



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

-

DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgY CONTRA PROTEÍNAS DE
PARASITAS E VETORES DE LEISHMANIOSE E MALÁRIA EM *Gallus
gallus* LINNAEUS.

Rarissa de Oliveira e Silva

MANAUS
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgY CONTRA PROTEÍNAS DE
PARASITAS E VETORES DE LEISHMANIOSE E MALÁRIA EM *Gallus
gallus* LINNAEUS.

Rarissa de Oliveira e Silva

Orientador: Dr. Luis André Moraes Mariuba

Co-orientador: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

MANAUS
2019

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- S586d Silva, Rarissa de Oliveira e
Detecção de anticorpos IgY contra proteínas de parasitas e vetores de
leishmaniose e malária em Gallus gallus linnaeus / Rarissa de Oliveira e
Silva. - 2019.
74 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Luis André Morais Mariuba.
Coorientador(a): Felipe Arley Costa Pessoa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2019.
1. flebotomíneos. 2. anofelinos. 3. IgY. 4. biomarcador epidemiológico.
I. Mariuba, Luis André Morais. II. Pessoa, Felipe Arley Costa. III.
Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada. IV. Título
-

RARISSA DE OLIVEIRA E SILVA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgY CONTRA PROTEÍNAS DE PARASITAS E
VETORES DE LEISHMANIOSE E MALÁRIA EM *Gallus gallus* LINNAEUS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada

APROVADA EM 28 / 06/ 2019

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Luis André Morais Mariúba (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Juliana Luíza Varjão Lameiras (Membro Titular Interno)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Keillen Monick Martins Campos (Membro Titular Externo)
Instituto Leônidas & Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia

Know your own happiness. You want nothing but patience or give more fascinating name, call hope.

Jane Austen

RESUMO

Vetores são organismos vivos com capacidade de transmitir doenças infecciosas entre humanos ou de animais para humanos. Alguns insetos vetores se alimentam de sangue e ingerem microorganismos, como os protozoários, presentes no sangue do hospedeiro infectado. As leishmanioses e malária são doenças infecciosas transmitidas por vetores flebotomíneos e anofelinos, respectivamente. As fêmeas vetoras realizam a alimentação sanguínea para maturação dos ovos, e como mecanismo evolutivo foram desenvolvidas proteínas salivares para aumentar a ingestão de sangue. As proteínas apresentam ações vasodilatadoras e imunomoduladoras podendo ser usados para monitoramento de exposição ao vetor. Os objetivos desses trabalhos foram revisar estudos sobre o uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição aos vetores de leishmaniose e malária, avaliar a resposta humoral a partir de sangue e ovos de galinhas expostas experimental e naturalmente à saliva de *Migonyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* e *Anopheles aquasalis*, e determinar a produção de anticorpos em ovos de galinhas das mesmas espécies expostas naturalmente a flebotomíneos e anofelinos. Como resultado produziu-se uma revisão sistemática compilada com trabalhos demonstrando que vários hospedeiros produzem anticorpos contra as proteínas salivares e as galinhas encontradas nas áreas endêmicas são animais sentinelas úteis para análise de flebotomíneos e anofelinos, pois produzem anticorpos altamente específicos a essas proteínas. O trabalho com galinhas expostas a repasto controlado de fêmeas de anofelinos e flebotomíneos apresentou altos índices de anticorpos anti-saliva IgY após a primeira imunização tanto em ovo quanto em soro. Ao analisar a reatividade cruzada entre os insetos detectou-se baixos níveis de proteínas entre os flebotomíneos, devido ao compartilhamento de proteínas salivares entre as espécies, e entre anofelinos e flebotomíneos não observou níveis significativos de resposta portanto os anticorpos produzidos são específicos para as proteínas salivares de artropodes estudados. Diante desses resultados, foram analisados 85 ovos de galinhas provenientes do Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, Brasil com intuito de testar em campo o modelo produzido. Nos testes imunológicos com antígenos salivares de *Migonyia migonei* e *Anopheles aquasalis* determinaram-se altos níveis de anticorpos IgY em todas as aves presentes nos ramais da comunidade. Após a soroconversão das galinhas para as proteínas da saliva examinou a capacidade de resposta humoral para proteínas de *Leishmania* e *Plasmodium*, altos níveis de anticorpos anti-*Plasmodium* e anti-*Leishmania* foram produzidos. Sugere-se que proteínas salivares podem ser usadas como biomarcadores de exposição aos vetores e proteínas dos parasitas para a avaliação de risco de transmissão de leishmaniose e malária.

Palavras-chave: flebotomíneos, anofelinos, IgY, e biomarcador epidemiológico.

ABSTRACT

Vectors are living organisms capable of transmitting infectious diseases between humans or animals to humans. Some insect vectors feed on blood and ingest microorganisms, such as protozoa, present in the blood of the infected host. Leishmaniasis and malaria are infectious diseases transmitted by sandflies and anopheline vectors, respectively. Female vectors perform blood feeding for egg maturation, and as an evolving mechanism, salivary proteins have been developed to increase blood intake. The proteins present vasodilator and immunomodulatory actions and can be used to monitor vector exposure. The objectives of this work were to review studies on the use of salivary proteins as biomarkers of exposure to leishmaniasis and malaria vectors, to evaluate the humoral response of blood and eggs from experimentally exposed chickens to the bites of *Migonomyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*, and to determine the production of antibodies in eggs of chickens naturally exposed to sandflies and anophelines. As a result a systematic review compiled with works demonstrating that several hosts produce antibodies against salivary proteins and chickens found in the endemic areas are sentinel animals useful for the analysis of sandflies and anophelines, since they produce highly specific antibodies to these proteins. Experimental work with chickens exposed to controlled repast of anophelines and sand flies showed high IgY anti-saliva antibody rates after the first immunization in both egg and serum. When analyzing the cross-reactivity between insects, low levels of sandflies were detected due to the sharing of salivary proteins between the species, and between anophelines and sandflies did not observe significant levels of response, therefore the antibodies produced are specific for salivary species to arthropods studied. Considering these results, we analyzed 85 eggs from chickens from the Rio Pardo settlement, Presidente Figueiredo-Amazonas, Brazil, in order to test the model produced in the field. In the immunological tests with salivary antigens of *Migonomyia migonei* and *Anopheles aquasalis* high levels of IgY antibodies were determined in all branches of the community. After the seroconversion of the chickens to the saliva proteins the humoral responsiveness to *Leishmania* and *Plasmodium* proteins was examined, high levels of anti-*Plasmodium* and anti-*Leishmania* antibodies were produced. It is suggested that salivary proteins can be used as biomarkers of exposure to parasite vectors and proteins to detect the risk of transmission of leishmaniasis and malaria.

Keyword: Sandflies, anopheline, IgY, epidemiological biomarker.

Lista de abreviaturas

BSA	Albumina de Soro Bovino
DO	Densidade Óptica
DTH	Hipersensibilidade do Tipo Tardia.
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
FasI	Fas Ligante
Gsg6-P1	Peptídeo 1 da Proteína de Glândula 6
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IL-	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p40	Interleucina 12p40
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
INCRA	Instituto Nacional De Colonização E Reforma Agrária.
INF- Γ	Interferon Gama

iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
PBS	Tampão De Salina Fosfatada
PEG	Polietileno Glicol
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SGS	Sonicado de Glândula Salivar
TGF-B	Fator de Crescimento Transformante Beta
TNF-A	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
TMB	Tetrametilbenzidina (TMB-Sigma)

Lista de ilustrações

Capítulo 1

Tabela 1. Biomarcadores de exposição a flebotomíneos e anofelinos.....	24
---	----

Capítulo 2

Figure 1: Production of antibodies against salivary gland proteins in insect vector species. Production of antibodies against salivary gland protein.....	3/5
--	-----

Figure 2: Titration ELISA.....	4/5
---------------------------------------	-----

Figure 3: Cross reactivity analysis ELISA.....	4/5
---	-----

Capítulo 3

Figura 1. (A) Mapa do Brasil, destacando o Estado do Amazonas, (B) Mapa do Amazonas, destacando os municípios Manaus, Presidente Figueiredo e o Assentamento Rio Pardo.....	48
--	----

Figura 2. GOOGLE EARTH (modificado). Mapa do satélite do Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, 2019.....	49
--	----

Figura 3. Gráfico de Produção de anticorpos contra proteínas salivares de <i>Lutzomyia longipalpis</i> <i>Anopheles. aquasalis</i> e <i>Migonemyia migonei</i>	52
---	----

Figura 4. Correlação entre a produção de anti-SGS.....	54
---	----

Figura 5. Produção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> e anti- <i>Plasmodium</i> por ovos de galinhas.....	56
---	----

Figura 6. Correlação entre a produção de anti-parasitas.....	57
---	----

Figura 7. Correlação entre presença de anticorpos anti-SGS e anti-parasita por ramal.....	59
--	----

Tabela 1. Resultado do gráfico de regressão de modelos lineares generalizados (GLM) de dois fatores para saliva.....	55
---	----

Tabela 2 Resultado do gráfico de regressão de modelos lineares generalizados (GLM) de dois fatores para parasitas.....	58
---	----

Tabela 3. Relação de casos de leishmanioses no local de coleta dos ovos.....	61.
---	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 1	15
Uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição a vetores de Leishmaniose e Malária: uma revisão sistemática.	16
1.INTRODUÇÃO.....	18
2.METODOLOGIA.....	19
3.RESPOSTA IMUNE ÀS PROTEÍNAS SALIVARES DE FLEBOTOMÍNEOS E ANOFELINOS	20
3.1 Flebotomíneos	20
3.2 Anofelinos	22
4. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AOS VETORES.....	24
4.1.1 Flebotomíneos	25
4.1.2. Anofelinos	25
4.2 Anticorpos de cobaias, camundongos e coelhos.....	26
4.3 Anticorpos em animais sentinelas.....	27
4.3.1 Anticorpos de cachorros, gatos, cabras e lebres.....	27
4.4 Anticorpos de galinhas.....	28
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	36
Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmanias vector presence	37
1.INTRODUÇÃO	37
2. METODOLOGIA.....	37
3.RESULTADOS	38
4.DISSCUSSÃO	38
CAPÍTULO 3	42
Uso de ovos galinhas sentinelas em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana e Malária como: proposta para vigilância sanitária	43
1.INTRODUÇÃO	45
2. METODOLOGIA.....	48
2.1 Desenho Amostral.....	48
2.2 Glândulas salivares	49
2.3 Extrato dos parasitas	50
2.4 Extração do IgY e Quantificação das proteínas	50

3.RESULTADOS	52
3.1 Detecção de anticorpos anti-saliva.....	52
3.2 Correlação entre Ramais e Anti-SGS.....	53
3.3 Produção de anticorpos anti-parasita.....	56
3.4 Correlação entre Ramais e Parasitas	57
4.DISCUSSÃO	63
5.CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	73

INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores são responsáveis por 17% de todas as doenças infecciosas e causam mais de 700 mil mortes anualmente no mundo (WHO, 2017). Malárias e leishmanioses são exemplos de doenças infecciosas transmitidas por vetores.

Malárias são doenças causadas por protozoários do gênero *Plasmodium* sp e a transmissão ocorre através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados com o parasita durante a alimentação sanguínea. Em 2017, estima-se que ocorreram 219 milhões de casos de malária no mundo com 435 mil mortes neste ano. Como medida preventiva, a Organização Mundial da Saúde recomenda o controle do vetor ou quimioprevenção provenientes de medicação que suprime a infecção (WHO, 2018). As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por picadas de fêmeas de flebotomíneos. Apresentam uma ampla distribuição geográfica e a maioria dos casos ocorrem nas Américas, África e Ásia (WHO/PAHO, 2019). As leishmanioses podem apresentar lesões cutâneas e mucocutâneas chamadas de Leishmaniose Tegumentar (LT) ou acometer as vísceras, classificadas como Leishmaniose Visceral (LV) (BRASIL, 2017a; WHO/PAHO, 2019).

As fêmeas do artrópode, durante a picada, inoculam saliva contendo proteínas das glândulas salivares. Animais domésticos servem como hospedeiros para alimentação desses vetores em áreas endêmicas, incluindo a galinha que é amplamente encontrada nos ambientes rurais e periurbanos. Os animais desenvolvem uma resposta humoral às proteínas salivares dos insetos com a produção de anticorpos altamente específicos (SCHWARZ et al., 2009b). Essas proteínas apresentam ações vasodilatadoras e anti-hemostáticas que cooperam para a alimentação sanguínea (ANDRADE et al., 2005; KILLICK-KENDRICK, 1999; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003).

O uso de anticorpos contra as proteínas das glândulas salivares como marcadores de exposição às picadas de vetores de doenças infecciosas vem sendo descrito em diversos trabalhos desde a década de 1990 (ANDRADE et al., 2009; BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2001; ORLANDI-PRADINES et al., 2007; PALOSUO et al., 1997; REMOUE et al., 2006; SCHWARZ et al., 2009a, 2011; SOUZA et al., 2010; VOLF; GRUBHOFFER; HOŠEK, 1993). Schwartz et al (1990) identificaram anticorpos anti-carrapatos e observaram que esses anticorpos poderiam ser usados como ferramenta epidemiológica na doença de Lyme. Os autores usaram proteínas da glândula salivar como antígenos e os níveis de anticorpos foram analisados. As pessoas que foram expostas aos

carrapatos apresentaram altos índices de anticorpos anti-saliva e aquelas não expostas ao carrapato apresentaram menor índice de anticorpos (SCHWARTZ; RIBEIRO; GOLDSTEIN, 1990).

Marzouki et al (2015) na Tunísia determinaram que a proteína recombinante PpSP32 da saliva de *Phlebotomus papatasi* poderia ser usada como marcador de exposição humana ao vetor de *Leishmania major* (MARZOUKI et al., 2015). Estudo semelhante realizado em 2016 por Sima et al (2016) detectaram que as proteínas salivares recombinantes de *Phlebotomus orientalis* podem ser usadas como antígenos em testes sorológicos para mediar a exposição à picadas de flebotomos em áreas endêmicas (SIMA et al., 2016).

Estudos realizados com frangos (*Gallus gallus*) demonstraram que esses animais são capazes de produzir anticorpos contra as proteínas das glândulas salivares e esses anticorpos podem ser usados em inquéritos sorológicos (SCHWARZ et al., 2009a, 2009b; SILVA et al., 2019; SOARES et al., 2013; TREVEJO; REEVES, 2005). O uso de ovos de galinhas para obtenção de anticorpos imunoglobulina Y (IgY) policlonais contra as proteínas presentes na glândula salivar de vetores traz como vantagem ser menos dispendioso e econômico pois de acordo com o protocolo de Pauly et al (2011) a galinha é capaz de produzir anticorpos altamente específicos com títulos estáveis até 1: 1.000.000 (PAULY et al., 2011).

Portanto, a produção de anticorpos contra as proteínas salivares dos flebotomíneos e anofelinos nos estudos epidemiológicos pode ser utilizado como ferramenta nesses inquéritos de saúde pública para planejamento de estratégias para monitorar os vetores de *Leishmania* nas áreas endêmicas.

A obtenção de altos níveis de anticorpos IgY específicos para as proteínas salivares de flebotomíneos e anofelinos possibilita a utilização de galinhas como marcadores de exposição às picadas desses vetores. Portanto, os objetivos desse trabalho foram revisar estudos sobre o uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição aos vetores de leishmaniose e malária, avaliar a resposta humoral de sangue e ovos de galinhas expostas experimentalmente às picadas de *Migonyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* e *Anopheles aquasalis*, e determinar a produção de anticorpos em ovos de galinhas expostas naturalmente a flebotomíneos e anofelinos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: A tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, n. 4, p. 665–693, 2005.
- ANDRADE, B. B. et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 121, 2009.
- BRASIL. **Manual for Surveillance of cutaneous leishmaniasis**. 1^a ed. Brasília, 2017a.
- BRUMMER-KORVENKONTIO, H. et al. Clinical aspects of allergic disease detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 93, n. 3, 1994.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17 (3), p. 279-289, 1999.
- MARZOUKI, S. et al. Validation of recombinant salivary protein PpSP32 as a suitable marker of human exposure to *Phlebotomus papatasi*, the vector of *Leishmania major* in Tunisia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2015.
- NASCIMENTO, R. J. et al. Human IGG1 and IGG4: The main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65 (3), p. 219-226, 2001.
- ORLANDI-PRADINES, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1454–1462, 2007.
- PALOSUO, K. et al. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 367-372, 1997.
- PAULY, D. et al. IgY Technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, v. 51, p. 2–7, 2011.
- REMOUE, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v 100, p 363-370, 2006.
- RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual review of entomology**, v. 48, p. 73–88, 2003.
- SCHWARTZ, B. S.; RIBEIRO, J. M. C.; GOLDSTEIN, M. D. Anti-tick antibodies: An epidemiologic tool in lyme disease research. **American Journal of Epidemiology**, v. 132, n. 1, p. 58–66, 1990.
- SCHWARZ, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 1021–1029, 2009a.
- SCHWARZ, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: Development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. **PLoS Neglected**

Tropical Diseases, v. 3, n. 10, p. e532, 2009b.

SCHWARZ, A. et al. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against chagas disease transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 41 (6), p. 591-594, 2011.

SILVA, R. DE O. E et al. Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmaniasis vector presence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. e20180415, p. 1–5, 2019.

SIMA, M. et al. Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004553, 2016.

SOARES, B. R. et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

SOUZA, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e649, 2010.

TREVEJO, R. T.; REEVES, W. C. Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 481–487, 2005.

VOLF, P.; GRUBHOFFER, L.; HOŠEK, P. Characterization of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. **Veterinary Parasitology**, v. 47, n. 3–4, p. 327–337, 1993.

WHO/PAHO. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**; 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

WHO. World malaria report 2017. Geneva: **World Health Organization**; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2018. Geneva: **World Health Organization**; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

CAPÍTULO 1

Uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição a vetores de Leishmaniose e Malária: uma revisão sistemática.

Rarissa de Oliveira e Silva¹, Luis André Moraes Mariúba^{1,2} e Felipe Arley Costa Pessoa²

1-Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada- Universidade Federal do Amazonas, 2- Fundação Oswaldo Cruz- Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane.

RESUMO

As fêmeas de artrópodes vetores de doenças infecciosas são hematófagas e realizam o repasto sanguíneo em vários vertebrados em áreas endêmicas. Durante a alimentação depositam na pele proteínas, presentes em suas glândulas salivares, com ações vasodilatadoras e imunomoduladoras para aumentar e facilitar a ingestão sanguínea. Hospedeiros expostos às proteínas desenvolvem respostas celulares e humorais com a produção de anticorpos específicos. Neste artigo se fez uma revisão sistemática sobre o uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição a flebotomíneos e anofelinos vetores de leishmaniose e malária, respectivamente. Reuniram-se trabalhos realizados com proteínas salivares que demonstraram a possibilidade de utiliza-las como biomarcadores de exposição de hospedeiros aos vetores de doenças infecciosas. Os hospedeiros viáveis nesses estudos foram humanos, camundongos e animais domésticos, pois esses são capazes de produzir anticorpos específicos contra as proteínas salivares de vetores flebotomíneos e anofelinos. Nos trabalhos foram propostos também a utilização de animais em áreas endêmicas como sentinelas para a exposição às proteínas de vetores de doenças como ferramenta de vigilância epidemiológica.

