

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise do polimorfismo do gene que codifica a proteína salivar SP15 em
três populações do Oriente Médio de *Phlebotomus papatasi* (Diptera:
Psychodidae), vetor da *Leishmania major***

CARLOS ALBERTO SANTIAGO FIGUEIRÊDO JÚNIOR

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise do polimorfismo do gene que codifica a proteína salivar SP15 em
três populações do Oriente Médio de *Phlebotomus papatasi* (Diptera:
Psychodidae), vetor da *Leishmania major***

CARLOS ALBERTO SANTIAGO FIGUEIRÊDO JÚNIOR

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética da Universidade
Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do grau
de Mestre em Genética pela
UFPE

Orientador: Dr. VALDIR DE QUEIROZ BALBINO

Co-orientador: Dr. JOSÉ MARCELO RAMALHO ORTIGÃO

**RECIFE
2010**

Figueirêdo Júnior, Carlos Alberto Santiago

Análise do polimorfismo do gene que codifica a proteína salivar SP15 em três populações do Oriente Médio de *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania major* / Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior. – Recife: O Autor, 2010.

80 folhas : fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Genética, 2010.

Inclui bibliografia.

**1. Genética – Oriente Médio 2. Variação (Biologia) 3. Proteínas
I. Leishmaniose I. Título.**

576.54

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 081

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA**

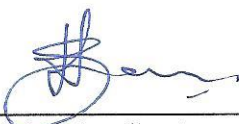
**Parecer da comissão examinadora da tese de:
Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior**

intitulada:

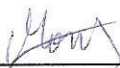
Análise do polimorfismo do gene que codifica a proteína salivar SP15 em três populações do Oriente Médio de *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania major*

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
Aprovado**

**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior faz jus ao grau de Mestre em Genética pela UFPE. Recife,
01/03/2010**



**1º Examinador: Dr. José Ferreira dos Santos
(Depto. Genética/UFPE)**



**2º Examinador: Dr. Martín Alejandro Montes
(Depto. Biología/UFRPE)**



**3º Examinador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
(CPqAM/FIOCRUZ)**



**Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino
(Depto. Genética/UFPE)**



**Co-orientador: Dr. José Marcelo Ramalho Ortigão
(Kansas State University, EUA)**



**Coordenador: Dr. Antonio Carlos de Freitas
(Depto. Genética/UFPE)**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por permitir as realizações dos meus sonhos, e por idealizar as forças evolutivas que regem a vida no nosso planeta.

À minha família, especialmente aos meus pais: Carlos e Gilvanete por todo o amor, carinho e educação com que me criaram; à minhas irmãs Catharinna e Cammilla pelo apoio e companheirismo que sempre me propiciaram; à minha amada Renata pelo incentivo irrestrito, conforto nas horas difíceis e felicidades em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Valdir de Queiroz Balbino pelos ensinamentos, conselhos, por permitir o meu crescimento acadêmico e acima de tudo pela sincera amizade.

Ao Dr. Marcelo Ramalho Ortigão que, mesmo sem me conhecer pessoalmente, ofereceu-me a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos sobre a genética de *Phlebotomus papatasi*.

Aos meus amigos do LABBE pelos momentos descontraídos e aprendizados vividos tanto dentro do laboratório como fora dele, assim como pela contribuição do meu crescimento acadêmico.

A todos do LGMH pelo acolhimento e suporte técnico oferecido aos membros do LABBE.

Agradeço aos colegas da turma de mestrado pelo compartilhamento de momentos felizes ao longo deste período.

Aos amigos da época de graduação: Alexandra, Plínio e Wellington por me mostrar que a verdadeira amizade persiste ao longo dos tempos.

Aos coordenadores e membros do curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por trabalhar em prol da melhoria do programa.

Muito obrigado a todos!

Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.

Theodosius Dobzhansky

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	vi
1. Revisão da Literatura	1
1.1. Leishmanioses	1
1.1.1. Leishmaniose cutânea	3
1.1.2. Leishmaniose visceral	4
1.2. Gênero <i>Leishmania</i>	6
1.2.1 <i>Leishmania major</i>	8
1.3. Flebotomíneos	9
1.3.1 Ciclo de vida dos flebotomíneos	10
1.3.2 <i>Phlebotomus papatasi</i>	13
1.4 Proteínas salivares	14
1.4.1 Proteína salivar SP15	18
1.4.2 Polimorfismo dos genes que codificam proteínas salivares	19
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Flebotomíneos	22
3.1.1. Coleta	22
3.1.2 Preparação das amostras	24
3.2. Métodos moleculares	24
3.2.1. Isolamento de RNA total	24
3.2.2 Amplificação de DNA	25
3.2.3 Sequenciamento	25

3.3 Análises das sequências	26
3.3.1 Genética de populações	26
3.3.2 Estrutura secundária	27
3.3.3 Predição de epítomos de células T	27
4. Resultados	29
4.1. Variabilidade genética	29
4.2. Estrutura secundária	53
4.3 Predições dos epítomos	56
5. Discussão	63
6. Conclusões	69
7. Referências Bibliográficas	70
8. Memorial do aluno	80

