculares por encima de 75 kDa, reportadas en este estudio, no han sido analizadas con detalle en otros flebótomos, por tanto no se conoce sus posibles familias de proteínas ni su función biológica.

La producción y evaluación de varios antígenos recombinantes, con un rol marcado, puede llegar a sustituir el LGS ya que una evaluación detallada de los componentes salivales, para la epidemiología o control de leishmaniasis, requiere grandes cantidades de antígeno.

Las soluciones comunes para el control de leishmaniasis en humanos están basadas en la eliminación de perros infectados, tratamientos de casos en humanos y control del vector con insecticidas, pero estas estrategias son difíciles de sobrellevar por su alto costo, además sabemos que estos insectos desarrollan resistencia contra algunos insecticidas utilizados para su control biológico. Por esta razón, es importante la introducción de nuevas alternativas de control de la enfermedad, tales como por ej. el desarrollo de vacunas para perros. Esta estrategia podría representar una solución práctica y eficiente, reduciendo el ciclo de transmisión perro-insecto e insecto-perro lo cual es importante para evitar la transmisión hacia los humanos. Además, las estrategias basadas en la inmunización del huésped con la saliva del artrópodo podrían ser empleadas para interferir en aspectos vitales del ciclo biológico de los vectores, ya que el diseño de una vacuna para el parásito es muy complicado por la complejidad del patógeno y sus interacciones con el huésped. Por esto, los componentes salivales de los flebótomos podrían ser considerados candidatos potenciales para elaborar vacunas buscando la prevención de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

Se encontraron proteínas salivales de diferente masa molecular en *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi*, las cuales fueron reconocidas por sueros de perros infectados con *Leishmania spp.* y que son consistentes con las encontradas en otros flebótomos.

Los resultados obtenidos de proteínas detectadas por inmunotransferencia y electroforesis indicarían un cierto grado de conservación de algunas familias de proteínas presentes en las glándulas salivales, tales como apirinasas, YELLOW, 5'-nucleotidasas y la proteína similar a la encontrada en *Lu. longipalpis* con función anticoagulante. Probablemente, estos componentes son claves para la adaptación y desenvolvimiento favorable en la alimentación, así siendo indispensables para la supervivencia del artrópodo hematófago.

La mayoría de componentes salivales de los flebótomos *Lu. gomezi* y *Lu. trapidoi* fueron altamente inmunogénicos. Estos datos son significativos para la caracterización de las proteínas salivales y el conocimiento de las relaciones entre vector-parásito y vector-huésped.

Se alcanzó un alto grado de reconocimiento, en sueros de perros tipificados como negativos, para proteínas de 43-45 kDa de LGS de las especies de *Lutzomyia*. Este resultado sugiere que la respuesta inmune en los perros es un evento complejo y que en ocasiones puede generar un patrón distinto de reactividad de acuerdo con el tiempo e intensidad de la exposición a picaduras de los flebótomos.

Las proteínas inmunogénicas con pesos moleculares entre 33-35 y 61-63 kDa, contenidas en el homogeneizado salival de las especies de *Lutzomyia*, fueron los antígenos que generaron una consistente respuesta inmune al reaccionar con los sueros de perros. Siendo el antígeno salival de 61-63 kDa el más reconocido en las dos especies estudiadas.

8. RECOMENDACIONES

A partir de estos estudios preliminares sobre las proteínas antigénicas de *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, vectores de leishmaniasis, se recomienda la identificación de las secuencias por EDMAN o mediante técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se recomienda la separación e identificación de las proteínas salivales con capacidad antigénica alta, presentes en *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi*, para conocer el posible rol de dichos componentes, tanto en la toma del alimento como en la transmisión de los patógenos.

Desarrollar técnicas electroforéticas más eficientes, tales como electroforesis 2D, de manera que se pueda llevar a cabo un análisis proteómico, permitiendo un análisis más completo de los componentes salivales de los flebótomos, con fines farmacológicos o protectivos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que se necesita grandes cantidades de antígenos salivales para poder obtener un análisis detallado.

Es aconsejable evaluar un mayor número de sueros con el fin de tener más certeza de los antígenos salivales comunes entre los flebótomos, para acercarnos más al entendimiento del mecanismo de transmisión de *Leishmania spp.*

9. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J.M.; Oliveira, F.; Kamhawi, S.; Mans, B.J.; Reynoso, D.; Seitz, A.E.; Lawyer, P.; Garfield, M.; Pham, M.; Valenzuela, J.G. "Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis". En: *BMC Genomics*. Vol. 7,52 (2006); p. 1-23.