Palavras-chaves: flebotomíneos, anofelinos e biomarcadores salivares.

ABSTRACT

Female arthropod vectors of infectious diseases are hematophagous and perform blood feeding in several vertebrates in endemic areas. During feeding they deposit proteins present in their salivary glands with vasodilator and immunomodulatory actions to increase and facilitate blood intake. Protein-exposed hosts develop cellular and humoral responses to the production of specific antibodies. In this article we made a systematic review on the use of salivary proteins as biomarkers of exposure to sand flies and anophelines of leishmaniasis and malaria, respectively. Work was done with salivary proteins that demonstrated the possibility of using them as biomarkers of host exposure to vectors of infectious diseases. The viable hosts in these studies were humans, mice and domestic animals, as they are capable of producing specific antibodies against the salivary proteins of sandflies and anopheline vectors. Authors also proposed the use of animals in endemic areas as sentinels for exposure to disease vector proteins as an epidemiological surveillance tool.

Key-words: sandflies, anophelines and salivary biomarkers

.

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas transmitidas por vetores são responsáveis por mais de 700 mil mortes anuais em todo mundo. Pesquisas estimam que 17% de todas as doenças infecciosas são transmitidas por vetores e mais de 80% de toda população mundial está em área de risco (WHO, 2017). Esses dados podem ser explicados pela rápida e não planejada urbanização, aumento das viagens globais, mudanças climáticas e mudanças ambientais (PARHAM et al., 2015; WHO, 2018). Vetores invertebrados podem transmitir vírus, bactérias, protozoários e helmintos que causam diversas doenças incluindo malária, dengue, doenças de chagas e leishmanioses (WHO, 2018).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas pelo protozoário *Leishmania* spp e transmitidas, normalmente, pela picada das fêmeas do flebotomíneo quando estas realizam a hematofagia necessária para a nutrição e maturação dos folículos ovarianos (BRASIL, 2017a). As leishmanioses possuem diversidades de espectros clínicos e epidemiológicos, podendo apresentar a forma cutânea ou mucocutânea denominada Leishmaniose Tegumentar (LT) ou ainda acometer as vísceras, chamada de Leishmaniose Visceral (LV) (BRASIL, 2017a).

A doença afeta principalmente a África, Ásia e América Latina em associação à desnutrição, falta de saneamento básico, sistema imunológico baixo e falta de recursos. A LT tem ampla distribuição mundial e no Brasil, chamada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). (BRASIL, 2017a). O Estado do Amazonas é o segundo maior estado da região norte endêmico para LTA, de acordo com dados do Ministério da Saúde, ficando atrás apenas do Estado do Pará. Em 2017 foram notificados 1.929 casos de LTA no Estado do Amazonas e 3.259 no Estado do Pará (SINAN/SVS/MS, 2019).

A malária é outra doença infecciosa causada por protozoários, o gênero *Plasmodium* é o causador da enfermidade e transmitido, geralmente, por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. A transmissão ocorre durante a alimentação sanguínea dos anofelinos devido a presença de esporozoítos nas glândulas salivares das fêmeas dos mosquitos infectados. Os sintomas da malária envolvem febre, calafrio e dor de cabeça, chamados de clássica tríade sintomática. O diagnóstico confirmatório tradicional ocorre através de exame microscópico do sangue (BRASIL, 2011, 2010)

Os dados globais da malária indicam que em 2017 foram estimados 219 milhões de casos de malária no mundo e desses 435 mil resultaram em mortes. A Organização Mundial da Saúde informou que em 2018 o Paraguai foi certificado como um país livre da doença, apesar dos esforços para a eliminação mundial da malária alguns desafios são encontrados devido o

contínuo surgimento da resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos e a resistência do mosquito aos inseticidas representando uma ameaça ao progresso.(WHO, 2018). A vigilância entomológica da malária baseia-se em conhecer as espécies vetoras presentes na região endêmica e sua suscetibilidade aos inseticidas, gerando coletas periódicas de tais dados para rastreio de impacto na transmissão da doença (WHO PRESS, 2018)

As limitações do tratamento profilático nas leishmanioses e na malária requerem o uso de métodos de controle de vetores para interromper a transmissão, envolvendo extensa vigilância dessas populações de insetos para estimar o risco de transmissão dos protozoários, estratégias de controle de vetores e avaliar seu impacto nas doenças. De acordo com o reporte epidemiológico das leishmanioses pela Organização Pan- Americana de Saúde o modelo atual de vigilância é baseado em estratificação de risco de transmissão, porém esse indicador mostrou limitações, sendo necessário a inserção de outros indicadores como presença de vetores na área endêmica (WHO/PAHO, 2017, 2019).

Devido às restrições na metodologia atual de vigilância faz-se necessárias ferramentas para o controle de vetores para prever o risco de transmissão de malária e leishmaniose. Uma abordagem é avaliar as proteínas presentes nas glândulas salivares dos artrópodes vetores das doenças infecciosas. De fato, durante a alimentação sanguínea, as fêmeas injetam o conteúdo das glândulas salivares no sangue do hospedeiro para facilitar a disponibilidade sanguínea (RIBEIRO, 1987).

As proteínas da saliva possuem diversas propriedades, dentre elas as anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e vasodilatadoras levando a modulação da resposta do hospedeiro (RIBEIRO, 1987). Outra resposta observada é a produção de anticorpos. Em 1990 Schwartz et al demonstraram altos níveis de anticorpos produzidos contra a proteínas das glândulas salivares de carrapatos em voluntários com doença de Lyme e observaram que os anticorpos poderiam ser usados como marcadores de exposição ao carrapato (SCHWARTZ; RIBEIRO; GOLDSTEIN, 1990). Portanto, o objetivo dessa revisão é abordar os diferentes hospedeiros expostos aos vetores usados em estudos de caracterização de proteínas salivares como biomarcadores de exposição a vetores de malária e leishmaniose.

2. METODOLOGIA

Essa revisão foi realizada por meio de busca de publicação de pesquisa sobre uso de biomarcadores salivares como ferramentas de exposição a vetores de leishmaniose e malária em áreas endêmicas em banco de dado eletrônicos como Periódico Capes, PubMed, Scopus e MedLine. As palavras chaves foram: phlebotomine, sand flies, anophelines, saliva proteins, biomarker e antibodies.

Foram encontrados 45 artigos no tema biomarcador de exposição a proteínas salivares e 5 foram excluídos por não apresentarem a detecção por meio de anticorpos, mas por métodos moleculares e 4 por serem artigos de revisão de sialotranscriptoma.

3. RESPOSTA IMUNE ÀS PROTEÍNAS SALIVARES DE FLEBOTOMÍNEOS E ANOFELINOS

3.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são pequenos insetos que pertencem à ordem Diptera, à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, onde as fêmeas possuem hábito hematófago. Medem de 2 a 4 mm e sua cor varia de quase branco a quase preto (KILLICK-KENDRICK, 1999). Os ambientes em que se costuma encontrar esses insetos são áreas florestais ou locais próximos úmidos e escuros com temperaturas moderadas, ambiente domiciliar e peridomiciliar (BRASIL, 2017a).

Esses insetos possuem aparelho bucal do tipo picador sugador e utilizam carboidrato como fonte de energia. Fêmeas e machos se alimentam de fontes naturais de açúcar como seivas de plantas e açúcares de pulgões (CAMERON et al., 1995). As fêmeas também se alimentam de sangue que fornece nutrição para a produção dos ovos. Quando a fêmea realiza o repasto, é injetado o conteúdo salivar que desempenha um papel no estabelecimento do parasita no local da infecção (KILLICK-KENDRICK, 1999; PRATES et al., 2011; RIBEIRO, 1987).

Mbow et al (1998) determinaram que camundongos expostos à lisados das glândulas salivares de *Phlebotomus papatasi* apresentavam o perfil celular composto por células T helper do tipo 1 (células Th1) com produção diminuída de citocinas INF- γ , interleucina 12 (IL-12) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e células Th2 com aumento de produção de interleucina 4 (IL-4) favorecendo a continuação da infecção pela *Leishmania*.

Prates et al (2011) observaram que neutrófilos peritoniais inflamatórios murinos quando cultivados com extrato de glândula salivar aumentavam a expressão da proteína transmembrana do tipo II (FasLigand). A proteína FasL ao se ligar ao seu receptor Fas induz a apoptose, portanto, os autores determinaram que a presença das proteínas salivares aumentavam a indução da apoptose dos neutrófilos facilitando o estabelecimento da infecção por *Leishmania*.

A resposta ao macrófago é observada através das ações quimiotáticas de recrutamento dessas células facilitando a infecção quando os flebotomíneos contêm o parasita. Durante a resposta imune os macrófagos não produzem óxido nítrico devido a sua inativação via interferon gama (INF- γ) contribuindo para sobrevivência dos parasitas (LESTINOVA et al., 2017).

A principal proteína encontrada na saliva de *Lutzomyia longipalpis* vetora de LV, é o maxadilan um vasodilatador que promove o aumento do fluxo sanguíneo facilitando a alimentação (BRODIE et al., 2007; LERNER et al., 1991). O maxadilan inibe a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos, inibe a interleucina 12p40 (IL-12p40) e INF- γ e aumenta os níveis de citocinas como IL-6 e IL-10, o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) bem como prostaglandina E. As proteínas salivares são processadas para serem apresentadas aos linfócitos T pelas células de Langerhans localizadas na epiderme, assim como, as células apresentadoras de antígenos transportam os imunógenos para os linfonodos para induzir resposta humoral (anticorpos) e celular (MBOW et al., 1998). É observado que os componentes salivares induzem aumento rápido de células que produzem citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-6 e IL-10 e diminui a atividade de células Th1 reduzindo então a resposta inflamatória para conter a infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 1998; MBOW et al., 1998).

Esses dados sugerem que substâncias presentes nas glândulas salivares são capazes de modular o sistema imune permitindo a sobrevivência dos parasitas nos macrófagos. Essa mudança de perfil e secreção de citocinas acontece, pois as citocinas do tipo 1 aumentam o óxido nítrico nos macrófagos que levaria a morte dos agentes patogênicos intracelulares, enquanto que aumento da resposta do tipo 2 leva a produção de anticorpos que é inadequada aos patógenos intracelulares como a *Leishmania* (BELKAID et al., 1998; BRODIE et al., 2007; MBOW et al., 1998).

Belkaid et al, em 1998 observaram camundongos pré-expostos a sonicação da glândula salivar de flebotomíneos e esses foram protegidos da infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 1998). Diante desses resultados surgiram estudos para averiguar se a resposta imune elevada à saliva poderia conferir proteção à leishmaniose (KAMHAWI, 2000). Gomes et al (2012) analisaram camundongos após imunizações com e sem a saliva de vetores e determinaram que a proteína LJM11 modula a resposta do hospedeiro conferindo proteção contra a infecção por *Leishmania* e que vacinas deveriam conter componentes salivares dos vetores (GOMES et al.,

2012). A razão para que a proteção aconteça após exposição aos componentes das glândulas salivares é devido a capacidade dessas proteínas induzirem uma resposta específica tanto humoral quanto celular, desse modo, a imunidade protetora é sustentada para ser mediada por anticorpos neutralizantes ou reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) no local da picada com produção de INF- γ e IL-12 (LESTINOVA et al., 2015, 2017).

3.2 Anofelinos

Os *Anopheles* compreendem insetos pertencentes a família Culicidae, podem medir entre 6 a 15 mm. A postura dos ovos é realizada em locais com água pouco agitada. O mosquito apresenta cor escura com manchas brancas, asas longas, com escamas formando áreas com manchas claras e escuras. Os insetos adultos se alimentam de água e seivas vegetais, porém, as fêmeas realizam a hematofagia para nutrição proteica. Os anofelinos possuem comportamento crepuscular (TADEI et al., 1988).

A saliva dos anofelinos contém uma complexa mistura diversificada de substâncias anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Existem duas subfamílias de proteínas que se ligam a odorantes, proteínas D7 longas e curtas. Calvo et al (2006) expressaram essas proteínas por microcalorimetria isométrica e observaram que as proteínas D7 não-ligante é pouco expressa nas glândulas salivares. Verificaram também que o hospedeiro responde com aminas biogênicas para neutralizar a hematofagia.

Miller et al (2012) estudaram a modulação da resposta do hospedeiro durante a infecção por *Plasmodium yoelli*. O fator responsável pela migração de macrófagos de mamíferos é uma citocina envolvidas em funções extracelulares e intracelulares, o parasita da malária expressa um homólogo a essa citocina capaz de modular a resposta imune do hospedeiro contra os parasitas. Esses autores determinaram que a expressão do homólogo foi forte durante o desenvolvimento do estágio hepático. Dessa forma indicaram que a citocina do *Plasmodium* é importante para o desenvolvimento hepático do parasita, provavelmente desempenha um papel intrínseco no desenvolvimento do protozoário.

A invasão das glândulas salivares do mosquito pelos esporozoítos do *Plasmodium falciparum* é um passo essencial no ciclo de vida da malária, porém, como a infecção altera a hematofagia ainda não está claro. Waisberg et al (2014) analisaram as glândulas salivares de *Anopheles gambiae* e encontraram 43 genes diferencialmente expressos nas glândulas de mosquitos infectados com *P. falciparum*. Determinaram que as proteínas expressadas inibem

a quimiotaxia de neutrófilos, reduzem o edema e bloqueiam a agregação plaquetária (WAISBERG et al., 2014).

Em estudo de inibição da via alternativa do sistema complemento, Mendes-Sousa et al (2019) demonstraram que o inibidor presente nos extratos das glândulas salivares atua no processo inicial de bloqueio da via alternativa de c3b na superfície de ativação. Identificaram que a proteína properdina, que é uma molécula reguladora positiva do VA, liga-se ao extratos de glândula salivar. Através da análise de SDS-PAGE, *A. aquasalis* apresentou uma proteína salivar com o mesmo peso molecular que os inibidores do recombinantes do complemento pertencentes à família SG7 descrita na saliva de outras espécies de anofelinos. Os autores sugerem que o inibidor do complemento da saliva de *A. aquasalis* é uma proteína SG7 que pode inibir a via alternativa, ligando-se à C3-convertase, similar à albicina, e/ou complexando-se com a properdina para anular sua atividade estabilizadora. Uma proteína recombinante da saliva de *A. aquasalis* permitiria investigar o mecanismo de inibição da via alternativa em mais detalhes.

4. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AOS VETORES

Proteínas salivares são imunogênicas e estimulam a produção de anticorpos específicos e são utilizadas em estudos sorológicos epidemiológicos como marcadores biológicos de exposição a vetores artrópodes (GOMES et al., 2012; SOARES et al., 2013).

Vetor	Hospedeiro	Proteína	Anticorpo	Referência
Flebotomíneo	Humano	Extrato total	IgG e IgE	Barral et al, 2000 e Vinhas et al 2007
Flebotomíneo	Humano	LMJ11 e LMJ17	IgG	Teixeira et al ,2010 e Souza et al, 2010.
Flebotomíneo	Humano	PpSP32	IgG e IgE	Marzouki et al, 2015 e Mondragon-Shem et al, 2015 .
Flebotomíneo	Humano	LinB-13	IgG4	Carvalho et al, 2017.
Flebotomíneo	Camundongo	rSP01B e rSP04	IgG	Rohousova et al, 2005 e Martin-Matin et al, 2015
Flebotomíneo	Animais sentinelas	38,33 e 29 kDa	IgG	Vlkova et al, 2011; Drahota et al, 2014, Martin-Martin et al, 2014; Kostalova et al, 2015,2017 Sima et al, 2016;. Pereira et al, 2019
Flebotomíneo	Galinhas	LMJ11 e LMJ17	IgY	Soares et al, 2013..
Flebotomíneo e Anofelino	Galinhas	Extrato total	IgY	Silva et al, 2019
Anofelino	Humano	Extrato total	IgG e IgM	Remoue et al, 2006 e Orlandi-Pradines et al, 2007
Anofelino	Humano	gSG6-P1	IgG	Poinsignon et al, 2008, 2009, 2010; Rizzo et al, 2011; Drame et al, 2012, 2013, 2015; Ali et al, 2012; Sagna et al, 2013; Londono et al, 2015; Ya-Umphang et al, 2017; Traoré et al, 2018, 2019; Sadia-Kacou et al, 2019
Anofelino	Humano	gSG6, gsG1b, TRIO,SG5 e D7	IgG	Marie et al, 2014
Anofelino	Humano	46, 41, 33 e 31 kDa	IgG	Armiyanti et al, 2015.

Tabela 1. Biomarcadores de exposição a flebotomíneos e anofelinos.

4. Anticorpos de humanos

Após exposição às picadas de vetores são produzidos pelos hospedeiros anticorpos específicos, com isso, diversos estudos analisaram a hipótese de usar os anticorpos anti-saliva como marcadores de exposição em humanos.

4.1.1 Flebotomíneos

Em estudos sorológicos determinou-se que um anticorpo imunoglobulina G (IgG) específico para as proteínas salivares era produzido e poderia ser usado como marcador para análise de exposição ao vetor (BARRAL et al., 2000; VINHAS et al., 2007).

Em 2010, foram descobertas proteínas específicas de flebotomíneos LMJ17 e LMJ11 da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e determinadas como marcadores de exposição humano ao vetor (TEIXEIRA et al., 2010). Souza et al (2010) utilizaram proteínas recombinantes da saliva de flebotomíneos como antígenos para a produção de anticorpos específicos. Como resultados identificaram duas proteínas recombinantes, LMJ17 e LMJ11 da saliva de *Lu. longipalpis* como antígenos viáveis de induzir a produção de imunoglobulinas específicas, portanto, capazes de serem utilizadas em estudos de exposição ao vetor (SOUZA et al., 2010).

Marzouki et al (2015), Mondragon-Shem et al (2015) e Carvalho et al (2017) também em estudos com humanos observaram a produção de anticorpos contra proteínas recombinantes da saliva de vetores e detectaram que as proteínas salivares poderiam ser usadas como biomarcadores de exposição ao vetor de *Leishmania*. (CARVALHO et al., 2017; MARZOUKI et al., 2015; MONDRAGON-SHEM et al., 2015). Marzouki et al (2015) identificaram a proteína recombinante salivar PpSP32 (rPpSP32) como marcador de exposição humana ao *Phlebotomus papatasi* vetor de *Leishmania major*. Anticorpos específicos IgG2, IgG4 e imunoglobulina E (IgE) foram produzidos, corroborando o uso de proteínas como biomarcadores de exposição (MARZOUKI et al., 2015).