Lista de abreviaturas

A	Alanina
AMP	Adenosina monofosfato
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
D	Aspartato
DNA	Deoxyribonucleic acid - Ácido Desoxirribonucléico
DTH	Delayed-type hypersensitivity - Hipersensibilidade do tipo retardada
Eta (η)	Número total de mutações
F	Fenilalanina
F _{st}	Índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade nucleotídica
G _{st}	Índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade haplotípica
Hd	Diversidade haplotípica
HLA	Human leukocyte antigen - Antígeno leucocitário humano
Hs	Média ponderada das diversidades haplotípicas entre populações
I	Isoleucina
ITS2	Internal transcribed spacer 2 - Espaçador interno transcrito 2
Ks	Média das diferenças de nucleotídeos entre as sequências de cada população
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Metionina
MHC	Major histocompatibility complex - Complexo principal de histocompatibilidade
MP	Matriz peritrófica
N _{st}	Índice de fixação de polimorfismo com correção de Jukes & Cantor
P1	Resíduo âncora do peptídeo
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi (π)	Diversidade nucleotídica
Pi (π) JC	Diversidade nucleotídica com correção de Jukes & Cantor
Q	Glutamina
RNA	Ribonucleic acid - Ácido ribonucléico
S	Sítios segregantes
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SGH	Salivary gland homogenates - Homogenatos de glândulas salivares
T	Treonina
Theta (θ)	Taxa de mutação populacional
V	Valina
W	Triptofano
WHO	World health organization – Organização mundial de saúde
Y	Tirosina

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1: Distribuição das leishmanioses cutâneas no mundo. As regiões em vermelho indicam as áreas hiperendêmicas de leishmaniose cutânea. (Fonte: Organização Mundial de Saúde em http://www.who.ch/tdr). Acesso em 10/09/2009.	2
Figura 2: Distribuição da leishmaniose visceral no mundo. As regiões em vermelho indicam as áreas hiperendêmicas de leishmaniose visceral. (Fonte: Organização Mundial de Saúde em http://www.who.ch/tdr). Acesso em 10/09/2009.	6
Figura 3: Formas promastigota (a) e amastigota (b) de <i>Leishmania</i> . (Fonte: Organização Mundial de Saúde em http://www.who.int). Acesso em 12/09/2009.	8
Figura 4: Formas evolutivas de flebotomíneos. (a) larva; (b) pupas; (c) fêmea adulta. Fonte: OMS (http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library). Acesso em 14/09/2009.	11
Figura 5: Mapa do Oriente Médio indicando os locais de coleta de <i>Phlebotomus papatasi</i> utilizados neste trabalho. Os pontos em vermelho, verde e azul indicam Bahrif, Om Shihan e Sweima, respectivamente. (Fonte: Wikipedia em http://pt.wikipedia.org). Acesso em 17/09/2009.	23
Figura 6: Representação gráfica dos sítios variáveis do gene SP15 de <i>Phlebotomus papatasi</i> das populações do Egito, Sinai do Norte e Jordânia. O tamanho de cada nucleotídeo é proporcional à sua frequência para os determinados sítios.	39
Figura 7: Estrutura secundária predita da sequência de aminoácidos da proteína SP15 de <i>Phlebotomus papatasi</i> . Os cilindros verdes indicam regiões de alfa-hélice e as setas amarelas representam folhas beta-pregueada. As siglas C, H e E indicam as regiões de alças, alfa-hélice e folhas beta-pregueada, respectivamente.	54
Figura 8: O posicionamento dos sítios variáveis dentro da estrutura secundária da proteína SP15 de <i>Phlebotomus papatasi</i> . Os retângulos amarelos referem-se às regiões de alfa-hélice, os cinzas às de folha beta-pregueada e as letras sublinhadas correspondem aos sítios variáveis.	55
Figura 9: Sequências de aminoácidos da proteína SP15 de <i>Phlebotomus papatasi</i> indicando possíveis epítomos de ligação aos 51 tipos de HLA. Os aminoácidos em vermelho indicam o resíduo âncora, os aminoácidos em azul representam os epítomos e os aminoácidos delineados representam os sítios variáveis.	62

Lista de Tabelas

Tabela		Página
Tabela 1:	Distribuição dos haplótipos de SP15 e suas frequências observadas nas populações de <i>Phlebotomus papatasi</i> do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.	30
Tabela 2:	Distribuição dos peptídeos SP15 e suas frequências observadas nas populações de <i>Phlebotomus papatasi</i> do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.	36
Tabela 3:	Dados gerais sobre a diversidade genética do marcador SP15 de populações de <i>Phlebotomus papatasi</i> do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.	45
Tabela 4:	Índices de diferenciação genética entre as populações de <i>Phlebotomus papatasi</i> do Egito, Sinai do Norte e Jordânia; estimados a partir do gene SP15. Os índices Hs, Ks, Gst, Nst, Fst, Dxy e Da significam: Média ponderada das diversidades haplotípicas entre populações, média das diferenças de nucleotídeos entre as sequências de cada população, índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade haplotípica, índice de fixação de polimorfismo com correção de Jukes & Cantor, índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade nucleotídica, média numérica de substituições de nucleotídeos por sítio entre populações e número líquido de substituições de nucleotídeos por sítio entre populações, respectivamente.	51
Tabela 5:	Índices de divergência genética entre as populações de <i>Phlebotomus papatasi</i> do Egito, Sinai do Norte e Jordânia; estimados a partir do gene SP15.	52