Bahia, D.; Gontijo, N.F.; Leon, I.R.; Perales, J. "Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*". En: *Parasitol Res*. Vol. 100,3 (2007); p. 449-54.

Barral, A.; Honda, E.; Caldas, A.; Costa, J.; Vinhas, V.; Rowton, E.; Valenzuela, J.; Charlab, R.; Ribeiro, J.M. "human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker?". En: *Am. J. Trop. Med. Hyg*. Vol. 62,6 (2000); p. 740–745.

Belkaid, Y.; Valenzuela, J.G.; Kamhawi, S.; Rowton, E.; and Ribeiro, J. "Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?". En: *PNAS*. Vol. 97,12 (2000); p. 6704-09.

Belkaid, Y.; Kamhawi, S.; Modi, G.; Valenzuela, J.; Noben-Trauth, N.; Rowton, E.; Ribeiro, J.; 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*. Vol. 188,10 (1998); p. 1941-53.

Burnette, W.N. "Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". En: *Analytical Biochemistry*. Vol. 112,2 (1981); p. 195–203.

Brush, M. "Dye Hard: Protein Gel Staining Products". En: *The Scientist*. Vol. 12,10 (1998); p.16

Cerna, P.; Mikes, L.; Volf, P. "Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae)". En: *Insect Biochem Mol Biol*. Vol. 32,12 (2002); p. 1691-7.

Charlab, R.; Rowton, E.D.; Ribeiro, J.M. "The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: *Exp Parasitol*. Vol. 95,1 (2000); p. 45-53.

Charlab, R.; Valenzuela, J.G.; Rowton, E.D. and Ribeiro, J.M. "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*". En: *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 96,26 (1999); p. 15155-15160.

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*. Vol. 33,2 (1999); p. 107-14.

Ghosh, K.N.; and Mukhopadhyay, J. "The effect of anti-sandfly saliva antibodies on argentine and *Leishmania dmovani*". En: *International Journal for Parasitology*. Vol. 28 (1998); p. 275-281.

Gillespie, R. Dean.; Mbow, M. Lamine. ; Titus, Richard. "The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva". En: *Parasite immunology*. Vol. 22 (2000); p. 319-331.

Gomes, R.B.; Mendonça, I.L.; Silva, V.; Ruase, J. "Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania*

chagasi". En: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 101 (2006); p. 127-33.

Gomes, R.B.; Brodskyn, C.; de Oliveira, Cl.; Costa, J.; Miranda, J.C.; Caldas, A.; Valenzuela, J. "Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity". En: *J Infect Dis*. Vol. 186,10 (2002); p. 1530-4.

Hall, L.R. and Titus, R. "Sand Fly Vector Saliva Selectively Modulates Macrophage Functions That Inhibit Killing of *Leishmania major* and Nitric Oxide Production". En: *J Immunology*. Vol. 155,7 (1995); p. 3501-06.

Jackson, T.S.; Lerner, E.; Weisbrod, R.M.; Tajima, M. "Vasodilatory properties of recombinant maxadilan". En: *Am J Physiol*. Vol. 271,3 (1996); p. 924-30.

Kamhawi, S. "The biological and immunomodulatory properties of sand fly and its role in the establishment of *Leishmania* infections". En: *Microbes and infection*. Vol. 2 (2000); p. 1765-73.

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". En: *J Exp Biol*. Vol. 210,5 (2007); p. 733-40.

Kato, H.; Anderson, J.M.; Kamhawi, S.; Oliveira, F.; Lawyer, P.G. "High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya)". En: *BMC Genomics*. Vol. 7,226 (2006).

Katz, O.; Waitumbi, J.N.; Zer, R.; Warburg, A. "Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva". En: *Am J Trop Med Hyg.* Vol. 62,1 (2000); p. 145-50.

Killick-Kendrick, R. "The biology and control of *Phlebotomine* sand flies". En: *Clinics in Dermatology.* Vol. 17 (1999); p. 279-8.

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*". En: *J Biol Chem.* Vol. 266,17 (1991); p.11234-6.

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.* Vol. 272,2 (1997); p. 966-70.

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

Ribeiro, J.M.; Francischetti, M.B. "Role of arthropod saliva in blood feeding". En: *Annu. Rev. Entomol.* Vol. 8 (2003); p. 73-88.

Ribeiro, J.M.; Modi, G. "The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes*, *annandale* and *brunetti*, the main vector of human kala-azar". En: *J Parasitol.* Vol. 87,4 (2001); p. 915-7.