4.1.2. Anofelinos

Em 2006 estudos sorológicos identificaram a imunoglobulina IgG em soro de indivíduos expostos a anofelinos e indicaram que as proteínas presentes nas glândulas salivares desses mosquitos poderiam ser consideradas um potencial indicador de transmissão de malária (REMOUE et al., 2006).

Orlandi-Pradines et al (2007) realizaram um estudo com 88 soldados franceses antes e após uma viagem à África. Foram coletados soros para análise humoral e obtiveram a produção de imunoglobulina M (IgM) e IgG contra a saliva de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*.

Tiveram como resultados aumentos de 41% para *A. gambiae* e 15% para *A. aegypti* o que sugere que anticorpos podem ser usados em inquéritos sorológicos de avaliação de grau de exposição de viajantes a mosquitos vetores de doenças transmitidas por artrópodes (ORLANDI-PRADINES et al., 2007).

Em 2008 especificamente para a exposição humana a *Anopheles* um marcador foi validado, o peptídeo 1 da Proteína da Glândula 6 (gSG6-P1) de *Anopheles gambiae* (POINSIGNON et al., 2008, 2010). A resposta específica da IgG ao peptídeo gSG6-P1 foi relacionada a baixa exposição de picadas de anofelinos em ambientes urbanos da cidade de Dakar, Senegal, pois antes a avaliação da baixa exposição humana aos vetores possuía pouca sensibilidade (DROME et al., 2012, 2013).

Marie et al (2014) identificaram novos antígenos candidatos para a picada de *Anopheles gambiae* através de espectrometria de massa. Através de análise de indivíduos expostos a picadas de anofelinos determinaram as proteínas gSG1b, TRIO, SG5 e a forma longa D7 foram identificadas como novos biomarcadores de exposição (MARIE et al., 2014).

Armiyanti et al (2015) analisaram soros de moradores de áreas endêmicas de malária onde são expostos naturalmente a espécie de *Anopheles sundaicus* e observaram a produção de anticorpos para as proteínas salivares de 46, 41, 33 e 31 kDa. Os indivíduos de áreas não endêmicas de malária não produziram anticorpos contra as glândulas salivares do vetor. Portanto, os resultados corroboram o uso de proteínas salivares de *Anopheles* como marcadores de exposição à picada (ARMIYANTI et al., 2015).

A variação da densidade sazonal da malária também foi analisada em estudos utilizando a imunogenicidade da proteína gSG6. Rizzo et al (2011) detectaram altos níveis de anticorpos IgG anti gSG6 em indivíduos expostos durante transmissão da malária (estação chuvosa) e os níveis caíram ao analisarem os indivíduos na estação seca (RIZZO et al., 2011). A resposta humoral anti gSG6 IgG parece ser um indicador sorológico confiável de exposição humana aos vetores de malária (ALI et al., 2012; DROME et al., 2015; LONDONO-RENTERIA et al., 2015; POINSIGNON et al., 2009; SADIA-KACOU et al., 2019; SAGNA et al., 2013; TRAORÉ et al., 2018, 2019; YA-UMPHAN et al., 2017).

4.2 Anticorpos de cobaias, camundongos e coelhos

Rohousova et al (2005) expuseram camundongos a picadas de flebotomíneos e analisaram soro humano de moradores de áreas endêmicas de leishmaniose. Identificaram uma

proteína de 41 kDa da saliva de *Phlebotomus papatasi* como possível marcador. Os camundongos produziram anticorpos específicos para essas proteínas, dessa forma, os autores sugeriram que a resposta de anticorpos à saliva pode ser usada para monitorar a exposição de humanos e outros hospedeiros aos flebotomíneos (ROHOUSOVA et al., 2005).

Martin-Martin et al (2015) ao analisarem a resposta humoral de camundongos (*Mus musculus*) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), identificaram que o nível de anticorpos anti-saliva de *Ph. perniciosus* se correlacionava com o número de picadas, ou seja, aumentavam de acordo com as imunizações. Com esse resultado sugeriram que esses anticorpos poderiam ser usados como marcadores de exposição às picadas de flebotomíneos (MARTÍN-MARTÍN; MOLINA; JIMÉNEZ, 2015).

4.3 Anticorpos em animais sentinelas

Definição: animais sentinelas são usados para monitorar surtos e epidemias causadas por agentes infecciosos. As leishmanioses e a malária por serem doenças infecciosas endêmicas necessitam de monitoramento e controle. A vigilância epidemiológica é uma das chaves para a detecção precoce de mudança no estado de saúde de animais sentinelas. O monitoramento de animais concentra-se em verificar a mudança na prevalência da doença e o propósito é aumentar a eficiência do sistema de vigilância (MCCLUSKEY, 2003).

4.3.1 Anticorpos de cachorros, gatos, cabras e lebres

Cães podem ser usados como animais sentinelas em áreas endêmicas de LV. Autores analisaram soro de cachorros após exposição a picadas ou a antígenos recombinantes salivares de *Ph. perniciosus* e detectaram a produção de anticorpos específicos para as proteínas salivares desse vetor. Esses resultados sugerem que a frequência de contato entre o vetor e os cachorros pode ser medida pelos níveis de anticorpos do hospedeiro contra as proteínas salivares dos flebotomíneos. Os anticorpos podem ser usados em estudos sorológicos em grande escala e um novo método para análise de exposição dos cachorros a picadas de flebotomíneos em áreas endêmicas de leishmaniose visceral (DRAHOTA et al., 2014; KOSTALOVA et al., 2015, 2017; VLKOVA et al., 2011).

Segundo Drahota et al (2014), cães podem ser usados para avaliação de exposição à saliva de *Phlebotomus perniciosus* para estimar o risco de transmissão de *Leishmania infantum*. Foram utilizadas proteínas recombinantes de *P. perniciosus*, proteína rSP03B, apirase rSP01B e rSP01 e obteve-se resultado positivo para produção de anticorpos contra essas proteínas. Determinou-se então que essas proteínas eram melhores candidatas para avaliar a exposição de camundongos e cães a mordidas de *P. perniciosus*.

Martin-Martin et al (2014) analisaram soro de lebres, cachorros e coelhos expostos à picadas de *P. perniciosus* e observaram que esses animais apresentavam altos níveis de anticorpos específicos contra o flebotomíneo exposto. Os autores determinaram que a proteína recombinante rSP poderia ser usada como marcador de exposição ao inseto.

Soros de porcos, ovelhas e cabras também foram analisados quanto à soroconversão após exposição de glândulas salivares e flebotomíneos. A resposta humoral detectada nos soros apresentou altos níveis de anticorpos anti-saliva desses vetores corroborando que anticorpos de animais sentinelas podem ser usados como biomarcadores de exposição a vetores artrópodes em áreas endêmicas de doenças infecciosas. Os antígenos salivares também podem ser usados como marcadores epidemiológicos para ferramenta de vigilância (SIMA et al., 2016).

Pereira et al (2019) em estudo inédito com gatos expostos naturalmente a flebotomíneos observaram altos níveis de anticorpos IgG contra a saliva de *Ph. perniciosus*. Os autores determinaram que esses animais por sustentarem a disseminação da infecção por *Leishmania* zoonótica torna-se primordial medidas profiláticas direcionadas aos gatos. E o uso em estudos como animais expostos a vetores faz-se necessário (PEREIRA et al., 2019).

4.4 Anticorpos de galinhas

As galinhas são frequentemente encontradas em ambientes peridomiciliares em áreas endêmicas para leishmaniose e malária, portanto, são prováveis animais sentinelas. Esses animais apesar de servirem para alimentação sanguínea das fêmeas não são capazes de se infectar com *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, desse modo são ideais para uso em inquéritos sorológicos de marcadores de exposição aos vetores. As galinhas, assim como outras aves, não se infectam com *Leishmania* devido a sua temperatura corporal ser 41°C (NASIRI; DALIMI; GHAFARIFAR, 2013), e devido a resposta do sistema complemento dessas aves (MENDES-SOUSA et al., 2013).

O sistema imune de frango é semelhante ao dos mamíferos possuindo um sistema inato, não específico e sistema específico adquirido. O sistema específico é dividido em uma imunidade celular, com células que reagem com uma alta especificidade ao seu antígeno

específico, e não celular também chamada de humoral incluindo proteínas plasmáticas como os anticorpos (SHARMA, 1997).

Existem três classes principais de anticorpos em aves, isto é, IgM, IgY (análoga a IgG de mamífero) e IgA. A diversidade de anticorpos é conseguida por conversão genética. O anticorpo IgY é usado em vacinas e em testes de exposição à picadas de vetores devido a facilidade de coleta e a grande quantidade de anticorpos que pode ser encontrada na gema do ovo e no sangue após as primeiras imunizações (SHARMA, 1997).

Soares et al (2013) analisaram se galinhas de áreas endêmicas para LV eram capazes de produzirem anticorpos contra sonicado de glândula salivar de *Lu. longipalpis*. Todos os frangos expostos naturalmente às picadas de flebotômíneos desenvolveram anticorpos anti-SGS IgY, foram identificadas as proteínas recombinantes rLJM17 e rLJM11 como marcadores promissores. Esses resultados mostram que as galinhas podem ser usadas como animais sentinelas para monitorar a presença de flebotômíneos na área peridomicilar em regiões endêmicas de Leishmaniose Visceral (SOARES et al., 2013).

A utilização de galinhas favorece a produção de anticorpos policlonais IgY altamente específicos nos ovos tornando um método não invasivo e econômico (GUIMARAES, 2008). Pauly et al (2011) padronizaram a extração de IgY da gema do ovo por método de precipitação de polietileno glicol (PEG), esse método é econômico e resulta em anticorpos altamente específicos com títulos estáveis até 1:000.000.

Silva et al (2019) em estudo inédito com ovos de galinhas, expuseram galinhas a picadas de flebotômíneos e anofelinos a cada 15 dias por 60 dias e utilizaram gemas dos ovos para analisar a produção de anticorpos IgY contra as proteínas salivares de *Anopheles aquasalis*, *Lutzomyia longipalpis* e *Migonemia migonei*, vetores de malária e leishmaniose respectivamente. Após os primeiros 15 dias foram possíveis observar altos níveis de anticorpos em todos os ovos, sugerindo que ovos podem ser usados para a análise de resposta antígeno-anticorpo. As respostas de anticorpos foram específicas para as espécies de insetos determinando que a reatividade cruzada era baixa. Com esses resultados sugeriram que os ovos de galinhas poderiam ser utilizados para monitorar a presença de vetores em áreas endêmicas (SILVA et al., 2019)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa revisão enfatiza o uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição a flebotomíneos e anofelinos, baseada em uma resposta anticorpo-proteína salivar, por ser uma ferramenta de vigilância epidemiológica útil para controle de vetores. Foram encontrados estudos com humanos, camundongos, gatos, cachorros, coelhos e galinhas para flebotomíneos, mostrando a diversidade de hospedeiros disponíveis para esses vetores. Os estudos com anofelinos encontrados focaram no hospedeiro humano, necessitando de mais trabalhos utilizando animais domésticos como animais sentinelas para malária. Faz-se necessário trabalhos demonstrando anticorpos contra antígenos de *Plasmodium* e *Leishmania* como marcadores de exposição ao protozoário para análise de risco de transmissão de de malária e leishmaniose. Galinhas por sua proximidade de casas e por não se afastarem muito como observados em outros animais, como por exemplo, o cachorro, podem ser promissores animais sentinelas em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana e Malária.

REFERÊNCIAS

- ALI, Z. M. I. et al. Assessment of *Anopheles* salivary antigens as individual exposure biomarkers to species-specific malaria vector bites. **Malaria Journal**, v. 11, p. 1–14, 2012.
- ARMİYANTI, Y. et al. Detection of immunogenic proteins from *Anopheles sundaicus* salivary glands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 410–416, 2015.
- BARRAL, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 740–745, 2000.
- BELKAID, Y. et al. 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. **The Journal of Experimental Medicine @BULLET**, v. 188, n. 10, p. 1941–1953, 1998.
- BRASIL. **Guia prático de tratamento de malária no Brasil**. Brasília, 1ª ed, p. 36, 2010.
- BRASIL. **Manual de diagnostico laboratorial da malaria**. Brasília, 1ª ed, p. 112, 2011.
- BRASIL. **Manual for surveillance of cutaneous leishmaniasis**. Brasília, 1ªed, p.189, 2017a.
- BRODIE, T. M. et al. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2359–2365, 2007.
- CALVO, E. et al. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1935–1942, 2006.
- CAMERON, M. M. et al. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceara State, Brazil. **Medical and veterinary entomology**, v. 9, n. 3, p. 263–272, jul. 1995.
- CARVALHO, A. M. et al. Seroconversion to *Lutzomyia intermedia* LinB-13 as a biomarker for developing cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, 2017.
- DRAHOTA, J. et al. Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 45, 2014.
- DRAME, P. M. et al. IgG responses to the gSG6-P1 salivary peptide for evaluating human exposure to *Anopheles* bites in urban areas of Dakar region, Sénégal. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 72, 2012.
- DRAME, P. M. et al. Evaluation of the effectiveness of malaria vector control measures in urban settings of Dakar by a specific *Anopheles* salivary biomarker. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–9, 2013.
- DRAME, P. M. et al. Specific antibodies to *Anopheles* gSG6-P1 salivary peptide to assess early childhood exposure to malaria vector bites. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2015.
- GOMES, R. et al. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted *Leishmania* conferring ulcer-free protection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 2735–2743, 2012.

- GUIMARAES, M. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas Online**, v. 2, n. 7, p. 122–129, 2008.
- KAMHAWI, S. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 292, p. 1351-1354, 2000.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17 (3), p. 279-289, 1999.
- KOSTALOVA, T. et al. Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus perniciosus*: A longitudinal study in an endemic focus of canine leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9 (6), p. e0003855, 2015.
- KOSTALOVA, T. et al. The recombinant protein rSP03B is a valid antigen for screening dog exposure to *Phlebotomus perniciosus* across foci of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 88-93, 2017.
- LERNER, E. A. et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 17, p. 11234–11236, 1991.
- LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, p. 9-18, 2017.
- LONDONO-RENTERIA, B. et al. *An. gambiae* gSG6-P1 evaluation as a proxy for human-vector contact in the Americas: A pilot study. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 533, p. 1–8, 2015.
- MARIE, A. et al. *Anopheles gambiae* salivary protein expression modulated by wild *Plasmodium falciparum* infection: Highlighting of new antigenic peptides as candidates of *An. gambiae* bites. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014.
- MARTÍN-MARTÍN, I. et al. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, 2014.
- MARTÍN-MARTÍN, I.; MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M. Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.
- MARZOUKI, S. et al. Validation of recombinant salivary protein PpSP32 as a suitable marker of human exposure to *Phlebotomus papatasi*, the vector of *Leishmania major* in Tunisia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2015.
- MBOW, M. L. et al. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 161, n. 10, p. 5571–7, 1998.
- MCCLUSKEY, B. J. **Use of Sentinel Herds in Monitoring and Surveillance systems**, Iowa, 1ªed, p. 227, 2003.
- MENDES-SOUSA, A. F. et al. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2013.

- MENDES-SOUSA, A. F. et al. Inhibition of the complement system by saliva of *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*. **HHS Public Access**, v. 92, p. 12–20, 2018.
- MILLER, J. L. et al. *Plasmodium yoelii* macrophage migration inhibitory factor is necessary for efficient liver-stage development. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1399–1407, 2012.
- MONDRAGON-SHEM, K. et al. Severity of old world cutaneous leishmaniasis is influenced by previous exposure to sandfly bites in Saudi Arabia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–14, 2015.
- NASIRI, V.; DALIMI, A.; GHAFARIFAR, F. Use of chicken (*Gallus gallus*) serum as a costly replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of *Leishmania infantum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 3, p. 169–173, 2013.
- ORLANDI-PRADINES, E. et al. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1454–1462, 2007.
- PARHAM, P. E. et al. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1665, p. 20130551–20130551, 2015.
- PAULY, D. et al. IgY Technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, v. i, n. 51, p. 2–7, 2011.
- PEREIRA, A. et al. Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.
- POINSIGNON, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 2008.
- POINSIGNON, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2009.
- POINSIGNON, A. et al. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 10, p. 1198–1203, 2010.
- PRATES, D. B. et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.
- REMOUE, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 363–370, 2006.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**, v. 32, n. 92, p. 463–78, 1987.
- RIZZO, C. et al. Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: A serological indicator of exposure to afrotropical malaria vectors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
- ROHOUSOVA, I. et al. Detection of species-specific antibody response of humans and mice

bitten by sand flies. **Parasitology**, v.130, p. 493-499, 2005.

SADIA-KACOU, C. A. M. et al. Use of *Anopheles* salivary biomarker to assess seasonal variation of human exposure to *Anopheles* bites in children living near rubber and oil palm cultivations in Côte d'Ivoire. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 5, p. e00102, 2019.

SAGNA, A. B. et al. GSG6-P1 salivary biomarker discriminates micro-geographical heterogeneity of human exposure to *Anopheles* bites in low and seasonal malaria areas. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, 2013.

SCHWARTZ, B. S.; RIBEIRO, J. M. C.; GOLDSTEIN, M. D. Anti-tick antibodies: An epidemiologic tool in lyme disease research. **American Journal of Epidemiology**, v. 132, n. 1, p. 58–66, 1990.

SHARMA, J. M. The structure and function of the avian immune system. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 3, p. 229–238, 1997.

SILVA, R. O. E et al. Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmaniasis vector presence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. e20180415, p. 1–5, 2019.

SIMA, M. et al. Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004553, 2016.

SINAN/SVS/MS. **Sistema de informações de agravos de notificação**. Acesso em 16 de junho de 2019. Disponível em: <www.saude.gov.br/sinanweb>.

SOARES, B. R. et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

SOUZA, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e649, 2010.

TADEI, W. P. et al. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 3, p. 221–251, 1988.

TEIXEIRA, C. et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 13–15, 2010.

TRAORÉ, D. F. et al. Evaluation of malaria urban risk using an immuno-epidemiological biomarker of human exposure to *Anopheles* bites. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1353–1359, 2018.

TRAORÉ, D. F. et al. Exploring the heterogeneity of human exposure to malaria vectors in an urban setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, using an immuno-epidemiological biomarker. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.

VINHAS, V. et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal of Immunology**,

2007.

VLKOVA, M. et al. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011.

WAISBERG, M. et al. *Plasmodium falciparum* infection induces expression of a mosquito salivary protein (agaphelin) that targets neutrophil function and inhibits thrombosis without impairing hemostasis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, 2014.