Resumo

As proteínas presentes na saliva dos flebotomíneos possuem uma grande importância na proteção contra parasitas do gênero *Leishmania*. Uma das proteínas identificadas, denominada de SP15, demonstrou ser responsável pela proteção contra a progressão da doença e aumento do tamanho da lesão em modelos animais. A elaboração de vacinas de múltiplos componentes com proteínas salivares pode ser uma forma viável para o desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania*. Partindo desta estratégia adotada para elaboração de vacinas, é necessário entender a variabilidade dos genes que codificam proteínas salivares e suas implicações nas respostas imunes dos humanos. Neste trabalho, investigamos a variabilidade genética de SP15 de populações naturais de *Phlebotomus papatasi* do Oriente Médio. Adicionalmente, associamos a variabilidade genética observada com a predição da estrutura secundária da proteína e possíveis epítomos de ligação a MHC classe II. Os resultados obtidos indicaram um baixo nível de variabilidade genética entre as populações oriundas do Oriente Médio, apesar da ocorrência de um grande número de haplótipos, onde alguns deles são compartilhados entre as populações distintas. Em conjunto, estas observações evidenciam a existência de fluxo gênico ou retenção de polimorfismo ancestral entre as populações e a ausência da seleção purificadora atuando sobre este gene. Para os preditos epítomos de MHC classe II, muitos foram identificados como possuindo sítios de mutação, mas pelo menos três epítomos identificados não apresentaram qualquer tipo de mutação, sugerindo que esta molécula apresenta-se moderadamente conservada e deve induzir respostas imunes uniformes nos humanos.

Palavras-chave: *Phlebotomus papatasi*, *Leishmania major* e SP15.

Abstract

The proteins present in the saliva of sandflies have a great importance in protection against parasites of the genus *Leishmania*. One of the proteins identified, called SP15, was shown to be responsible for protection against the disease progression and lesion size increase in animal models. The development of multi-component vaccines with salivary proteins may be a feasible way for the improvement of vaccines against *Leishmania*. Based on this strategy adopted for development of vaccines, it is necessary to understand the variability of genes encoding salivary proteins and their implications for immune responses in humans. Here we investigated the genetic variability of SP15 in natural populations of *Phlebotomus papatasi* of the Middle East. Additionally, we associated the genetic variability observed with the prediction of protein secondary structure and possible epitopes that binds to MHC class II. The results indicated a low level of genetic variability between populations derived from the Middle East, despite the occurrence of a large number of haplotypes, where some of them are shared among different populations. All together, these observations demonstrate the existence of gene flow or retention of ancestral polymorphism between those populations and the absence of purifying selection acting on this gene. For the predicted epitopes of MHC class II, many of them were identified as having mutation sites, but at least three identified epitopes did not show any mutation, suggesting that this molecule is moderately conserved and should induce uniform immune responses in humans.

Key-words: *Phlebotomus papatasi*, *Leishmania major* e SP15.

Introdução

As leishmanioses são doenças parasitárias com uma ampla gama de manifestações clínicas, representando um importante problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Apresentam como agentes etiológicos parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por dípteros flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo).

As leishmanioses são endêmicas em pelo menos 88 países, estando disseminadas em todos os continentes, com exceção da Austrália e da Antártida, acometendo cerca de 12 milhões de pessoas. A incidência anual é estimada entre 1,5 e 2,0 milhões de novos casos, provenientes dos cerca de 350 milhões de indivíduos que se encontram em situação de risco. Com base na sintomatologia apresentada pelos pacientes, podem ser classificadas em pelo menos quatro formas principais: cutânea, cutâneo-difusa; mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea causada pela *Le. major* é encontrada em todo o Velho Mundo, incluindo o Oriente Médio e a África Ocidental. *P. papatasi* é o principal vetor deste parasita, que se mostra refratário ao desenvolvimento de outras espécies de *Leishmania*.

Os flebotomíneos apresentam peças bucais cortantes, capazes de lacerar a pele do hospedeiro, induzindo o surgimento de pequenas hemorragias nos capilares superficiais nas quais eles se alimentam. Durante o repasto sanguíneo, os insetos injetam saliva nos tecidos do hospedeiro. Nela são encontrados dezenas de compostos salivares farmacologicamente ativos, evitando a hemóstase e assim facilitando o processo de obtenção de sangue. Alguns dos componentes salivares parecem interferir no curso da infecção do parasita no hospedeiro vertebrado. Dentre estas proteínas destaca-se a proteína SP15, descrita para *Phlebotomus papatasi* e que parece induzir respostas de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) Th1 além da produção de

anticorpos. Estudos demonstraram que a resposta imune dos hospedeiros vertebrados contra a proteína SP15 parece conferir um tipo de resposta eficiente contra a infecção de *Le. major*.

A variabilidade genética das proteínas salivares ainda é pouco estudada, tornando-se necessária a compreensão do nível de polimorfismo destas moléculas como uma etapa da produção do conhecimento sobre o problema estudado. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo inicial avaliar o nível de variabilidade genética do gene que codifica a proteína salivar SP15 de *P. papatasi* de diferentes regiões, visando à geração de informações básicas que sirvam de suporte para a elaboração de uma vacina anti-*Leishmania*.

1. Revisão da Literatura

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias com uma ampla gama de manifestações clínicas, representando um importante problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do globo (WHO, 2007). Apresentam como agentes etiológicos parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos aos seres humanos e outros animais por dípteros flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Desjeux, 2004).

As leishmanioses são endêmicas em pelo menos 88 países, estando disseminadas em todos os continentes (com exceção da Austrália e da Antártida), nos quais acometem cerca de 12 milhões de pessoas. A incidência anual destas doenças é estimada entre 1,5 e 2,0 milhões de novos casos, provenientes dos 350 milhões de indivíduos que se encontram em situação de risco. Estas endemias têm maior frequência nas Américas do Sul e Central, assim como na África Oriental, Índia, China e Sudeste da Ásia. Estima-se que 500 mil novos casos surjam a cada ano (WHO, 2007). No entanto, estes números devem representar apenas uma subestimativa do número real de casos, devido à existência de vários fatores que limitam a notificação dos casos nos países subdesenvolvidos (WHO, 2007).