Ribeiro, J.M.C.; Rowton, E.; Charlab, R. "The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagus sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*". En: *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 30 (2000); p. 279-85.

Ribeiro, J.M.; Charlab, R.; Rowton, E.D.; Cupp, E.W. “*Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity”. En: *J Med Entomol.* Vol. 37,5 (2000a); p. 743-7.

Ribeiro, J.M.; 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.* Vol. 202,11 (1999); p. 1551-9.

Ribeiro, J.; Ariz, T.; Lerner, E.; Remold, H. “Vasodilatory peptides from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*”. En: Patent number: 5.397.772. codigo: US005397772A (1995)

Ribeiro, J.M.C.; Nussenzveig, R.H. “The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito, *Anopheles albimanus*”. En: *J. Exp. Biol.* Vol. 179 (1993); p. 273–87.

Ribeiro, J.M.C.; Modi, G.B.; and Tesh, R.B. “Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies”. En: *Insect biochem.* Vol. 19 (1989); p. 406-12.

Ribeiro, J.M.; Vachereau, A.; Modi, G.B.; Tesh, R.B. “A novel vasodilatory from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*”. En: *Science.* Vol. 243,4888 (1989a); p. 212-14.

Ribeiro, J.M.C.; Modi, G.B.; and Tesh, R.B. “Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly *Lutzomyia Longipalpis*”. En: *Comp Biochem Physiol.* Vol. 83A,4 (1986); p. 683-6.

Rogers, K.A.; Titus, R.G. “Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses”. En: *Parasite Immunol.* Vol. 25,3 (2003); p. 127-34.

Rohousová, I. and Volf, P. "Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* Transmission". En: *folia parasitologica*. Vol. 53 (2006); p. 161–171.

Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; Volf, P. "Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies". En: *Parasitology*. Vol. 130,5 (2005); p. 493-9.

Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; Volf, P. "Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies". En: *Parasitology*. Vol. 130,5 (2005a); p. 493-9.

Samuelson, J.; Lerner, E.; Tesh, R.; Titus, R. "A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva". En: *J Exp Med*. Vol. 173,1 (1991); p. 49-54.

Shapiro, A.L.; Viñuela, E.; Maizel, J.V. Jr. "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels". En: *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 28,5 (1967); p. 815-820

Soares, M.B.; Titus, R.G.; Shoemaker, C.B.; David, J.R.; Bozza, M. "The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor". En: *J Immunol*. Vol. 160,4 (1998); p. 1811-6.

Stark, K.R.; James, A. "Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*". En: *Biol Chem*. Vol. 273, 33 (1998); p. 20802-20809.

Titus, Richard G.; Ribeiro, Jose M. C. "Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance Leishmania infectivity". En: Science. Vol. 239,4845 (1988); p. 1306-1308.

Theodos, C.M.; Ribeiro, J.M.; Titus, R.G. "Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice". En: Infect Immun. Vol. 59 (1991); p. 1592-8.

Valenzuela, J.G.; Rowton, E.D. "Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*". En: J. Exp. Bio. Vol. 207 (2004); p. 3717-29.

Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Rowton, E.; Ribeiro, J.M. "The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases". En: J Exp Biol. Vol. 204,2 (2001); p. 229-37.

Valenzuela, J.G.; Belkaid, Y.; Garfield, M.K.; Mendez, S.; Kamhawi, S.; Rowton, E.D.; Sacks, D.L.; Ribeiro, J.M. "Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein". En: J Exp Med. Vol. 194,3 (2001a); p. 331-42.

Valenzuela, J.G.; Francischetti, I.M.; Ribeiro, J.M. "Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*". En: Biochemistry. Vol. 38 (1999); p. 11209–15.

Volf, P.; Rohousova, I. "Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies". En: Parasitology. Vol. 122,1 (2001); p. 37-41.

Warburg, A.; Saraiva, E.; Lanzaro, G.C.; Titus, R.G.; Neva, F. "Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to

enhance leishmaniasis". En: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Vol. 345,1312 (1994); p. 223-30.

Ward, Richard D. "Some aspects of the biology of phlebotomine sandfly vectors". En: *Advances in Disease Vector Research.* Vol. 6 (1990); p. 91-126.

Wikel, S. "Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods". En: *Bioscience.* Vol. 49 (1999); p. 311–320.

Wikel, S. "Tick modulation oh host cytokines". En: *Exp. Parasitology.* Vol. 84 (1996); p. 304-9.

Yin, H.; Norris, D.E.; Lanzaro, G.C. "Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan". En: *Insect Mol Biol.* Vol. 9,3 (2000); p.309-14.