WHO/PAHO. **Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**, 2017.

WHO/PAHO. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

WHO. World Malaria Report 2017, Geneva, **World Health Organization**, 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

WHO. World malaria report 2018. Geneva, **World Health Organization**, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

WHO PRESS. **Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual**. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO].

YA-UMPHAN, P. et al. Use of an *Anopheles* salivary biomarker to assess malaria transmission risk along the Thailand-Myanmar border. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 3, p. 396–404, 2017.

Short Communication

Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmaniasis vector presence

Rarissa de Oliveira e Silva^[1], Maria Edilene Martins de Almeida^{[2],[3]}, Eric Fabrício Marialva^{[2],[4]},
Antônio Alcirley da Silva Balieiro^{[5],[6]}, Diogo Pereira de Castro^[3],
Cláudia Maria Rios-Velasquez^[7], Luis André Morais Mariúba^{[1],[3]*}
and Felipe Arley Costa Pessoa^{[7]*}

[1]. Universidade Federal do Amazonas, Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, AM, Brasil.

[2]. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (convênio- IOC-ILMD), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[3]. Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-AMAZÔNIA, Manaus, AM, Brasil.

[4]. Pós-graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro (PPGBIO), Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-AMAZÔNIA, Manaus, AM, Brasil.

[5]. Pós-graduação em Biologia Parasitária (convênio- IOC-ILMD), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[6]. Núcleo de Apoio à Pesquisa, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM, Brasil.

[7]. Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis da Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-AMAZÔNIA, Manaus, AM, Brasil.

Abstract

Introduction: Malaria and leishmaniasis are transmitted by vectors during blood-feeding. Vector-infected animals develop antibodies against the vector's saliva. This study evaluated IgY antibody detection in the chicken eggs exposed to bites from *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*. **Methods:** We used ELISA to quantify the antibody levels in the sera and exposed chicken eggs. **Results:** High IgY levels were observed following immunization; furthermore, higher reactivity was observed in the eggs and species-specific immune response was observed post final immunization. **Conclusions:** Chicken eggs can be used as sentinels to surveil vector saliva antibodies.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*. *Migonemyia migonei*. *Anopheles aquasalis*. Sentinel surveillance. Chicken. Salivary proteins.

Malaria and leishmaniasis are vector-borne diseases caused by protozoans. Adult Phlebotomine and Anopheline females are vectors of *Leishmania* and *Plasmodium*, respectively¹. These parasites are transmitted to vertebrate hosts during blood feeding². Furthermore, saliva proteins are introduced into the hosts, inducing immunogenic responses such as anti-homeostatic and vasodilatory effects on the skin^{2,3}.

Antibodies developed against the hematophagous arthropods saliva were used as exposure markers for different vector species. Several studies report that humans and other vertebrates can develop antibodies against salivary components of different hematophagous vectors, such as mosquitoes and sand flies

(e.g Andrade et al. 2009, Souza et al. 2010)^{4,5}. In endemic areas, several animals, including chickens (*Gallus gallus*), serve as blood meal sources for sandflies and anopheline mosquitoes. Since chickens suffer frequent exposure to insect bites, they serve as ideal subjects for serological analyses of antibodies developed against the hematophagous arthropod saliva^{6,7}. Egg yolks facilitate efficient and non-invasive sampling of antibodies. This study assessed the viability of using eggs as a tool to monitor exposure to leishmaniasis and malaria vectors by detecting IgY antibodies in the eggs of chickens exposed to bites from *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*. Although chickens are important epidemiological survey tools, no studies have examined the use of chickens in detecting antibodies against sand fly saliva in an area endemic to cutaneous leishmaniasis.

The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Amazonas (035/2013-CEUA/UFAM). We performed an experimental study using 12 chickens divided into four groups of three each. One group

*Contributed equally to this work: L. A. M. Mariúba and F. A. C. Pessoa.

Corresponding author: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa.

e-mail: felipe.pessoa@fioacruz.br

Orcid: 0000-0002-6318-1887

Received 2 October 2018

Accepted 11 March 2019

was exposed to bites from the sand fly species *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis in Brazil. A second group was exposed to bites from the phlebotomine species *Migonemyia migonei*, a vector of cutaneous leishmaniasis. Both sand fly species are permissive vectors for several *Leishmania* species⁸. A third group of chickens was exposed to bites from *Anopheles aquasalis*, a vector of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*⁹. A fourth group was not exposed to any vector bites and served as the negative control. All vector specimens were obtained from lab colonies maintained in insectaries at Oswaldo Cruz Foundation-Leônidas & Maria Deane Institute (FIOCRUZ/ILMD) facilities.

Chickens were administered four immunizations in total and immunized once every 15 days. Before immunization, blood sample from each chicken was collected to detect antibody production. During each immunization, chickens in the experimental groups were exposed to bites from 30 insects of a given species. One egg and 0.5 mL of blood was collected from every chicken after each vector repast, and a total of 48 eggs were collected for immunological testing. Antibodies were extracted from eggs and blood samples and analyzed using ELISA. Chicken egg antibodies were extracted using the precipitation method with Polyethylene Glycol¹⁰. The process entails removing lipids from the egg yolk and precipitating total IgY from the supernatant. The quality of the final preparation was analyzed by SDS-PAGE.

For the titration ELISA, dilutions of 1/100 to 1/12800 were used. 1 µL of the sample was placed in 200 µL of PBS / BSA block buffer; furthermore 1 µL of this solution was diluted with 100 µL of PBS / BSA and the procedure was repeated until a dilution of 1/12800 was achieved. In the cross-reactivity test, ELISA was performed using the salivary gland sonicate of *Migonemyia migonei* as an antigen to test the egg and blood samples of chickens exposed to bites from *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*, and to test negative control chicken samples. This procedure was repeated with samples exposed to the other hematophages.

In order to detect IgY antibodies using ELISA, antigen lysates were procured from 20 salivary glands taken from the three-day old female species of *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*. The purified IgYs were used as the positive control and samples collected before vector repast were used as the negative control. An indirect ELISA was performed: 0.1 mL/well salivary gland extract from *M. migonei*, *L. longipalpis* and *A. aquasalis* (equivalent to 1 pair of salivary glands/mL) was used to coat ELISA plates, according to Barral et al. (2000)¹¹. Plates were incubated overnight at 4°C. Furthermore, the plates were incubated with sera from chickens and IgY from eggs after three washes with PBS-0.05% Tween. The plates were blocked for 1 hour at 37°C in PBS-0.05% Tween and 5% non-fat milk. Furthermore, the plates were incubated with antibody anti-IgY for 1 hour at 37°C, after washing. Post the fourth washing cycle, the reaction was developed for 5 minutes using a chromogenic solution of tetramethylbenzidine 1M (TMB-Sigma) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Optical density (O.D) was determined at 450 nm.

Antibodies were produced in the chicken eggs exposed to all three insect-vector species, and antibodies were detected as early as the first immunization (**Figure 1**). This data demonstrates the high immunogenic capacity of salivary gland antigens.

Results from the pre-immunization samples wherein no antibodies were present are represented in **Figure 1** as “day 0 ≤ 0,” and the response to sand-fly salivary gland antigens at day fifteen is represented as “day 1 ≥ 1.” Our study suggests that antibody levels increased significantly with each successive immunization. By the fourth immunization, antibody levels were comparable with the positive control. Post insect blood-feeding, chickens in all groups exhibited increased sera and IgY reactivity; however, post last immunization, all groups exhibited higher reactivity in IgY antibodies extracted from eggs. These results indicate that eggs can be used to obtain IgY antibodies against the saliva of sand flies and anophelines, and that eggs can be used as a marker in endemic areas with high exposure to hematophagous bites.

No plateau was observed in the titration tests. Furthermore, the graph declined soon after the first dilution (**Figure 2**). Although high reactivity was observed in the initial dilution, our results suggest that antibody concentration was not high. However, since phlebotomine and anopheles blood-feeding occurs daily and at different times, it is likely that sera produced under natural conditions has a higher concentration of antibodies than that examined in this study.

A low cross-reactivity was observed among samples exposed to different insect species (**Figure 3**) as compared to the O.D of 1.5 demonstrated in **Figure 1**. This indicates that performing specific detection tests for each species is a possibility. Higher reactivity can be detected between *M. migonei* and *L. longipalpis*, than between *Anopheles aquasalis* and the other species tested. Such results are likely due to phylogenetic proximity as the sand fly genera likely share similar protein structures.

Antibody responses against salivary proteins of *Anopheles aquasalis*, *Lutzomyia longipalpis* and *Migonemyia migonei* were studied using two groups of chickens: one group exposed to insect bites and an unexposed negative control / repast group. The first group developed antibodies against salivary gland antigens from sandflies and mosquitoes, and the second group confirmed that no antibodies were present prior to immunization.

Post first immunization, high levels of IgY antibodies (O.D >1) were found in all sera and egg samples. These values were much higher than those found by Soares et al. (2013), who immunized chickens with sonicated salivary glands of *Lutzomyia longipalpis*, and reported an O.D. lower than 0.3. The higher antibody levels observed in the current study may indicate that inoculation by bite elicits a more intense immune response¹².

IgY antibody levels were high relative to the low exposure level of 30 insects per chicken. This result corroborates results obtained by Schwarz et al. (2009b), where antibody responses against *Triatoma infestans* salivary gland antigens in guinea pigs, pigs and chickens were detected under conditions of high and low exposure. Schwarz et al. identified the major salivary gland antigens and assessed their potential as exposure markers. They discovered that two salivary proteins (14 and 21 kDa from

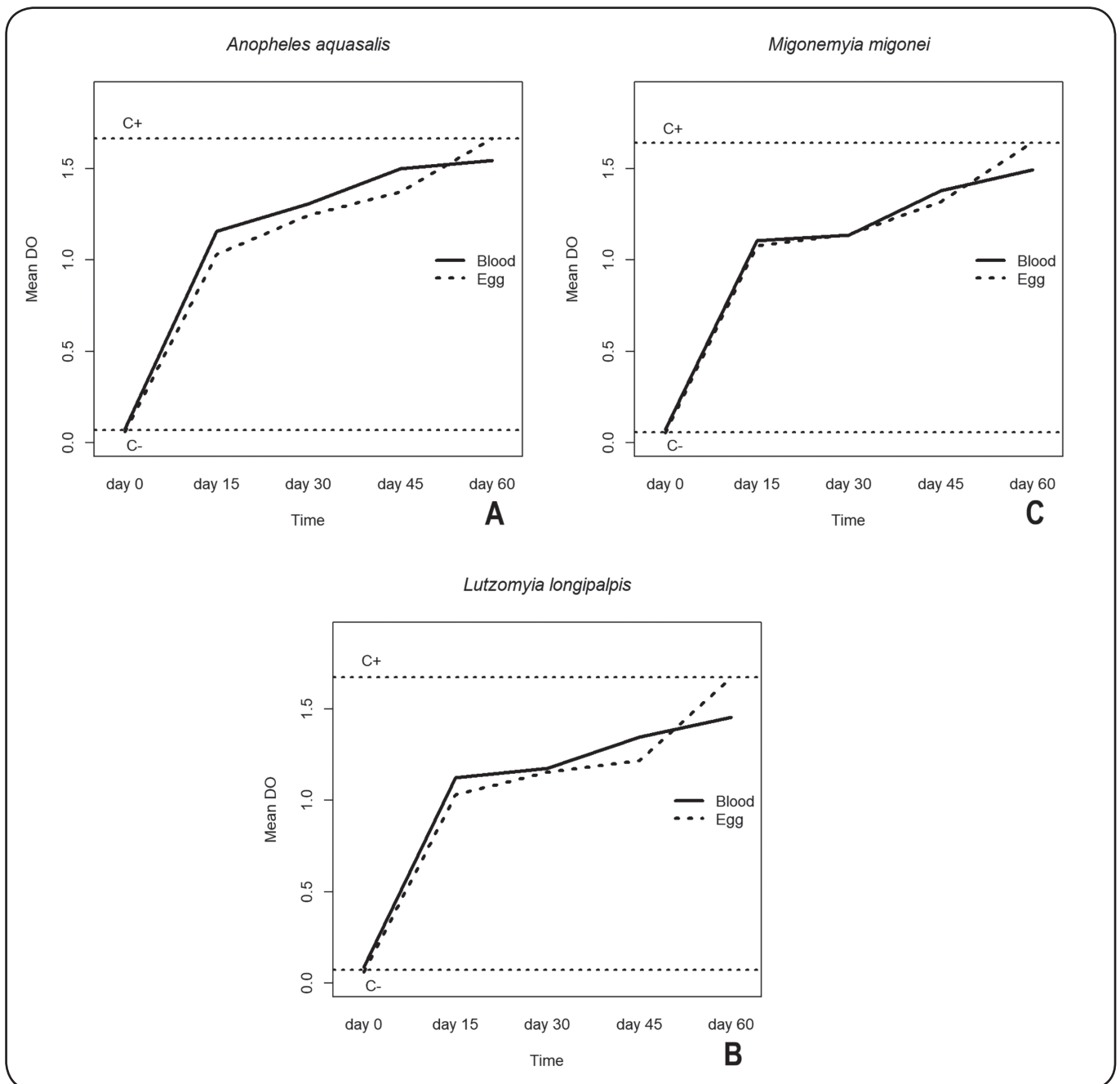


FIGURE 1: Production of antibodies against salivary gland proteins in insect vector species. Production of antibodies against salivary gland proteins from (A) *A. aquasalis*, (B) *L. longipalpis* and (C) *M. migonei*, in chicken eggs. Time in days; Y-axis response: mean optical density. C-: Negative control; C+: Positive control; DO: Optical Density.

the salivary glands of *T. infestans*) are capable of inducing IgY production in chickens and IgG production in guinea pigs, even during low exposure to triatomines⁷.

The cross-reactivity analysis showed that specific IgY antibodies develop against salivary proteins from malaria-transmitting mosquitoes. These results corroborate the findings of Armiyanti et al. (2015), who used salivary gland extracts from *Anopheles sundanicus* to detect the IgG antibodies production in serum samples from individuals living in malaria-endemic areas. Armiyanti et al. identified sixteen proteins that induce

the production of IgG antibodies in hosts: these varied from 22 to 144 kDa, with protein bands of 46, 41, 33 and 31 kDa being the most immunogenic. This demonstrates that antibodies can be developed against the salivary proteins of specific species¹³.

A variety of antigens were present in the vector saliva examined in this study. Identifying the antigen candidates for the most effective immunological markers can help design a laboratory test or rapid immunoassay for detecting exposure to the relevant vectors, as previously demonstrated by Kostalova et al. (2015) and Sima et al. (2016)^{14,15}.

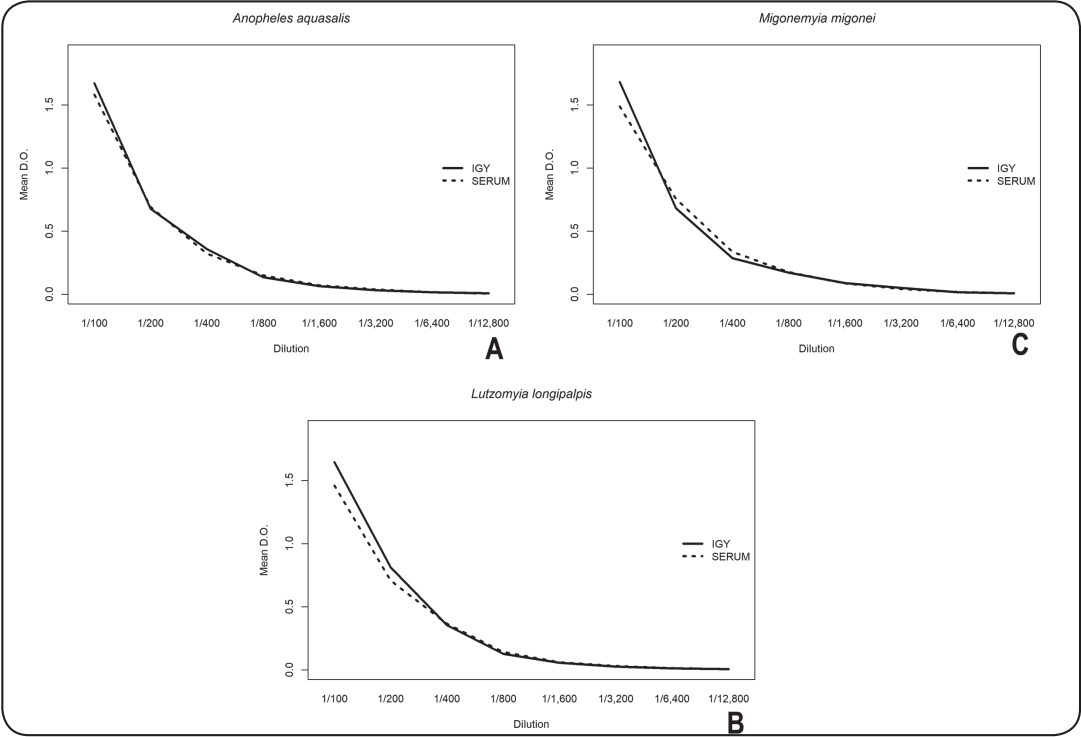


FIGURE 2: Titration ELISA. Serial dilution titration ELISA of IgY antibodies produced in eggs after chickens are infected by (A) *Anopheles aquasalis*, (B) *Lutzomyia longipalpis* and (C) *Migonemyia migonei*. Samples: blood (serum) and eggs (IgY) of chickens. O.D.: Optical Density.