As leishmanioses apresentam uma notável complexidade epidemiológica, em função da grande variedade de espécies de agentes etiológicos, hospedeiros reservatórios e de vetores envolvidos. Estima-se que por volta das 400 espécies de flebotomíneos, aproximadamente 50 são implicados na transmissão de cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas aos seres humanos (Kamhawi, 2006). De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser divididas em dois tipos

principais: tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar apresenta quatro variantes clinicamente distintas: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose dermal pós-calazar (Piscopo & Mallia, 2006). A leishmaniose cutânea apresenta 90% (Figura 1) da sua representatividade em países como Afeganistão, Irã, Arábia Saudita, República Árabe da Síria, Brasil e Peru (WHO, 2007).

Figura 1: Distribuição das leishmanioses cutâneas no mundo. As regiões em vermelho indicam as áreas hiperendêmicas de leishmaniose cutânea. (Fonte: Organização Mundial de Saúde em <http://www.who.ch/tdr>). Acesso em 10/09/2009.

estado imunológico do hospedeiro, após a cura. Segundo Ashford (2000), o termo hospedeiro só deve ser utilizado nos casos onde o organismo infectado mantém o parasito indefinidamente. Os seres humanos geralmente não desempenham um papel importante como reservatórios das *Leishmania*, sendo considerados hospedeiros eventuais destes organismos (Besteiro *et al.*, 2007).

Durante muito tempo, o impacto das leishmanioses na saúde pública foi subestimado. Nos últimos anos, no entanto, tornou-se claro que a prevalência destas endemias é muito mais elevada do que se supunha anteriormente, em decorrência tanto do aumento do número de casos, quanto da expansão das áreas endêmicas (WHO, 2007). Segundo Desjeux (2004), o crescimento do número de casos das leishmanioses, encontra-se diretamente relacionado a fatores comportamentais, ambientais e econômicos. Apesar de ser uma doença grave e de grande distribuição geográfica, os tratamentos disponíveis (antimonial pentavalente, antimoniato meglumina, stibogluconato de sódio e anfotericina B) nem sempre apresentam eficiência contra as leishmanioses, sendo que as tentativas realizadas até agora com o intuito de produzir uma vacina eficiente não tiveram êxito (Guerin *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2004).

1.1.1. Leishmaniose Cutânea

A leishmaniose cutânea deve atingir cerca de 1,5 milhões de casos a cada ano, sendo que apenas a minoria destes casos é oficialmente registrada (WHO, 2007). Nas áreas endêmicas, a doença ocorre principalmente entre crianças e adolescentes. Entre as pessoas que vivem próximas às áreas de transmissão, no entanto, a prevalência é maior entre os adultos, que entram nos focos por conta de atividades profissionais [e.g. desmatamento, atividades agrícolas, construção de estradas, etc.] (Piscopo & Mallia, 2006).

A leishmaniose cutânea envolve um amplo espectro de padrões de intensidade e de manifestação da doença. As infecções cutâneas podem permanecer subclínicas ou se tornarem clinicamente aparentes, após um período de incubação bastante variável (Almeida *et al.*, 2007). Alguns pacientes têm mais do que uma lesão primária, localizadas nas proximidades do local da picada do inseto. As lesões podem permanecer relativamente secas, com uma crosta central (forma seca) ou podem exudar material soropurulento (Desjeux, 2004). Estas lesões apresentam tendência à cura espontânea e apresentam boa resposta ao tratamento, podendo vir acompanhadas de adenopatia regional, linfagite ascendente e ulceração de alguns nódulos (Piscopo & Mallia, 2006).

A leishmaniose cutânea-difusa é uma manifestação bastante rara, estando geralmente associada a pacientes com deficiências específicas na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se como uma lesão única, não responsiva ao tratamento e evolui através da formação de placas infiltradas e nodulações que recobrem grandes extensões cutâneas (Desjeux, 2004). A leishmaniose muco-cutânea, por sua vez, é geralmente causada por parasitas do subgênero *Viannia*, resultando da disseminação linfática ou hematogênica de amastigotas da pele para a mucosa nasoro-faríngea. As lesões mucosas metastásicas têm um desenvolvimento lento e progressivo, principalmente nas cavidades oral e nasal. Em alguns casos torna-se evidente, anos após a cura aparente da lesão inicial (Almeida *et al.*, 2007).

1.1.2. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, apresentando elevados índices de mortalidade em pacientes não submetidos ao tratamento. Do ponto de vista clínico, a leishmaniose visceral pode ser subdividida em cinco tipos principais: indiano; chinês; mediterrâneo; africano e neotropical (Wilson *et al.*, 2005). O agente

etiológico da leishmaniose visceral no Novo Mundo e no Velho Mundo são a *L. chagasi* e *L. infantum*, respectivamente, transmitidas ao homem através das fêmeas hematófagas de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus* sp. respectivamente.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 2007), são registrados anualmente cerca de 100 mil casos de leishmaniose visceral em todo o mundo, sendo 90% deste total registrados em países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Figura 2). O período de incubação da leishmaniose visceral é altamente variável, indo de dez dias a um ano, após o primeiro contato do hospedeiro com o parasito. Os sintomas mais comuns consistem de surtos irregulares de febre, anemia, hepato-esplenomegalia, caquexia, linfadenopatia e diarreia. Contudo, nem sempre estes sintomas são observados simultaneamente, dificultando o estabelecimento de um diagnóstico preciso da doença. A demora no diagnóstico pode resultar num quadro clínico complexo e de difícil reversão, resultando numa taxa de mortalidade elevada. No entanto, existem evidências mostrando que, em algumas situações, indivíduos infectados podem não manifestar os sintomas clássicos da leishmaniose visceral, havendo uma tendência para a reversão espontânea do quadro clínico (Wilson *et al.*, 2005).