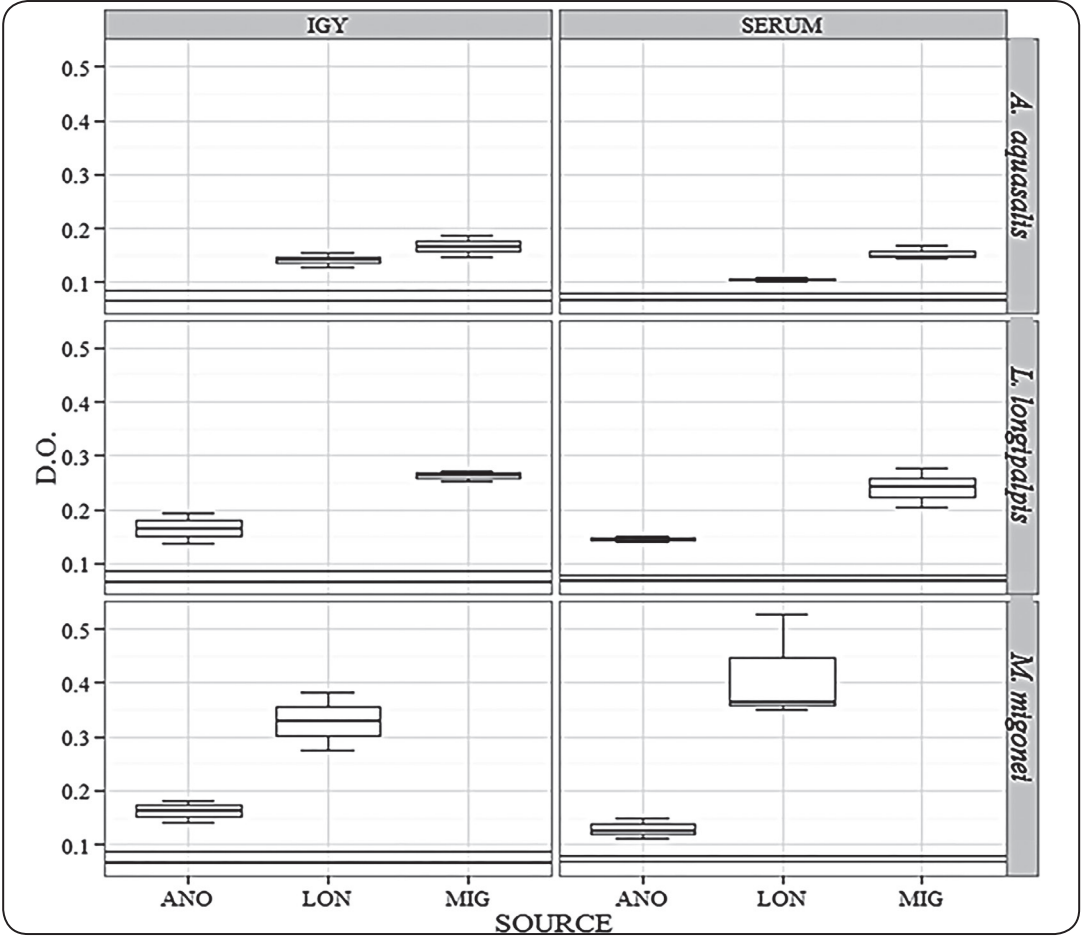


FIGURE 3: Cross reactivity analysis ELISA between the saliva of phlebotomine species *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles aquasalis*. D.O.: Optical density; ANO: *Anopheles aquasalis*, LON: *Lutzomyia longipalpis*; MIG: *Migonemyia migonei*; IgY: egg sample; Serum: blood sample.

Further research is required to identify these antigens and validate their use in immunoassays. It is recommended to test the described method in the current study on samples collected from the field.

Acknowledgments

We offer our deepest thanks to farm EZscience for supplying the chickens and the place to keep them.

Availability of data and materials

The datasets used during the current study are available from the corresponding author on request.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Financial Support

PROAPE-*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) 400896/2018-4. This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

- World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2017. Geneva: WHO; 2017. 196p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
- Sor-suwan S, Jariyapan N, Roytrakul S, Paemanee A, Phumee A, Phattanawiboon B, et al. Identification of salivary gland proteins depleted after blood feeding in the malaria vector *Anopheles campestris*-like mosquitoes (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2014;9(3):e90809.
- Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(26):15155-60.
- Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho AJS, Camargo LMA, Tadei WP, Moreira LA, et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J*. 2009;8(1):121.
- Souza AP, Andrade BB, Aquino D, Entringer P, Miranda JC, Alcantara R, et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e649.
- Trejejo RT, Reeves WC. Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(4):481-7.
- Schwarz A, Sternberg JM, Johnston V, Medrano-Mercado N, Anderson JM, Hume JCC, et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol*. 2009;39(9):1021-9.
- Nogueira PM, Assis RR, Torrecilhas AC, Saraiva EM, Pessoa NL, Campos MA, et al. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):e-0004848.
- Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(1):23-47.
- Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *J Vis Exp*. 2011;(51):pii:3084.
- Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(6):740-5.
- Soares BR, Souza APA, Prates DB, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Miranda JC, et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. *Sci Rep*. 2013;3:2352.
- Armiyanti Y, Nuryady MM, Arifianto RP, Nurmariana E, Senjarini K, Fitri LE, et al. Detection of immunogenic proteins from *Anopheles sudaicus* salivary glands. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):410-6.
- Kostalova T, Lestnova T, Sumova P, Vlkova M, Rohousova I, Berriatua E, et al. Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus perniciosus*: a longitudinal study in an endemic focus of canine leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e-0003855.
- Sima M, Ferencova B, Warburg A, Rohousova I, Volf P. Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004553.

CAPÍTULO 3

Uso de ovos galinhas sentinelas em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana e Malária como: proposta para vigilância sanitária

Rarissa de Oliveira e Silva¹, Luis André Moraes Mariúba^{1,2}, Felipe Arley Costa Pessoa²,
Antônio Alcirley da Silva Balieiro²

1-Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada- Universidade Federal do Amazonas, 2- Fundação Oswaldo Cruz- Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

RESUMO

Malária e leishmanioses são doenças transmitidas por vetores durante a alimentação sanguínea dos mesmos. As fêmeas dos vetores são responsáveis pela transmissão dos protozoários durante a hematofagia, proteínas salivares com propriedades vasodilatadoras e anti-hemostáticas também são inoculadas. Em áreas endêmicas, os vetores picam galináceos e esses animais são capazes de produzir anticorpos contra as proteínas das glândulas salivares desses insetos. O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta humoral de galinhas expostas naturalmente a picadas de flebotomíneos e anofelinos pelo uso de ovos produzidos por esses animais para detecção de anticorpo IgY. A área de estudo foi o Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, Brasil, onde 85 ovos foram coletados de 29 pontos amostrais nos seis ramais da comunidade. Observou-se níveis altos de anticorpos IgY contra proteínas salivares de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) e *Migonemyia* (Diptera: Psychodidae), com esses resultados testou-se a resposta das galinhas quanto a presença de antígenos de *Leishmania* e *Plasmodium*, constatando níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium*. Com os dados concluiu-se que ovos de galinhas expostas podem ser usadas como sentinelas em inquéritos sorológicos para detecção de áreas de exposição aos vetores de leishmaniose e malária, com a vantagem de não ser necessário a extração de sangue desses animais. E proteínas de leishmânias e plasmódios podem ser usadas em análises de risco de transmissão desses protozoários.

Palavras-chaves: *Leishmania*, *Plasmodium*, proteínas salivares, galinhas

ABSTRACT

Malaria and leishmaniasis are diseases transmitted by vectors during their blood feeding. Females of the vectors are responsible for the transmission of protozoa during hematophagy, salivary proteins with vasodilatory and anti-hemostatic properties are also inoculated. In endemic areas, vectors bite chickens and these animals are able to produce antibodies against the proteins of the salivary glands of these insects. The objective of this work was to evaluate the humoral response of naturally exposed chickens to sandflies and anophelines by using eggs produced by these animals to detect IgY antibodies. The study area was the Rio Pardo settlement, Presidente Figueiredo-Amazonas, Brazil, where 85 eggs were collected from 29 sample points in the six branches of the community. High levels of IgY antibodies against salivary proteins of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and *Migonemyia* (Diptera: Psychodidae) were observed, with these results the response of the chickens to the presence of *Leishmania* and *Plasmodium* antigens was tested, showing high levels of anti-*Leishmania* and anti-*Plasmodium* antibodies. With the data, it was concluded that eggs from exposed chickens could be used as sentinels in serological surveys to detect areas of exposure to leishmaniasis and malaria vectors, with the advantage of not requiring the extraction of blood from these animals. *Leishmania* and *Plasmodium* proteins can be used in risk analysis of the transmission of these protozoa.

Keys-word: *Leishmania*, *Plasmodium*, salivary proteins, chickens.

1- INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores representam 17% de todas as doenças infecciosas causando mais de 700.000 mortes anuais. Os vetores são organismos vivos que podem transmitir doenças infecciosas entre humanos ou de animais para humanos. A maioria desses insetos são hematófagos e ao ingerirem sangue com microorganismos patogênicos, podem se infectar e após novo repasto injetam em um novo hospedeiro esses patógenos que causam doenças (RIBEIRO, 1987; WHO PRESS, 2018). A malária e as leishmanioses são exemplos de doenças infecciosas transmitidas por vetores (WHO/PAHO, 2019; WHO, 2018).

O agente etiológico da malária é um parasito do gênero *Plasmodium*. A transmissão natural acontece através da picada de fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Anopheles* (BRASIL, 2010). Enquanto que as leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas quase sempre pela picada do flebotomíneo (BRASIL, 2017a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde cerca de um bilhão de pessoas estão em área de risco de infecção (WHO/PAHO, 2019). As leishmanioses apresentam duas formas clínicas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) que pode ser cutânea e de mucosas, nas américas são chamadas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BRASIL, 2017a; WHO/PAHO, 2019).

Os monitoriamentos epidemiológicos dessas doenças são caracterizados pelos dados disponíveis no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP). Para se determinar a localização prioritária é necessário identificar as localidades com maior carga de doença de acordo com a notificação de casos e do cadastro do local provável de infecção no SIVEP (BRASIL, 2009). Para análise epidemiológica são levantados indicadores com base a avaliar o impacto das ações de controle do vetor, entre eles: incidência parasitária anual, porcentagem de casos de malária causados por espécie parasitária, faixas etárias afetadas e meses com maior número de caso (BRASIL, 2009; WHO PRESS, 2018). As metodologias padronizadas para coletas são empregas pela Organização Pan- Americana de Saúde e consiste em um cálculo da média de casos, densidade de casos por área em um período de três anos (BRASIL, 2017b).

São necessárias também caracterização de dados socioeconômicos, geográficos e ecológicos com demanda de visitas domiciliares para avaliar características da localidade. Esses trabalhos em campo demandam tempo e esforço operacional para levantamento das

informações. Dessa forma, recomenda-se caracterização entomológica que permitirá gerenciar parâmetros entomológicos que completem os dados epidemiológicos. A metodologia para o monitoramento entomológico consiste em acompanhar as alterações comportamentais das principais espécies de flebotomíneos e anofelinos em relação aos biótopos naturais, assim como estabelecer curvas de sazonalidade para as espécies de importância médico sanitária (BRASIL, 2017b, 2017a).

A densidade larvária anofélica e horário de pico são indicadores entomológicos importantes na vigilância entomológica para malária. O risco de transmissão dos protozoários são calculados pela taxa de inoculação entomológica que é o número de picadas infectantes em um determinado período. Deve-se ter dados da infectividade de mosquitos e o índice de picada/homem/hora. Porém, esses indicadores necessitam de trabalho em campo dispendioso e uma equipe especializada para inquéritos anuais (BRASIL, 2017b, 2017a; WHO PRESS, 2018)

Uma proposta de indicador entomológico é a reposta humoral direta e indireta da presença de protozoários na localidade através da análise de anticorpos contra proteínas de *Leishmania* e *Plasmodium* e proteínas salivares dos vetores de leishmaniose e malária. Diversos autores utilizaram anticorpos contra saliva de vetores que se alimentam de sangue e com os resultados observaram que essa atividade humoral pode ser usada como sentinelas em área endêmica. Kostalova et al (2017) sugeriram que a frequência de contatos aos flebotomíneos poderia ser medida pelos níveis de anticorpos do hospedeiro contra as proteínas salivares desses vetores. Esses autores analisaram contra proteínas recombinantes de Ph. Perniciosus em soro de cães expostos naturalmente à picada desses insetos corroborando que as proteínas salivares podem ser usadas em análises de exposição aos vetores de doenças infecciosas (KOSTALOVA et al., 2019)

Sadia-Kacou et al (2019) analisaram a exposição humana a picadas de *Anopheles* através da avaliação dos níveis de IgG para o antígeno gSG6P-1, um peptídeo delimitado como marcador de exposição humana ao anofelino. Observaram altos níveis de anticorpos nas crianças moradoras de áreas endêmicas, a resposta foi sazonal apresentando maiores índices em época de chuva. Esses resultados demonstraram que humanos poderiam ser usados como hospedeiros sentinelas (SADIA-KACOU et al., 2019).

A alimentação sanguínea das fêmeas vetoras pode ocorrer em vários hospedeiros além de humanos, principalmente animais domésticos encontrados na área peridomiciliar (FLORES-

MENDOZA; CUNHA; ROCHA, 1996; SCHWARZ et al., 2009b; VLKOVA et al., 2011). Kostalova et al (2017) sugeriram que a frequência de contatos aos flebotomíneos poderia ser medida pelos níveis de anticorpos do hospedeiro contra as proteínas salivares desses vetores. Esses autores analisaram anticorpos contra proteínas recombinantes salivares de *Phlebotomus perniciosus* em soro de cães expostos naturalmente a picadas desses insetos corroborando que as proteínas salivares podem ser usadas em análises de exposição aos vetores de doenças infecciosas (KOSTALOVA et al., 2017).

Em sua grande maioria as casas em áreas periféricas urbanas e rurais possuem pequenas granjas de galinhas para a obtenção de ovos e carne dessas aves. Soares et al (2013) analisaram soro de galinhas imunizadas com proteínas salivares LMJ11 e LMJ17 de *Lutzomyia longipalpis*. Obtiveram resposta humoral com produção de anticorpos específicos para os antígenos e determinaram que as galinhas poderiam ser usadas como animais sentinelas em áreas endêmicas de LV (SOARES et al., 2013).

A proposta inovadora desse trabalho foi verificar a presença de anticorpos contra antígenos salivares e proteínas de protozoários em ovos de aves expostas naturalmente a flebotomíneos e anofelinos em Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, uma área endêmica de leishmaniose e malária. A constatação da resposta imunológica em ovos pode implicar em afirmar que existem esses vetores na área peridomiciliar, sendo de grande utilidade de vigilância epidemiológica. Além disso, a resposta para as proteínas dos protozoários trará um avanço na metodologia de risco de transmissão dessas doenças.

2 METODOLOGIA

Estudo observacional que utilizou galinhas de granjas peridomiciliares localizadas no Assentamento Rural Rio Pardo (S01°49'02.4";W060°19'03.6), no município de Presidente Figueiredo-Amazonas. De acordo com Ramos et al (2014) a maior abundância de flebotomíneos fora observados em áreas onde a densidade populacional é maior. Mudanças ocupacionais humana e na vegetação afeta a transmissão local de leishmaniose (RAMOS et al., 2014). Enquanto que Kano et al (2012) observaram que os moradores ao longo do rio Pardo, foram mais propensos a serem infectados com malária do que aqueles que vivem nas estradas não pavimentadas, sugerindo que estão mais expostos aos vetores da malária, devido a proximidade aos criadouros de anofelinos. (KANO et al., 2012)

As amostras foram coletadas de acordo com os pontos de coletas de trabalhos anteriores da equipe, determinadas de acordo com a abundância de flebotomíneos encontrados nas capturas. Em Rio Pardo, Presidente Figueiredo (Amazonas, Brasil), a grande maioria das casas possui pequenas granjas de galinhas para a obtenção de ovos e carne dessas aves. A coleta ocorreu nos seis ramais do assentamento, até três ovos foram coletados de cada galinheiro totalizando 85 ovos. As 5 amostras que apresentaram gema inviável, pois os ovos já estavam fecundados, foram descartadas na fase inicial de triagem, antes da etapa de extração de anticorpos IgY. Após o teste de Bradford e cálculo da reta padrão de proteínas não foi possível detectar a presença de anticorpos em 10 amostras, desse modo, essas amostras foram excluídas do projeto também.

2.1 Desenho Amostral

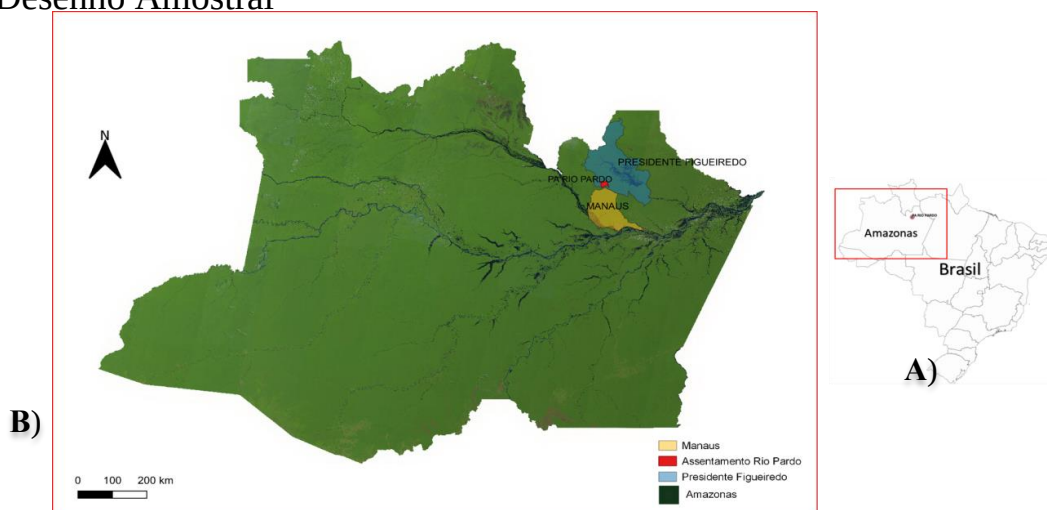


Figura 1. (A) Mapa do Brasil, destacando o Estado do Amazonas, (B) Mapa do Amazonas, destacando os municípios Manaus, Presidente Figueiredo e o Assentamento Rio Pardo.

O Assentamento rural Rio Pardo está localizado no Município de Presidente Figueiredo aproximadamente 110 km de Manaus, capital do estado do Amazonas, Brasil.

Um questionário foi aplicado aos moradores dos 29 pontos amostrais para obtenção de dados a respeito de histórico de leishmaniose na casa. Perguntava-se tinha galinhas, a distância da residência em relação ao galinheiro, a quantidade de galinhas na residência, a procedência da galinha e números de casos de leishmaniose no local e se o doente adentrava a floresta.

Questionário: CEP: O projeto: Arboviroses emergentes na Amazônia: fatores de risco de incidência de *Alphavirus*, com ênfase em Mayaro, na fronteira agrícola com número CAAE 40108114.7.0000.5248.

No mapa do satélite nota-se os seis ramais da comunidade já descritos e em amarelo os 29 pontos de coletas. A distância entre os pontos é em decorrência do espaçamento entre as casas de acordo com os ramais.

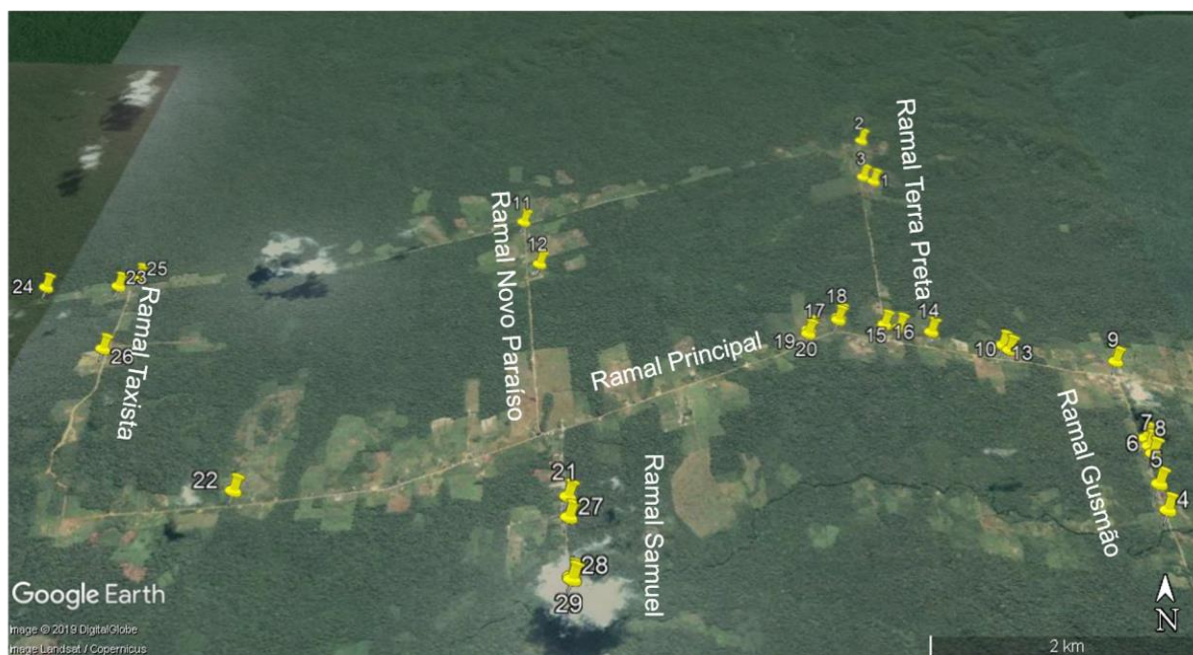


Figura 2. GOOGLE EARTH (modificado). Mapa do satélite do Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, 2019. 1 mapa: 16x09 cm. Escala: 2km.

2.2 Glândulas salivares

As glândulas utilizadas nos experimentos foram provenientes de fêmeas de três espécies de artrópodes que se alimentam de sangue: *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* e *Anopheles aquasalis*. As glândulas salivares foram retiradas por meio de dissecação, com o uso de estiletes, com auxílio de um microscópio estereoscópico e armazenadas em solução salina. As espécies de flebotomíneos *M. migonei*, *L. longipalpis* e o anofelino foram obtidas do

insetário do Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia. Para o uso em testes imunológicos as glândulas passaram por processo de sonicação a uma frequência de 100 Hz por 10 minutos, gerando produtos de Sonicado de Gândula Salivar (SGS) e armazenadas a -20° C.

2.3 Extrato dos parasitas

Os extratos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* foram obtidos na forma promastigota de culturas e extratos de cultura de *Plasmodium vivax* em forma de trofozoíto. As leishmanias foram provenientes de banco de amostras do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) e adquiriu-se os trofozoítos na contagem de células 5×10^7 com o Dr Pritesh do ILMD. Para o uso em testes imunológicos os extratos passaram por processo de sonicação a uma frequência de 100 Hz por 10 minutos e armazenadas a -20°. Usou-se os parasitas como antígenos para verificar se as galinhas foram expostas aos parasitas e se produziram anticorpos IgY anti- *Leishmania* e anti-*Plasmodium*.

2.4 Extração do IgY e Quantificação das proteínas

A extração do anticorpo do ovo da galinha foi feito através do método de precipitação utilizando Polietileno Glicol (PEG 6000) em que consiste remover lipídeos da gema da galinha e precipitar o IgY total do sobrenadante. (PAULY et al., 2011)

A dosagem de proteínas foi através do ensaio de Bradford, que tem como base o azul brilhante de *Coomassie*, foi realizada com as 80 amostras após a etapa de extração de IgY, utilizando como controle positivo BSA. Após leitura em leitor de microplacas foi calculada a concentração de proteínas totais (anticorpos IgY totais) e determinada a quantidade padrão de anticorpos a se utilizar por poço no Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

2.5 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

O método imunoenzimático utilizado foi o ELISA indireto Barral et al (2000) modificado (BARRAL et al., 2000). Foram sensibilizados poços de uma placa de ELISA com 1 par por ml de extrato de glândulas salivares dos flebotomíneos e anofelino na concentração de 4ng/poço, os extratos do parasitas foram também usados na concentração 4ng/ poço.

Soros de galinhas expostas experimentalmente a picadas de *L. longipalpis*, *M. migonei* e *A. aquasalis* foram utilizadas como controle positivo para o teste imunológico (SILVA et al.,

2019). O controle negativo (c-) do teste baseou-se na qualidade do anticorpo secundário, portanto, nos poços de placas de ELISA determinados para c- não foram acrescentados anticorpos primários, apenas a solução (Solução Fosfato Salina/Albumina de Soro Humano) PBS/BSA 3%.

Os controles positivos para os ensaios com extratos de *Leishmania* procederam de indivíduos com histórico de leishmaniose e os controles negativos originaram de indivíduos sabidamente negativos para *Leishmania*. Soros de pacientes com *Plasmodium vivax* +++ foram utilizados como controles positivos no ELISA. E usou-se soros de indivíduos negativos para *Plasmodium* como controles negativos. Para estudo com soros humanos utilizou-se o anticorpo secundário anti-IgG humana de cabra.

Como anticorpo primário, PBS/BSA 3% foi adicionado nos poços controles e nos outros poços as amostras da gema diluída em tampão PBS/ BSA 3%, 12ng/poço de proteína foi padronizado com a reta de Bradford Para anticorpo secundário foi utilizada a concentração 1/1000 de anti-IgY de cabra adicionado em tampão PBS/ BSA 3% em todos os poços.

Para revelar a reação o Substrato Cromogênico Tetrametilbenzidina 1M (TMB-Sigma) e H₂O₂ (água oxigenada) foi adicionado na solução de fosfato dissódico-ácido cítrico em cada poço da placa por cinco minutos que, em seguida, foi interrompida com H₂SO₄ (ácido sulfúrico) e depois realizada a Leitura da placa de ELISA em um comprimento de onda de 450nm, e medição por Densidade Óptica (DO).

2.7 Análise estatística

O software estatístico utilizado foi o R 3.0.1. O nível de significância utilizado foi de 5%. Foram desenvolvidas técnicas não-paramétricas baseadas no conceito de efeito relativo de tratamento que apresenta resultado análogo àqueles obtidos por ANOVA para medidas repetidas paramétrico. A normalidade entre os ramais e saliva, ramais e parasitas estabeleceu-se por regressão de modelos lineares generalizados normal com dois fatores. Em todos os casos, os valores apresentaram diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Detecção de anticorpos anti-saliva

O desenvolvimento de anticorpos contra antígenos salivares de *L. longipalpis*, *A. aquasalis* e *M. migonei* em ovos de galinhas foi avaliado. Foi observado que as galinhas expostas naturalmente às picadas de insetos apresentaram altos níveis de anticorpos IgY anti-SGS de *A. aquasalis* e *M. migonei* em todos os ramais, exceto Taxista $DO \geq 0,5$ (Figura 3). Os níveis de anticorpos nos Ramais Novo Paraíso, Principal e Samuel contra as proteínas salivares de *An. aquasalis* e *Mi. migonei* foram próximos.

Os níveis de anticorpos anti-SGS de *L. longipalpis* foram baixos e Ramais como Novo Paraíso, Samuel e Taxista apresentaram a $D.O \leq 0,5$. Os Ramais Gusmão, Principal e Terra Preta demonstraram $D.O \leq 1,5 \geq 1,0$. Esses resultados indicam que galinhas de campo são capazes de soroconverter contra antígenos da saliva.

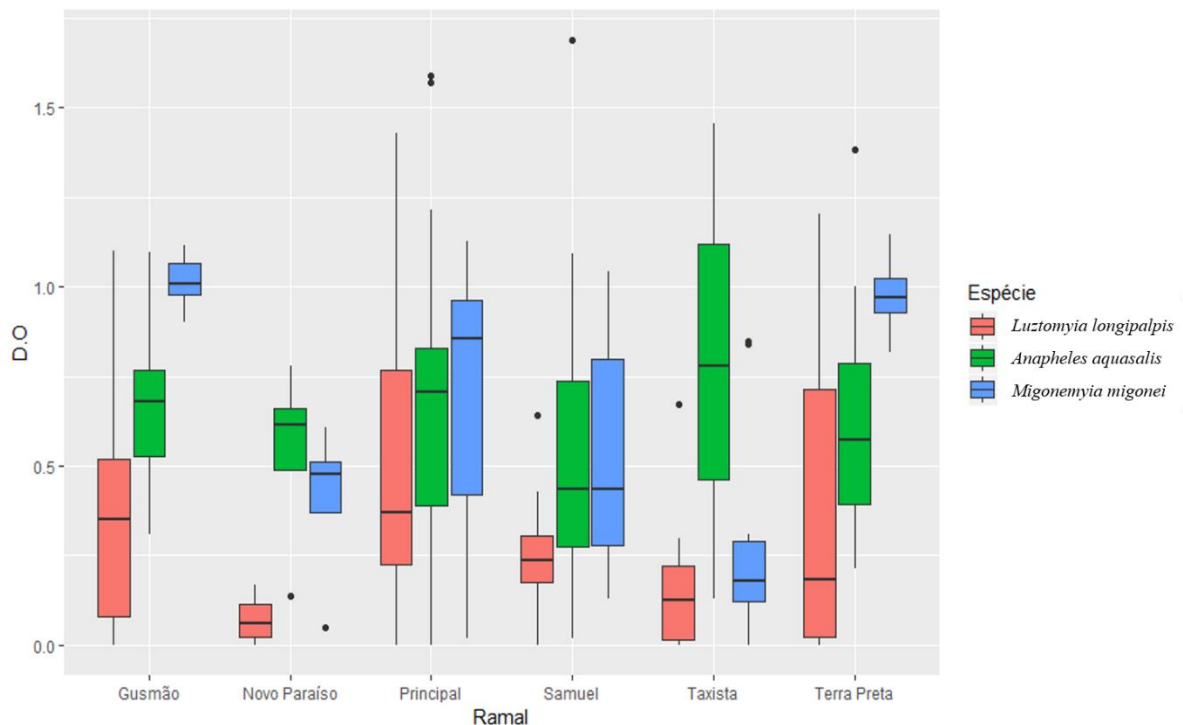


Figura 3. Gráfico de Produção de anticorpos contra proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, *Anopheles aquasalis* e *Migonemyia migonei* em ovos de galinhas expostas naturalmente a picadas de insetos em uma região endêmica de leishmaniose e malária. Os dados apresentam a média menos o controle negativo do teste realizado em duplicata com 70 ovos coletados nos seis ramais do Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. D.O Densidade Óptica, Boxplot: vermelho *Lu. longipalpis*, verde *An. aquasalis* e azul *Mi. migonei*.

3.2 Correlação entre Ramais e Anti-SGS

Devido a disposição do Assentamento e a proximidade dos ramais determinou-se a produção de anti-SGS por ramais. Em estudo paralelo, nosso grupo analisou a abundância e diversidade de insetos em peridomicílio, borda de floresta e floresta, dessa forma observou-se que a maior abundância de insetos na área peridomiciliar estava localizadas nos ramais Taxista, Gusmão e Novo Paraíso, respectivamente. O gênero mais abundante foi *Lutzomyia sp* no ramal Taxista (dados não publicados).

Dessa forma, estudou-se a normalidade entre os dados correlacionando ramal e anticorpos anti-SGS tendo como referência a espécie *Mi. migonei* e o ramal Taxista. Não utilizou-se como referência a espécie *Lu. longipalpis*, pois essa não é encontrada no Estado do Amazonas.

A produção de anticorpos anti-SGS de *Mi. migonei* no Ramal Taxista não apresentou diferença significativa para a produção de anti-SGS de *Anopheles aquasalis* nos ramais Gusmão e Terra Preta (Figura 4) $p < 0,001$ e Ramal Principal $p = 0,002$. E possuiu diferença significativa em todos os ramais para a produção de anti-SGS de *Lutzomyia longipalpis* (Tabela 1).

Na figura 4 pode-se verificar os níveis de anticorpos anti-SGS de *Mi. migonei*, esses foram altos com D.O $\geq 1,2$ no Ramal Gusmão e Terra Preta e não no Ramal Taxista. De fato, os níveis de anticorpos *M. Migonei* D.O $\leq 0,6$ nesse ramal foram próximos ao resultado de *Lu. longipalpis* $\leq 0,5$. A soroconversão das galinhas com D.O $\geq 0,6$ e $\leq 1,0$ localizadas em ramais geograficamente próximos Taxista, Novo Paraíso e Samuel foi determinada, assim como galinhas de granjas nos Ramais próximos Gusmão, Principal e Terra Preta apresentaram D.O próximas $\geq 0,8$ e $\leq 1,2$.

Observa-se que os níveis de anticorpos foram próximos em cada um dos seguintes ramais Novo Paraíso, Principal e Samuel para todos os insetos (Figura 4). Os resultados sugerem, apesar de diferenciar de um ramal para outro, que a resposta é de níveis próximos nos ramais localizados geograficamente próximos.

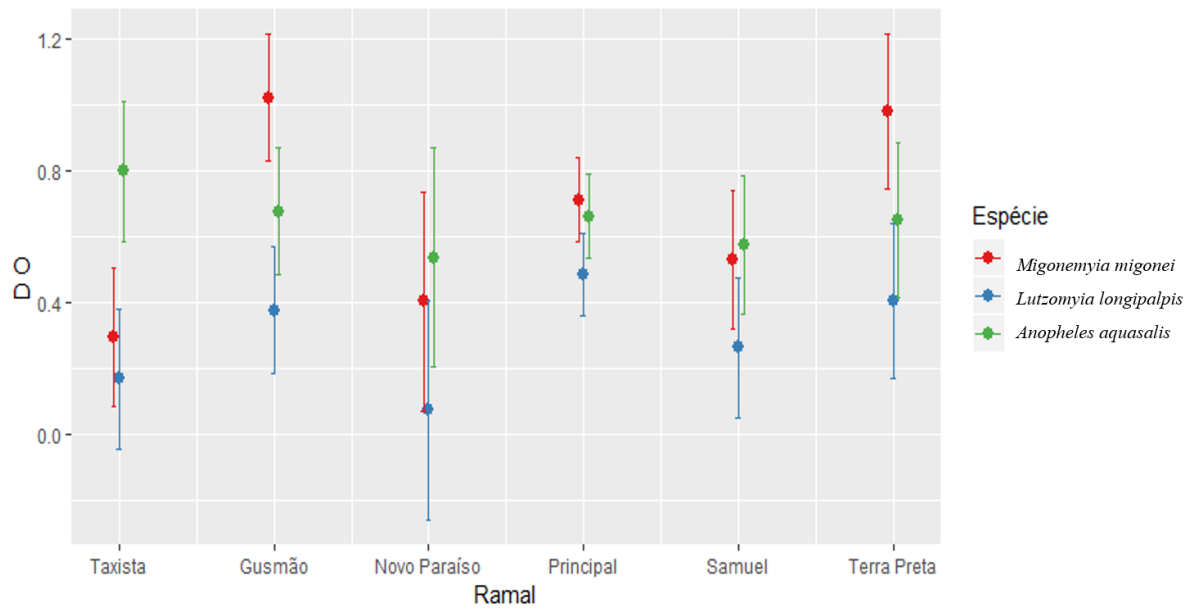


Figura 4. Correlação entre a produção de anti-SGS de flebotomíneos e anofelinos por Ramais em referência ao Ramal Taxista e a espécie *Migonemyia migonei*. Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas. Espécies vermelha *M. migonei*, azul *L. longipalpis* e verde *A. aquasalis*; D.O Densidade Optica

Tabela 1. Regressão de modelos lineares generalizados (GLM) de dois fatores para saliva de flebotomíneos e anofelinos por Ramais em referência ao Ramal Taxista e espécie *M. migonei* no Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas. .

<i>PREDITORES</i>	D O		
	<i>Estimados</i>	<i>CI</i>	<i>P</i>
(INTERCEPT)	0.30	0.08 – 0.51	0.007
Taxista	Referência		
Gusmão	0.72	0.44 – 1.01	<0.001
Novo paraíso	0.11	-0.29 – 0.50	0.592
Principal	0.42	0.17 – 0.66	0.001
Samuel	0.23	-0.06 – 0.53	0.124
Terra preta	0.68	0.37 – 1.00	<0.001
<i>Migonomyia migonei</i>	Referência		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.13	-0.43 – 0.17	0.404
<i>Anopheles aquasalis</i>	0.50	0.20 – 0.80	0.001
Ramal= Taxista * esp.= <i>Migonomyia migonei</i>	Referência		
Ramal Gusmão: Espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.52	-0.92 – -0.11	0.013
Ramal Novo Paraíso: Espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.20	-0.76 – 0.35	0.476
Ramal Principal: Espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.10	-0.45 – 0.25	0.577
Ramal Samuel: Espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.14	-0.56 – 0.28	0.517
Ramal Terra Preta: Espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>	-0.45	-0.89 – 0.00	0.051
Ramal Gusmão: Espécie <i>Anopheles aquasalis</i>	-0.85	-1.25 – -0.44	<0.001
Ramal Novo Paraíso: Espécie <i>Anopheles aquasalis</i>	-0.37	-0.93 – 0.19	0.197
Ramal Principal: Espécie <i>Anopheles aquasalis</i>	-0.55	-0.90 – -0.21	0.002
Ramal Samuel: Espécie <i>Anopheles aquasalis</i>	-0.46	-0.88 – -0.04	0.034
Ramal Terra Preta: Espécie <i>Anopheles aquasalis</i>	-0.83	-1.28 – -0.38	<0.001
Observações	216		
COX & SNELL'S R ² / NAGELKERKE'S R ²	0.048 / 0.333		

3.3 Produção de anticorpos anti-parasita

A partir dos resultados obtidos com a resposta a saliva, foram analisados a respostas dos ovos das galinhas quanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium* com a finalidade de propor uma resposta direta a presença de leishmaniose e malária na área endêmica.