Assim como várias outras doenças infecciosas, a leishmaniose visceral se encontra diretamente relacionada ao nível de desenvolvimento econômico e social das áreas endêmicas. De uma forma geral, verifica-se que a leishmaniose visceral é mais comum entre as pessoas de baixa renda, desnutridas, com menos de 15 anos de idade e que residem na zona rural ou nas áreas periféricas das cidades, onde as condições de higiene e saneamento são bastante precárias (Alvar *et al.*, 2006).



Figura 2: Distribuição da leishmaniose visceral no mundo. As regiões em vermelho indicam as áreas hiperendêmicas de leishmaniose visceral. (Fonte: Organização Mundial de Saúde em <http://www.who.ch/tdr>). Acesso em 10/09/2009.

1.2. Gênero *Leishmania*

As leishmanias (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*) são parasitas protozoários com um ciclo de vida complexo (Figura 3), envolvendo diversas formas de desenvolvimento. Estas formas representam uma adaptação às mudanças nas condições ambientais encontradas pelos parasitas dentro dos hospedeiros vertebrados e dos insetos vetores (Besteiro *et al.*, 2007).

Nos flebotomíneos, as leishmanias são células flageladas móveis conhecidas como promastigota que se replicam no meio extracelular e residem no trato alimentar do inseto. Duas formas principais podem ser distinguidas, embora muitas outras formas intermediárias tenham sido reportadas (Bates *et al.*, 2004): (1) promastigotas procíclicos, que sofrem divisão mas não infectam mamíferos, estando presentes no intestino dos insetos; (2) promastigotas metacíclicos que não se dividem, mas infectam

mamíferos, estando presentes na porção torácica do trato digestivo e probóscide dos flebotomíneos. Os promastigotas metacíclicos quando inoculados dentro de um hospedeiro vertebrado através da picada de flebotomíneos, diferencia-se (após ser fagocitado por um macrófago) em uma forma amastigota aflagelada. Esta forma do parasita reside dentro de um vacúolo com características lisossomais, que é chamado de vacúolo parasitóforo (Besteiro *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao ciclo de vida da *Leishmania* nos flebotomíneos, o intestino torna-se um órgão de grande importância. Após a ingestão de sangue contaminado, os parasitas situados no intestino induzem a formação da matriz peritrófica (MP). A MP confere proteção para os parasitas contra as enzimas digestivas do vetor, é dentro da MP que a *Leishmania* prolifera e diferencia-se no seu primeiro estágio. Após a degradação da MP a forma promastigota procíclica é liberada no intestino e se adere ao epitélio do intestino através de moléculas lipofosfoglicanas (LPG) presentes em sua superfície, impedindo de serem expulsas do corpo do vetor junto com as fezes. Após esta fase as formas promastigotas migram para infectar o tecido das glândulas salivares e se desenvolvem nas formas metacíclicas prontas para infectar os hospedeiros vertebrados (Oliveira *et al.*, 2009).

A estratégia adotada pelos parasitas para sobreviverem às mudanças nas condições ambientais é o desenvolvimento em formas adaptadas e especializadas. Estas formas de desenvolvimento são distinguidas pelas suas necessidades nutricionais, taxas de crescimento, habilidade em dividir-se, a expressão regulada de moléculas da superfície e também pela morfologia. Os promastigotas metacíclicos são diferentes das formas procíclicas, já que a primeira é pré-adaptada para sobreviver nos hospedeiros vertebrados: por exemplo, elas expressam moléculas de superfície estágio-específica. Outras formas, os amastigotas, multiplicam-se dentro do vacúolo parasitóforo nos

macrófagos e são altamente adaptados morfológicamente a este compartimento, como eles são intracelulares apresentam formas não móveis, tamanho reduzido e um flagelo muito reduzido que não emerge da bolsa flagelar. Eles também são acidófilos, adaptados ao pH baixo, apresentando metabolismo energético adaptado (Besteiro *et al.*, 2007).

Alguns fatores, tais como baixo pH, ausência de oxigênio e depleção nutricional de tetrahidrobiopiterina podem desencadear metaciclogênese, assim como condições que mimetizam um ambiente semelhante ao vacúolo parasitóforo, por exemplo: pH, temperatura de 37°C e elevada concentração de CO₂, podem induzir a diferenciação da forma promastigota para a forma amastigota (Barak *et al.*, 2005).

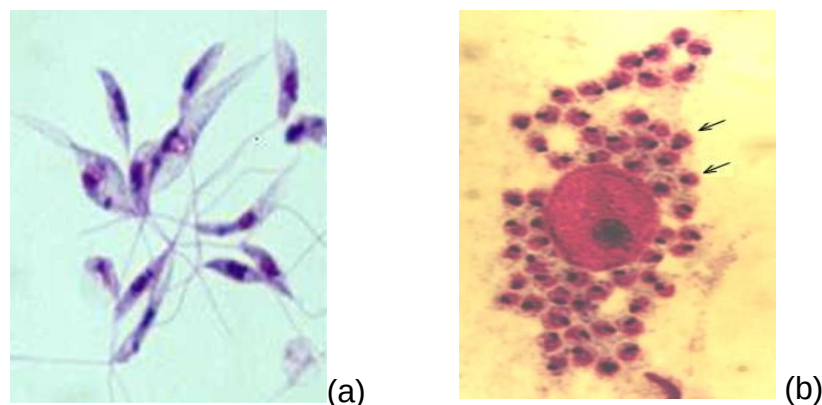


Figura 3: Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania*. (Fonte: Organização Mundial de Saúde em <http://www.who.int>). Acesso em 12/09/2009.