As galinhas soroconverteram com a produção de altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium*. As amostras testadas provenientes do Ramal Gusmão apresentaram níveis de D.O $\geq 1,5$ para todas as espécies de parasitas testados. Os Ramais Samuel e Taxista apresentaram baixos níveis D.O $\leq 0,8$ de anti-*Leishmania* em comparação aos outros ramais. Os Ramais Novo Paraíso, Taxista e Samuel apresentaram perfil de produção de anticorpos desregulares para todos os parasitas. Enquanto que os Ramais Gusmão, Principal e Terra Preta produziram anticorpos em níveis próximos com D.O entre 0,5 e 1,5 (Figura 5). Os níveis de anticorpos anti-*Leishmania braziliensis* e anti- *Leishmania guyanensis* foram próximos em todos os ramais. Os dados enfatizam que as galinhas de campo são capazes de produzir altos níveis de anticorpos anti-parasita.

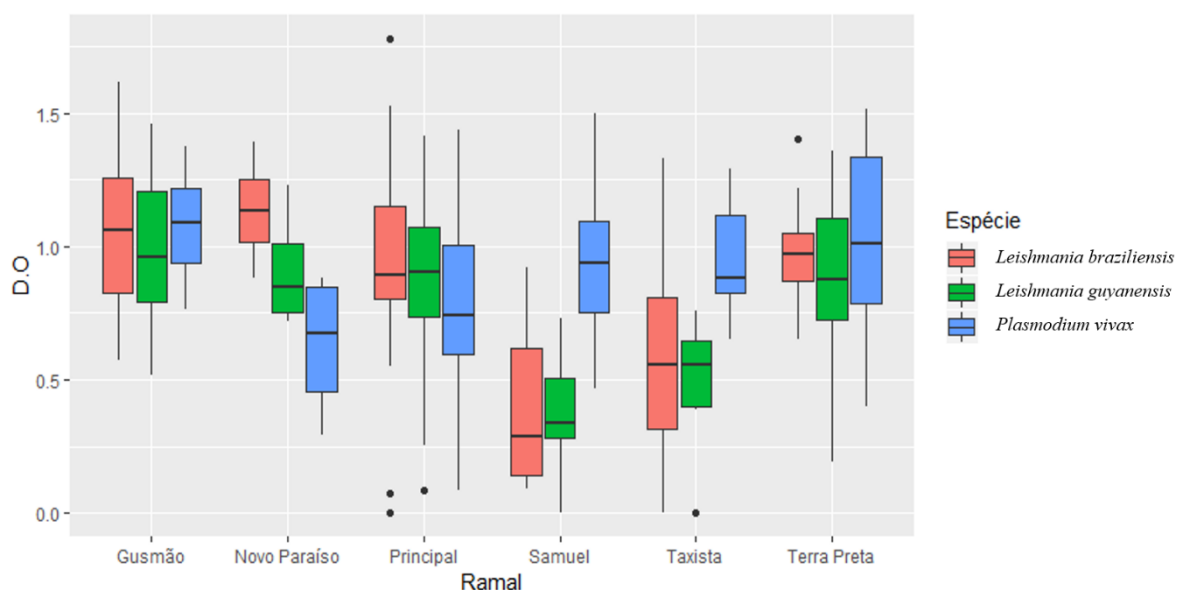


Figura 5. Produção de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium* por ovos de galinhas coletados no Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. D.O Densidade Optica. Boxplot cor rosa *Leishmania braziliensis*, verde *Leishmania guyanensis*, azul *Plasmodium vivax*.

3.4 Correlação entre Ramais e Parasitas

A análise de correlação de normalidade entre os dados de produção de anticorpos anti-parasitas por ramais teve por referência o Ramal Taxista e a espécie *Leishmania guyanensis*. A produção de anticorpos anti-parasita *Leishmania guyanensis* no Ramal Taxista não apresentou diferença significativa para a produção de anti-parasita *Plasmodium vivax* nos ramais Principal e Novo Paraíso (Figura 6) p 0,001 e p 0,005, respectivamente. E não possuiu diferença significativa em todos os ramais para a produção de anti-parasita de *Leishmania braziliensis* (Tabela 2).

Observa-se na figura 9 que os níveis de anticorpos anti-*Plasmodium vivax* D.O $\geq 1,0$ foram mais altos que anti-*Leishmaniam* D.O $\leq 0,8$ nos ramais Taxista e Samuel. Os Ramais Gusmão, Principal e Terra Preta localizados geograficamente próximos apresentaram níveis de D.O $\geq 1,0$ semelhantes de produção de anticorpos para todos os parasitas.

Na figura 6 verifica-se que os Ramais Taxista e Samuel apresentaram níveis de D.O $\leq 0,8$ mais baixos de anti-*Leishmania*. Enquanto que o Ramal Paraíso apresentou os níveis mais altos de D.O $\geq 1,2$. Verificou-se que a resposta de anti-*Leishmania* é próxima para ambas as espécies de leishmanias.

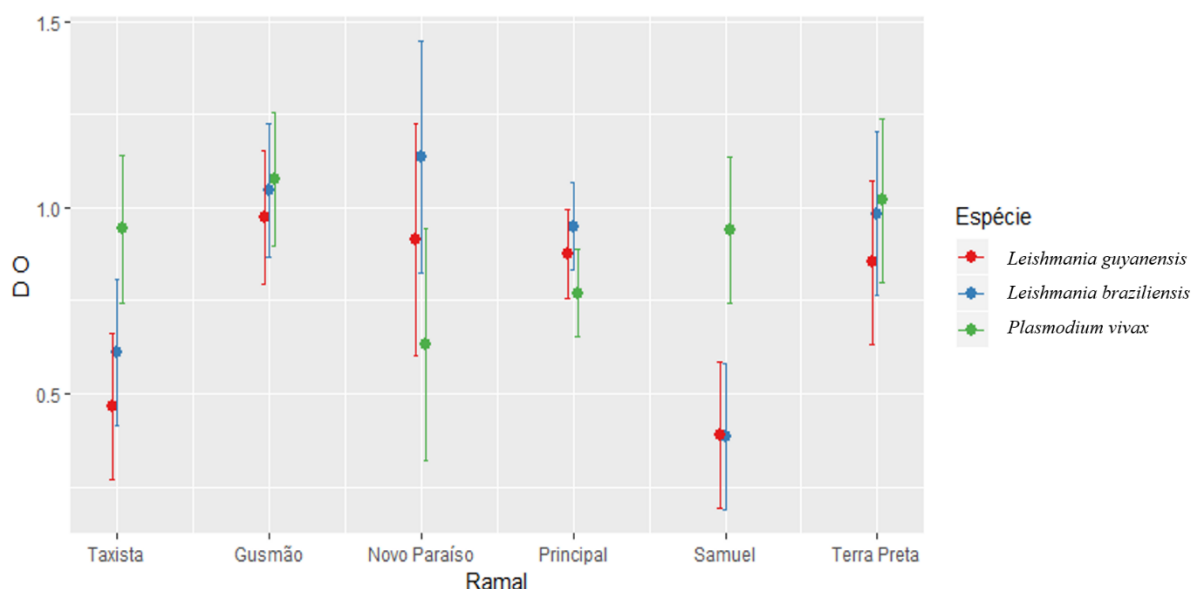


Figura 6. Gráfico de correlação entre a produção de anti-parasita por Ramais em referência ao Ramal Taxista e a espécie *Leishmania guyanensis*. Espécie vermelha *Le. guyanensis*, azul *Le. braziliensis* e verde *Plasmodium vivax*; D.O Densidade Óptica

Tabela 2 Regressão de modelos lineares generalizados (GLM) de dois fatores para os protozoários *Leishmania* e *Plasmodium* por Ramais em referência ao Ramal Taxista e espécie *Leishmania guyanensis* no Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas. .

Preditores	D O		
	Estimados	CI	p
(Intercept)	0.47	0.27 – 0.66	<0.001
Taxista	Referência		
Gusmão	0.51	0.24 – 0.77	<0.001
Novo Paraíso	0.45	0.08 – 0.82	0.018
Principal	0.41	0.18 – 0.64	0.001
Samuel	-0.08	-0.35 – 0.20	0.593
Terra Preta	0.39	0.09 – 0.68	0.011
<i>Leishmania Guyanensis</i>	Referência		
<i>Leishmania Braziliensis</i>	0.15	-0.13 – 0.43	0.303
<i>Plasmodium Vivax</i>	0.48	0.20 – 0.76	0.001
Ramal=Taxista * Esp.= <i>Leishmania guyanensis</i>	Referência		
Ramal Gusmão: Espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	-0.07	-0.45 – 0.30	0.707
Ramal Novo Paraíso:Espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	0.08	-0.44 – 0.60	0.771
Ramal Principal: Espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	-0.07	-0.40 – 0.25	0.660
Ramal Samuel: Espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	-0.15	-0.55 – 0.24	0.453
Ramal Terra Preta: Espécie <i>Leishmania braziliensis</i>	-0.02	-0.43 – 0.40	0.940
Ramal Gusmão: Espécie <i>Plasmodium vivax</i>	-0.37	-0.75 – 0.00	0.053
Ramal Novo Paraíso:Espécie <i>Plasmodium vivax</i>	-0.76	-1.28 – -0.24	0.005
Ramal Principal:Espécie <i>Plasmodium vivax</i>	-0.58	-0.91 – -0.26	0.001
Ramal Samuel:Espécie <i>Plasmodium vivax</i>	0.07	-0.32 – 0.47	0.720
Ramal Terra Preta:Espécie <i>Plasmodium vivax</i>	-0.31	-0.73 – 0.11	0.147
Observações	216		
COX & SNELL'S R ² / NAGELKERKE'S R ²	0.041 / 0.327		

3.5 Correlação entre Parasitas e Vetores

Com os dados de produção de anticorpos anti-SGS e anti-saliva foram analisados a correlação entre a presença do parasita no ramal e a presença do respectivo vetor. Nota-se que os níveis de anticorpos anti-parasita D.O $\leq 1,5 \geq 0,8$ foram maiores em todos os ramais do que os níveis de anti-SGS com D.O $\leq 1,5 \geq 0,5$ (Figura 7).

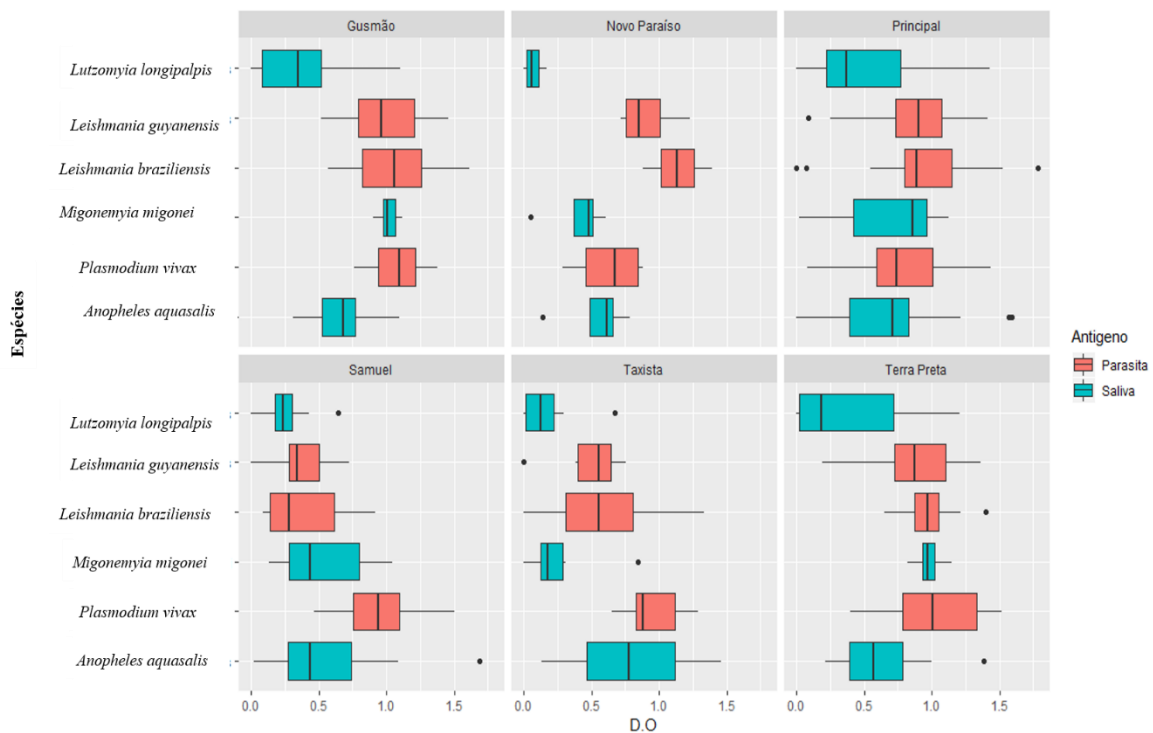


Figura 7. Correlação entre presença de anticorpos anti-SGS de *Lutzomia longipalpis*, *Anopheles aquasalis*, *Migonemyia migonei* e anti-parasita de *Plasmodium vivax*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* por ramal do Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas. D.O Densidade Óptica. Boxplot cor rosa anticorpos anti-parasitas, azul anticorpos anti-saliva.

Nos ramais Gusmão, Principal, Samuel e Terra Preta a produção de anti-*Leishmania guyanensis* D.O $\geq 1,2$ ocorreu em proximidade com a produção de anti-SGS de *Mi. migonei* de D.O $\leq 0,8$. Enquanto que nos ramais Novo Paraíso, Principal e Taxista as galinhas soroconverteram anticorpos anti-*Plasmodium vivax* com D.O $\geq 0,8$ e anticorpos anti-*A. aquasalis* com D.O $\geq 0,8$.

O ramal Samuel com média de D.O entre 0,5 e 1,0 e Novo Paraíso com D.O entre 0,3 e 1,0 apresentaram os menores níveis de anticorpos tanto anti-SGS quanto anti-parasita. Os ramais Gusmão com D.O em média 0,5 e 1,2; Principal D.O 0,8 e 1,0 e Terra Preta com D.O

0,8 e 1,2 apresentaram os maiores níveis de anticorpos para saliva e parasita. Anti- *Lu. longipalpis* apresentou os níveis mais baixos D.O 0,2 entre todos os resultados de D.O.

A Tabela 3 apresenta os dados dos pontos amostrais com indicação por ramal, casos de leishmanioses na localização, quantidade de galinhas na residência e a distância do galinheiro para a casa. No momento da coleta dos ovos aplicava-se o questionário para relacionar os dados locais com os testes imunológicos. Os pontos amostrais 3 no Ramal Terra Preta, 4 e 8 no Ramal Gusmão, 12 no Novo Paraíso, 13 e 20 no Ramal Principal e 26 no Taxista houveram relatos de leishmaniose na casa.

Tabela 3. Relação de casos de leishmanioses no local de coleta dos ovos

Pontos amostrais	Ramal	Localização	Caso de Leishmaniose	Quantidade de galinha na casa	Distância do galinheiro (m)
1	Terra preta	S 01°46'23.0" W 060°17'19.5"	0	15	10
2	Terra preta	S 01°45'57.1" W 060°17'19.3"	0	10	5
3	Terra preta	S 01°46'20.7" W 060°17'22.8"	2 casos floresta e 1 peridomicílio	23	50
4	Gusmão	S 01°48'43.4" W 060°16'28.0"	1 peridomicílio	20	40
5	Gusmão	S 01°48'35.1" W 060°16'27.2"	0	20	5
6	Gusmão	S 01°48'25.3" W 060°16'25.4"	0	40	10
7	Gusmão	S 01°48'22.7" W 060°16'25.4"	0	33	15
8	Gusmão	S 01°48'19.9" W 060°16'25.4"	1 borda de floresta	10	20
9	Principal	S 01°47'50.4" W 060°16'23.4"	0	6	30
10	Principal	S 01°47'45.5" W 060°16'53.5"	0	20	30
11	Novo Paraíso	S 01°46'44.5" W 060°19'22.6"	0	25	40
12	Novo Paraíso	S 01°47'06.5" W 060°19'16.2"	1 floresta	20	30
13	Principal	S 01°47'43.4" W 060°16'55.0"	1 floresta	20	20
14	Principal	S 01°47'37.7" W 060°17'15.2"	0	30	5
15	Principal	S 01°47'36.0" W 060°17'24.6"	0	10	5
16	Principal	S 01°47'34.4" W 060°17'28.8"	0	20	5
17	Principal	S 01°47'32.5" W 060°17'42.8"	0	50	5
18	Principal	S 01°47'31.2" W 060°17'42.4"	0	30	10
19	Principal	S 01°47'38.4" W 060°17'52.8"	0	60	10

<i>Pontos amostrais</i>	<i>Ramal</i>	<i>Localização</i>	<i>Caso de Leishmaniose</i>	<i>Quantidade de galinha na casa</i>	<i>Distância do galinheiro (m)</i>
20	Principal	S 01°47'36.6" W 060°17'52.4"	1 caso floresta, + 3 anos	50	40
21	Samuel	S 01°48'39.3" W 060°19'04.5"	0	36	30
22	Principal	S 01°48'37.2" W 060°20'33.2"	0	6	3
23	Taxista	S 01°47'17.5" W 060°21'29.9"	0	18	20
24	Taxista	S 01°47'17.8" W 060°21'52.9"	0	30	5
25	Taxista	S 01°47'13.4" W 060°21'24.5"	0	8	10
26	Taxista	S 01°47'48.6" W 060°21'23.0"	2 casos floresta, + 10 anos	4	5
27	Samuel	S 01°48'45.8" W 060°19'04.1"	0	30	10
28	Samuel	S 01°49'03.3" W 060°19'02.9"	0	10	10
29	Samuel	S 01°49'04.1" W 060°19'02.8"	0	2	5

4.DISSCUSSÃO

Anticorpos anti-SGS foram produzidos nos ovos em todos os ramais, constituindo uma resposta semelhante entre os ramais localizados geograficamente próximos. Devido a proximidade dos ramais esperava-se encontrar insetos distribuídos com presença semelhante. Os resultados sugerem, apesar de diferenciar de um ramal para outro, que a resposta é de níveis próximos nos ramais localizados geograficamente próximos. Corroborando com os dados de Silva et al (2019) onde encontraram altos níveis de anticorpos anti- *M. Migonei*, anti-*An. aquasalis* em ovos de galinhas expostas a picadas desses insetos (SILVA et al., 2019).

Análise de correlação entre os ramais e a produção de anticorpos apresentou-se diferente. O Ramal Gusmão e não o Taxista obteve níveis elevados de anti-saliva, sugerindo uma sensibilidade maior no estudo de presença de vetores, pois os níveis de IgY são constante mesmo após dias de imunização ou contato com o antígeno (GUIMARAES, 2008; PAULY et al., 2011; SILVA et al., 2019).

Os níveis de anticorpos anti- *Lu longipalpis* foram baixos D.O 0,8 comparados com os encontrados por Silva et al (2019) D.O 1,5; estima-se esse resultado devido a não existência dessa espécie de flebotomíneo no área de estudo. Sugere-se a produção de anticorpos através de reatividade cruzada a outras espécies do gênero *Lutzomyia* por compartilharem proteínas salivares (SILVA et al., 2019).