1.2.1. *Leishmania major*

A *L. major* é um dos agentes causadores de leishmaniose cutânea em humanos no Velho Mundo, que se caracteriza por ser uma doença zoonótica e rural, envolvendo diferentes espécies de roedores selvagens como hospedeiros e reservatórios, assim como diferentes espécies de flebotomíneos como vetores, dependendo da localização geográfica onde ocorra (Elfari *et al.*, 2005). Os seres humanos apesar de serem

infectados em grande número, são considerados hospedeiros acidentais não implicados diretamente no ciclo de transmissão (Schlein & Jacobson, 1996).

O parasita e a doença têm uma ampla distribuição geográfica em áreas áridas e semi-áridas da África (Noroeste, Norte, Central subsaariano e Leste), Oriente Médio, Ásia Central e no subcontinente Indiano (Al-Jawabreh *et al.*, 2008). Apesar da sua ampla distribuição geográfica relacionada com uma grande variedade de tipos de animais selvagens como hospedeiros e flebotomíneos vetores, as diferentes cepas de *L. major* isoladas de fontes distintas aparentam ser uniformes sob a óptica de estudos de caracterização das cepas de *Leishmania*. Testes sorológicos têm demonstrado que existem diferenças antigênicas entre as diferentes cepas de *L. major* (Schnur *et al.*, 1990). Apesar das análises realizadas com isoenzimas demonstrarem uma uniformidade eletroforética da enzima, as cepas revelarem perfis variantes evidenciando um grau de subdivisão geográfica (Rioux *et al.*, 1990).

1.3. Flebotomíneos

Os flebotomíneos são pequenos insetos hematófagos da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. Esta sub-família é composta por seis gêneros, três dos quais são característicos do Velho Mundo – *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* – e três são encontrados exclusivamente no Novo Mundo – *Warileyia*, *Brumptomyia* e *Lutzomyia* (Young & Duncan, 1994). Os flebotomíneos são insetos relativamente primitivos, devendo ter surgido no Cretáceo Inferior. A divergência entre os gêneros do Novo e do Velho Mundo deve ter ocorrido há dezenas de milhões de anos, uma vez que ainda não foram encontrados vestígios de espécies que tenham vivido em ambos os hemisférios (Lewis, 1982).

Durante muito tempo, as evidências do papel dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses e da bartonelose eram apenas circunstanciais. Em 1928, a *Bartonella bacilliformis* foi transmitida experimentalmente para uma espécie de macaco, através da picada de flebotomíneos coletados na área onde a doença era endêmica. No que diz respeito às leishmanioses, a primeira publicação sugerindo a transmissão destas doenças através da picada de flebotomíneos surgiu em 1905, num trabalho onde Taussig (*Apud* Herrer & Christense, 1975) identificou espécimes de *Phlebotomus* sp. como prováveis transmissores da *L. major*. O gênero *Phlebotomus* é responsável pela transmissão da leishmaniose na África Ocidental, Sudoeste da Ásia, Oriente Médio e Europa Mediterrânea (Sacks *et al.*, 2001).

Os critérios de inclusão de uma espécie de flebotomíneo na manutenção do ciclo de transmissão das leishmanioses aos seres humanos consistem em dois aspectos fundamentais entre outros: demonstração da antropofilia dos insetos, seguida do isolamento e da identificação sistemática dos mesmos agentes etiológicos, presentes nos vetores e nos pacientes de uma determinada área endêmica (Killick- Kendrick, 1990).

1.3.1. Ciclo de vida dos flebotomíneos

Os flebotomíneos em fase adulta apresentam um comprimento que varia de dois a três milímetros. São holometábolos, assim como os demais dípteros, sendo observados os estágios de ovo, larvas (quatro ínstaes), pupa e adulto, com as formas larvais e adultas diferindo drasticamente entre si (Figura 4). Os flebotomíneos são essencialmente terrestres ao longo de todo o seu ciclo de vida, tornando a identificação dos sítios de reprodução da maioria das espécies bastante complexa. Portanto, a maioria das observações sobre o desenvolvimento e a ecologia das formas imaturas é realizada

em cima da observação do comportamento de espécimes mantidos em colônias laboratoriais (Tesh & Guzman, 1996).