Após confirmar a presença de anticorpos IgY anti-SGS nos ovos, verificou-se a produção de anticorpos específicos para proteínas de *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis* e *Plasmodium vivax*. Analisou-se a resposta das galinhas quanto a presença de anticorpo específicos para proteínas de cada parasita com o objetivo de determinar uma resposta direta a presença de leishmaniose e malária na área.

Apesar de galináceos não se infectarem com *Leishmania* (MENDES-SOUSA et al., 2013), demonstrou-se a capacidade em desenvolver uma resposta imune IgY anti-*Leishmania*. Altos níveis de anticorpos foram produzidos tanto para *Leishmania* quanto para *Plasmodium*. Otranto et al (2010) em estudo em *L. infantum* observaram em testes moleculares a resposta à infecção pelas leishmanias, porém as galinhas no experimento não foram capazes de soroconverter anticorpos, sugerindo uma resposta para produção de anticorpos de acordo com a espécie de *Leishmania* estudada (OTRANTO et al., 2010).

Correlacionando a normalidade entre os dados de produção de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium* por ramais determinou que a soroconversão para *Leishmania* não apresentou diferença significativa entre os níveis de anticorpos produzidos. Os Ramais localizados geograficamente próximos apresentam perfil de produção semelhante de forma esperada.

A presença de anticorpos anti-saliva é corroborada com a presença de anticorpos anti-parasita, a distribuição de vetores e parasitas nos ramais é semelhante sugerindo que ambas as metodologias podem ser usadas para análise de biomarcadores de exposição. Uma ferramenta de detecção direta da presença de *Leishmania* ou *Plasmodium* na áreas endêmica seria a detecção de proteínas através de anticorpos produzidos em ovos de galinhas. A detecção indireta de leishmaniose e malária na região decorreria da análise de proteínas salivares de vetores através da produção de anticorpos específicos para as proteínas.

No Assentamento Rio Pardo os ramais com histórico de infecção por *Leishmania* são Terra Preta e Gusmão com infecção em áreas peridomicilar. Os dados do trabalho demonstraram que esses ramais foram os que apresentaram maior níveis de anticorpos anti-SGS e anti-*Leishmania*.

5.CONCLUSÃO

Galinhas expostas naturalmente às picadas de flebotomíneos e anofelinos são capazes de produzir anticorpos IgY anti-saliva altamente específicos. Ovos de galinhas podem também responder com produção de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* e *Plasmodium*, sugerindo que esses animais podem ser considerados sentinelas para detectar a presença de vetores. Portanto, proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição e monitoramento de risco de transmissão em áreas endêmicas de leishmaniose e malária.

Os resultados encontrados evidenciam a resposta diferencial para espécies diferentes de vetores e parasitas. Assim como sugerem o uso tanto das proteínas de saliva de insetos quanto das proteínas dos parasitas, pois as galinhas são capazes de transferir altos níveis de anticorpos para a gema, portanto a resposta pode ser usada tanto para exposição à vetores (vigilância indireta) e exposição aos parasitas (vigilância direta). Dessa forma, o modelo proposto para análise de exposição de vetores e parasitas pode ser empregado em campo.

A constatação da resposta imunológica em ovos implicaria em confirmar a existência de flebotomíneos e anofelinos circulantes na área peridomiciliar, sendo esta informação de grande utilidade para vigilância epidemiológica. Em etapas posteriores, técnicas para rápida detecção de anticorpos marcadores de exposição poderão ser desenvolvidas para o monitoramento dos vetores de leishmaniose e malária.

REFERÊNCIAS

- BARRAL, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 740–745, 2000.
- BRASIL. **Guia prático de tratamento de malária no Brasil**. Brasília, 1ª ed, p. 36, 2010.
- BRASIL. **Controle da Malária**. 1. ed. Brasília, 2009
- BRASIL. **Manual for surveillance of cutaneous leishmaniasis**. Brasília, 1ªed, p.189, 2017a.
- BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília, v. 3, 2017 b.
- FIGUEIREDO, P. DE P. Situação fundiária do município de Presidente Figueiredo- AM. p. 16, 1998.
- FLORES-MENDOZA, C.; CUNHA, R. A.; ROCHA, D. S. * Blood-meal sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera : Culicidae) in a South-eastern State of Brazil. **Rev. Saude Publica** v. 30, n. 2, p. 129–134, 1996.
- GUIMARAES, M. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectivas Online**, v. 2, n. 7, p. 122–129, 2008.
- KANO, F. S. et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 8, p. 989–1000, 2012.
- KOSTALOVA, T. et al. The recombinant protein rSP03B is a valid antigen for screening dog exposure to *Phlebotomus perniciosus* across foci of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 88–93, 2017.
- MENDES-SOUSA, A. F. et al. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2013.
- OTRANTO, D. et al. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Tropica**, v. 113, n. 1, p. 80–83, 2010.
- PAULY, D. et al. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, v. i, n. 51, p. 2–7, 2011.
- RAMOS, W. R. et al. Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Acta Tropica**, v. 139, p. 44–52, 2014.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**, v. 32, n. 92, p. 463–78, 1987.
- SADIA-KACOU, C. A. M. et al. Use of *Anopheles* salivary biomarker to assess seasonal variation of human exposure to *Anopheles* bites in children living near rubber and oil palm cultivations in Côte d'Ivoire. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 5, p. e00102, 2019.
- SCHWARZ, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: Development of a

recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. e532, 2009b.

SILVA, R. DE O. E et al. Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmaniasis vector presence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. e20180415, p. 1–5, 2019.

SOARES, B. R. et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

SOUZA, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e649, 2010.

VLKOVA, M. et al. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011.

WHO/PAHO. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

WHO. World malaria report 2018. Geneva, **World Health Organization**, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

WHO PRESS. **Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual**. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO].

DISCUSSÃO

A revisão sistemática dos trabalhos sobre o uso de proteínas salivares como biomarcadores de exposição aos vetores de leishmaniose e malária apresentou vários hospedeiros com resposta humoral às picadas dos vetores. Demonstrando assim, que humanos (CARVALHO et al., 2017; MARZOUKI et al., 2015; MONDRAGON-SHEM et al., 2015; SOUZA et al., 2010), gatos (PEREIRA et al., 2019), cães (DRAHOTA et al., 2014; VLKOVA et al., 2011), cabras (SIMA et al., 2016) e galinhas (SILVA et al., 2019; SOARES et al., 2013) podem ser usados como hospedeiros sentinelas para a presença de flebotomíneo na localidade. Os artigos sobre anofelinos apresentaram o ser humano como hospedeiro (POINSIGNON et al., 2009; RIZZO et al., 2011; SADIA-KACOU et al., 2019; TRAORÉ et al., 2018, 2019).

Após dados demonstrando que as galinhas podem ser utilizadas como animais sentinelas para Doença do Nilo Ocidental (TREVEJO; REEVES, 2005), Doença do Lyme (SCHWARZ et al., 2009b, 2009a), e para Leishmaniose Visceral (SOARES et al., 2013), estudos foram realizados para testar a hipótese que ovos de galinhas podiam ser usados como ferramenta de vigilância para Leishmaniose Tegumentar Americana e Malária. Os resultados apresentaram altos níveis de anticorpos contra as proteínas salivares de *Anopheles aquasalis*, *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* no ovo logo após a primeira imunização.

Quando analisou a reatividade cruzada para as espécies de flebotomíneos observou baixa produção de anticorpos, pois os flebotomíneos compartilham proteínas salivares entre as espécies (LESTINOVA et al., 2017). Ao analisar a resposta ao anofelino não obteve-se níveis significantes de anticorpos, determinando que a resposta ao antígeno é específica.

Diferente dos achados de Jaleta et al (2016) na Etiópia para *Anopheles arabiensis*, os anofelinos, *Anopheles aquasalis*, em nosso experimento se alimentaram de sangue de galinhas, obtivendo produção de anticorpos contra as glândulas salivares desses mosquitos. Moreno et al (2017) também demonstraram que as fêmeas de *Anopheles darlingi* utilizavam galinhas como hospedeiros de alimentação (JALETA et al., 2016; MORENO et al., 2017).

Após demonstrar a capacidade de produção de anticorpos contra antígenos salivares por galinhas expostas experimentalmente ao repasto controlado, testou-se em campo essa hipótese. Na área endêmica, Rio Pardo, Presidente Figueiredo- Amazonas, coletou-se 85 ovos e analisou-se a resposta às salivas de *A. aquasalis*, *M. migonei* e *L. longipalpis*. Verificou a produção de

altos níveis de anticorpos. Com esse resultado estudou a resposta dos ovos contra antígenos dos protozoários *Plasmodium* e *Leishmania*.

Os ramais da comunidade que apresentaram altos níveis de anticorpos anti-saliva também obtiveram altos níveis de *anti-Plasmodium* e *anti-Leishmania*. Portanto, a resposta dos anticorpos contra as proteínas salivares pode ser usada como marcador de exposição aos vetores de leishmaniose e malária e a as proteínas dos *Plasmodium* e *Leishmania* podem sugerir risco de transmissão em áreas endêmicas.

CONCLUSÃO

Galinhas são animais frequentemente encontrados em ambientes peridomiciliares e apresentam resposta humoral específica à antígenos salivares de insetos e proteínas de parasitas.

- Demonstrou-se que as proteínas salivares de vetores de leishmaniose e malária são potenciais marcadores de exposição aos vetores, pois as galinhas expostas experimentalmente a picadas de insetos produziram altos níveis de anticorpos tanto no soro quanto no ovo.
- A resposta é específica para a proteína utilizada como antígeno, dessa forma, o modelo produzido anticorpo-proteína é uma ferramenta importante para vigilância epidemiológica.
- As galinhas expostas naturalmente à picadas dos insetos produziram altos níveis de anticorpos em ovo.
- As galinhas também foram capazes de produzir anticorpos contra antígenos de *Leishmania* e *Plasmodium* determinando que o projeto proposto pode ser usado também para detecção direta de leishmaniose e malária na região endêmica.
- Galinhas poderiam ser usadas como animais sentinelas em áreas de risco de transmissão de *Leishmania* e *Plasmodium*.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, A. M. et al. Seroconversion to *Lutzomyia intermedia* LinB-13 as a biomarker for developing cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 3149, 2017.
- DRAHOTA, J. et al. Recombinant Antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 45, 2014.
- JALETA, K. T. et al. Chicken volatiles repel host-seeking malaria mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.
- LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania* **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.
- MARZOUKI, S. et al. Validation of recombinant salivary protein PpSP32 as a suitable marker of human exposure to *Phlebotomus papatasi*, the vector of *Leishmania major* in Tunisia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2015.
- MONDRAGON-SHEM, K. et al. Severity of old world cutaneous leishmaniasis influenced by previous exposure to sandfly bites in Saudi Arabia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–14, 2015.
- MORENO, M. et al. Intensive trapping of blood-fed *Anopheles darlingi* in Amazonian Peru reveals unexpectedly high proportions of avian blood-meals. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–19, 2017.
- PEREIRA, A. et al. Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.
- POINSIGNON, A. et al. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2009.
- RIZZO, C. et al. Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: A serological indicator of exposure to afrotropical malaria vectors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
- SADIA-KACOU, C. A. M. et al. Use of *Anopheles* salivary biomarker to assess seasonal variation of human exposure to *Anopheles* bites in children living near rubber and oil palm cultivations in Côte d'Ivoire. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 5, p. e00102, 2019.
- SCHWARZ, A. et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: Development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. e532, 2009a.
- SCHWARZ, A. et al. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 1021–1029, 2009b.
- SILVA, R. DE O. E et al. Chicken eggs as a surveillance tool for malaria and leishmaniasis vector presence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. e20180415, p. 1–5, 2019.

SIMA, M. et al. Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004553, 2016.

SOARES, B. R. et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

SOUZA, A. P. et al. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e649, 2010.

TRAORÉ, D. F. et al. Evaluation of malaria urban risk using an immuno-epidemiological biomarker of human exposure to anopheles bites. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1353–1359, 2018.

TRAORÉ, D. F. et al. Exploring the heterogeneity of human exposure to malaria vectors in an urban setting, Bouaké, Côte d'Ivoire, using an immuno-epidemiological biomarker. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.

TREVEJO, R. T.; REEVES, W. C. Antibody response to *Culex tarsalis* salivary gland antigens among sentinel chickens in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 481–487, 2005.

VLKOVA, M. et al. Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011.

ANEXOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1-Fluxograma de atividades

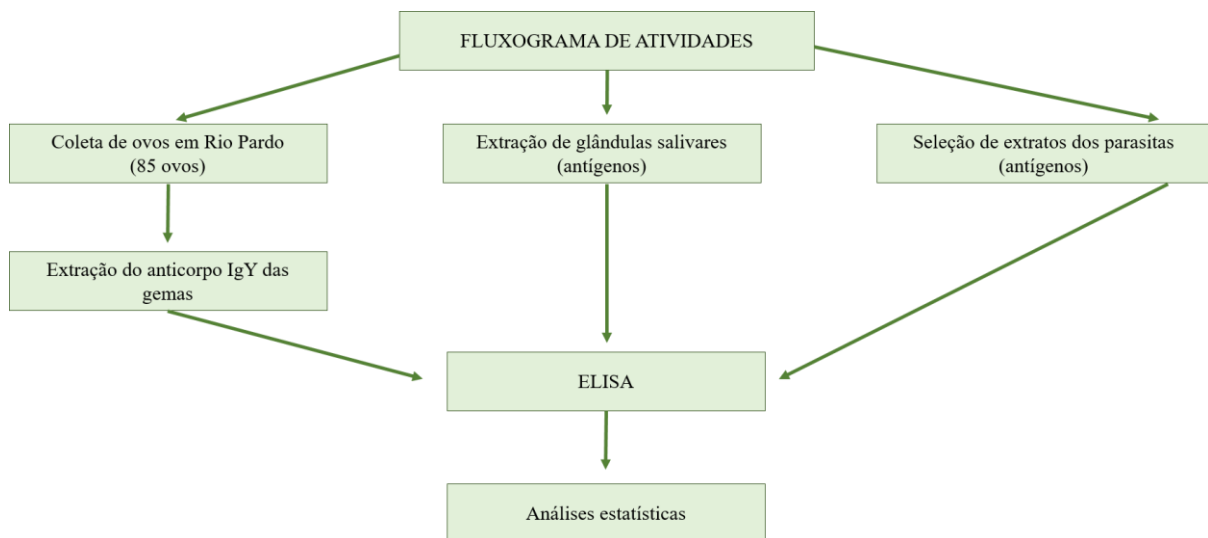


Figura 1. Fluxograma de atividades desenvolvidas.

2. Assentamento Rio Pardo

O Assentamento foi criado em 1996 pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA, Portaria número 274/96), possui uma área de 27.980 hectares. A comunidade limita com Reserva Indígena Waimiri Atroari e com o assentamento Canoas, assim como com terras privadas ou da União, a maioria florestada. O assentamento está estruturado em seis ramais denominados Principal, Gusmão, Terra Preta, Novo Paraíso, Taxista e Samuel (FIGUEIREDO, 1998).

De acordo com o último censo, realizado em 2015 pelo Instituto Leônidas e Maria Deane, atualmente há 584 moradores, e 174 famílias. No Ramal Samuel há localizado um laboratório de Pesquisas Avançadas do Rio Pardo do Instituto Leônidas e Maria Deane, que é uma base permanente de trabalho em campo.

Devido a distribuição da comunidade por ramais, determinou-se que os pontos amostrais seguiriam a estrutura do assentamento, concentrando-se em casas próximas dos pontos de coletas de flebotômios adquiridos em estudos anteriores. Em projetos prévios de captura de flebotômios em áreas peridomiciliares, borda de floresta e floresta, o grupo de pesquisa foi capaz

de delimitar os pontos com abundância de flebotomíneo, portanto, o projeto atual utilizou os dados das localizações das casas com galinheiros em peridomicílio para coletar os ovos. Coletou-se de uma a três amostras, de acordo, com a disponibilidade de ovos na localização, obtendo 85 ovos em 29 pontos amostrais nos seis ramais da comunidade.

No mapa a seguir observa-se em rosa o Assentamento Rio Pardo e em vermelho os pontos de coleta:

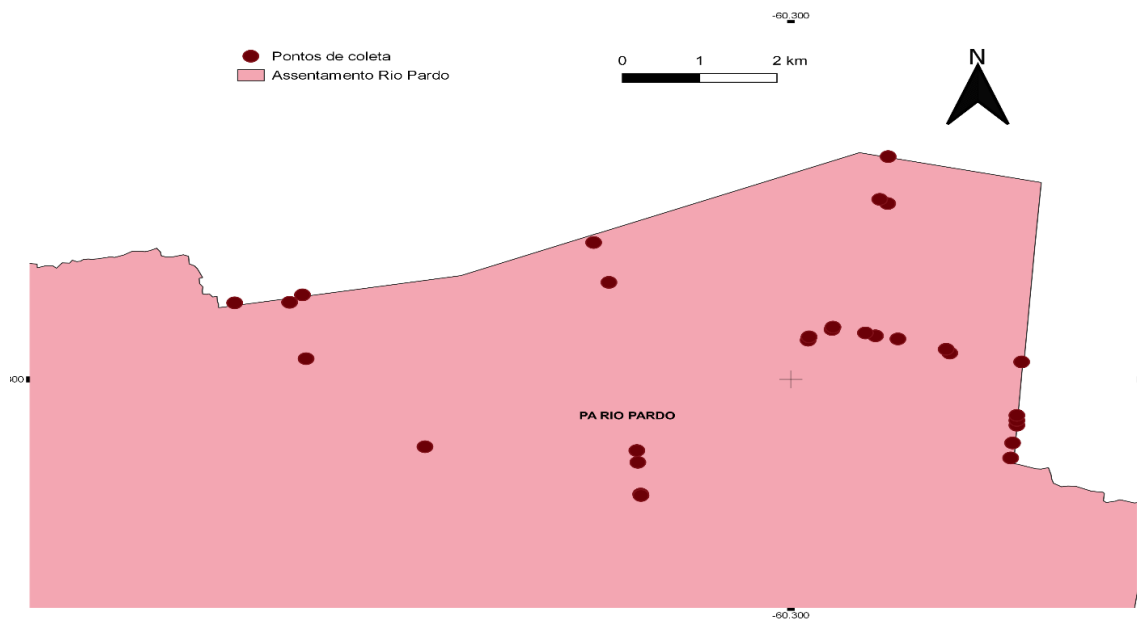


Figura 2. Mapa do Assentamento Rio Pardo, Município Presidente Figueiredo- Amazonas, 2019. 1 mapa: 16X09 cm. Escala: 2 km.

3. Glândulas Salivares



Figura 5. Glândulas salivares de *Migonemyia migonei* após dissecção.