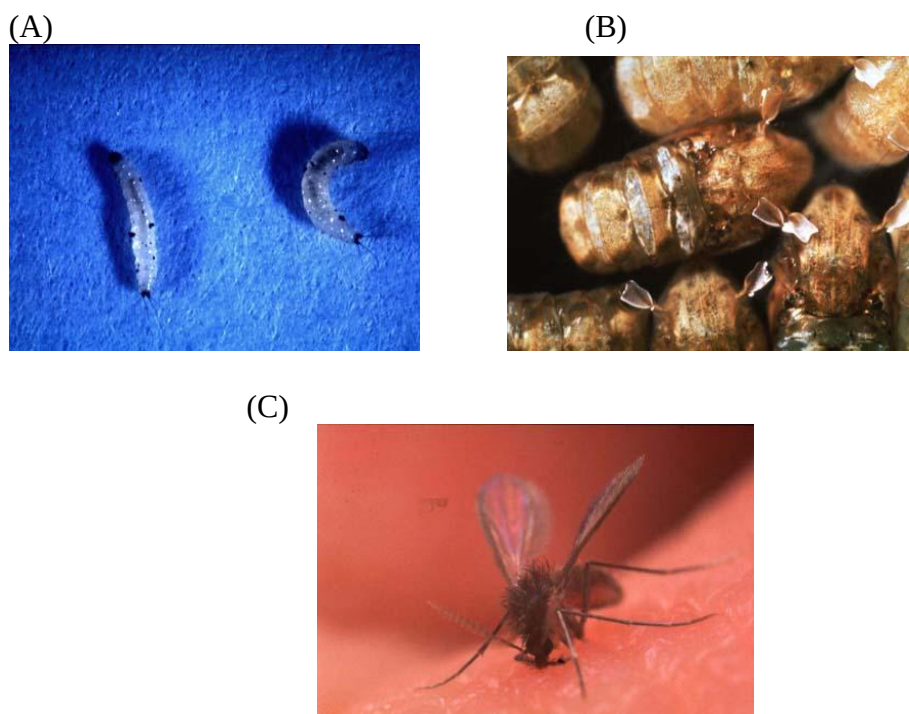


Figura 4: Formas evolutivas de flebotomíneos. (a) larva; (b) pupas; (c) fêmea adulta.

Fonte: OMS (<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library>). Acesso em 14/09/2009.

Os flebotomíneos realizam suas posturas em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica em decomposição, com uma média de 40 a 70 ovos a cada ciclo de oviposição (Forattini, 1973). As fêmeas geralmente depositam os seus ovos de três a oito dias após a realização do repasto sangüíneo (Marcondes, 2001). Os ovos são elípticos e esbranquiçados, adquirindo tonalidades escuras após a sua expulsão do corpo do inseto. A eclosão ocorre cerca de 10 dias após a sua deposição, sendo que ovos de uma mesma postura podem apresentar períodos de incubação consideravelmente mais longos. Adicionalmente, existem evidências mostrando que os ovos de algumas espécies podem atravessar longos períodos de quiescência, fenômeno geralmente

observado nos casos onde as condições ambientais não se mostram favoráveis à eclosão (Young & Duncan, 1994).

As larvas são pequenas (<1,2 mm) e vermiformes, caracterizando-se pela presença de uma cápsula cefálica esclerotizada e de pequenas cerdas ao longo de toda a sua extensão. As larvas de primeiro estágio exibem duas cerdas longas na parte posterior do corpo, enquanto que nos demais estágios, o número de cerdas é quatro (Marcondes, 2001). O desenvolvimento larval ocorre em *micro-habitats* terrestres, situados em fendas de rochas, base de troncos de árvores e tocas de animais, ambiente onde se alimentam avidamente da matéria orgânica em decomposição (Ferro *et al.*, 1997). A seleção dos sítios de postura dos flebotomíneos é feita através da complexa interação de sinalizações comportamentais e bioquímicas. Antes de se transformarem em pupas, as larvas param de se alimentar e procuram abrigos menos úmidos, onde se prendem a um objeto. A fase de pupa dura de 7 a 12 dias, havendo uma tendência para que a emergência dos machos ocorra mais precocemente (Young & Duncan, 1994).

Os flebotomíneos adultos apresentam as asas e o corpo densamente recobertos por cerdas, podendo apresentar tonalidades que variam entre amarelo e castanho escuro (Marcondes, 2001). Os vôos dos flebotomíneos são geralmente curtos, baixos e silenciosos, caracterizando-se por um aspecto saltitante e um raio de ação não muito superior a 200 metros (Alexander & Young, 1992).

A dieta dos insetos adultos é baseada na ingestão de carboidratos, obtidos a partir de seivas vegetais, néctares florais e de secreções de afídeos (Schlein & Muller, 1995). Além da importância óbvia dos açúcares como fonte de energia para os flebotomíneos, é provável que estas substâncias também possam ser importantes para o desenvolvimento e subsequente transmissão das *Leishmania* (Bray, 1983). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as formas promastigotas respondem de forma diferenciada a

certos carboidratos e que o crescimento destes parasitas em meios ricos em açúcares induz a sua transformação, de forma semelhante à observada no tubo digestivo dos flebotomíneos (Schlein & Yuval, 1987).

Durante o ciclo reprodutivo, as fêmeas adotam hábitos hematofágicos, como forma de obter componentes nutricionais encontrados no sangue dos vertebrados, importantes à maturação de seus ovos (Young & Duncan, 1994). No entanto, algumas espécies de flebotomíneos (*e.g. P. papatasi*), mantidas em condições laboratoriais, conseguem desenvolver os seus ovos na completa ausência de sangue (autogenia). Embora o número de ovos depositados pelas fêmeas autogênicas seja relativamente menor, a proporção de óocitos desenvolvidos é similar à encontrada nas fêmeas que realizaram repasto sangüíneo (Tesh & Guzman, 1996).

Algumas espécies de flebotomíneos apresentam uma notável especificidade alimentar, no que se refere à obtenção de fontes de repastos sanguíneos, enquanto que outras são extremamente promíscuas, alimentando-se numa gama considerável de espécies de vertebrados (Morrison *et al.*, 1993). Os flebotomíneos são insetos de hábitos crepusculares e noturnos, apesar de algumas espécies também se alimentarem durante o dia, conforme já foi observado com espécimes de *Lu. umbratilis* da região amazônica (Lainson *et al.* 1994).

1.3.2. *Phlebotomus papatasi*

O flebotomíneo *P. papatasi* (família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Phlebotomus*, subgênero *Phlebotomus*) é o principal vetor de *Le. major*, que é o agente etiológico da leishmaniose cutânea em diferentes regiões do Velho Mundo (Al-Jawabreh *et al.*, 2008). Os estágios de desenvolvimento do *P. papatasi* podem ser

encontrados em uma gama de ecótopos com temperaturas medianas e umidade relativamente alta (Erisoz Kasap & Alten, 2005). Tocas de roedores e abrigos de animais são suspeitos de serem criadouros de flebotomíneos. Os adultos podem às vezes ser encontrados em rachaduras de paredes e lugares escuros da casa (Feliciangeli, 2004). Esta espécie de flebotomíneo tem uma larga distribuição geográfica, estendendo-se do Oeste do Mediterrâneo ao subcontinente indiano (Guernaoui *et al.*, 2005).

A distribuição geográfica de *P. papatasi* inclui regiões com diferentes condições climáticas e descontinuidade ecológica, onde o uso de inseticidas varia muito e pode definir diferentes padrões de seleção que são favoráveis à adaptação local entre populações geograficamente isoladas (Dhiman & Mittal, 2000). Estudos de marcadores genéticos foram utilizados para estudar a variação genética em *P. papatasi*, tais como citocromo *b* (Hamarsheh *et al.*, 2007), espaçador interno transcrito 2 (ITS2) (Depaquit *et al.*, 2008), e eletroforese de isoenzimas (Ghosh *et al.*, 1999). Através destes estudos, tem se observado que populações de *P. papatasi* geograficamente separadas são geneticamente bastante homogêneas (Hamarsheh *et al.*, 2009).

1.4. Proteínas Salivares

Os flebotomíneos, assim como os demais insetos hematófagos, precisam superar uma série de obstáculos na sua incessante busca de sangue. Os vertebrados, por sua vez, desenvolveram mecanismos sofisticados e redundantes para o controle da perda de sangue, que precisam ser sobrepujados no momento da realização do repasto sangüíneo (Moura *et al.*, 2007).

Os flebotomíneos apresentam peças bucais cortantes, capazes de lacerar a pele do hospedeiro, induzindo o surgimento de pequenas hemorragias nos capilares

superficiais, nas quais eles se alimentam. No momento da picada, os insetos injetam saliva nos tecidos do hospedeiro, causando uma reação local (Collin *et al.*, 2009). Contudo, a intensidade e o padrão da reação são aspectos que variam tanto entre diferentes espécies, quanto entre indivíduos de diferentes populações geográficas da mesma espécie (Oliveira *et al.*, 2008).

Estudos recentes vêm demonstrando que os flebotomíneos representam mais do que simples transmissores mecânicos dos agentes etiológicos que veiculam, uma vez que componentes da saliva parecem interferir no curso da infecção do parasita no hospedeiro vertebrado (Kamhawi, 2006). A saliva dos flebotomíneos contém várias substâncias, incluindo proteínas e prostaglandinas. Essas moléculas apresentam propriedades farmacológicas que induzem a deflagração de reações anti-inflamatórias, vasodilatadoras ou imunossupressivas, auxiliando na rápida localização dos vasos sanguíneos e na supressão dos processos hemostáticos do hospedeiro (Brodie *et al.*, 2007).

Foi evidenciado que as populações humanas que habitam regiões endêmicas de *Leishmania* apresentam atenuadas infecções de *Leishmania* e são menos prováveis de contrair a doença quando comparadas com turistas. Historicamente, este fenômeno tem sido atribuído a um início gradual de imunidade contra o parasita *Leishmania* em indivíduos endêmicos. Portanto, evidências recentes demonstram que as respostas imunes aos componentes salivares de flebotomíneos podem influenciar o resultado da leishmaniose, levando a um aumento da susceptibilidade em populações naturais e à proteção em indivíduos que são expostos repetidamente a picada dos flebotomíneos (Kamhawi, 2006).

Evidências sugerem que os flebotomíneos representem mais que simples “seringas voadoras” que inoculam o parasita no hospedeiro; eles também injetam uma

gama de compostos salivares que são farmacologicamente ativos que evitam a hemóstase e assim facilitam o processo de alimentação de sangue. A hemóstase dos vertebrados é altamente eficiente e envolve vias metabólicas que resultam na coagulação sanguínea, vasoconstrição e agregação plaquetária. A atividade de alimentação sanguínea dos artrópodes tem evoluído para combater esses processos. Muitas destas moléculas são imunogênicas e desencadeiam uma resposta imune do hospedeiro que reduz a eficiência da alimentação sanguínea e a fecundidade de vetores. Estas moléculas atuam como efetores imunes que influenciam a habilidade de vetores hematófagos de transmitirem patógenos (Rogers *et al.*, 2007; Tripet *et al.*, 2009).

Por outro lado, os componentes salivares reforçam a virulência de alguns patógenos, facilitando a infecção pela baixa regulação de respostas imunes (Brodie *et al.*, 2007). O reforço da infecção de *Leishmania* através da saliva de flebotomíneos foi demonstrado para os modelos *Lutzomyia longipalpis/Leishmania amazonensis* (Theodos *et al.*, 1991; Norsworthy *et al.*, 2004), *Lutzomyia longipalpis/Leishmania braziliensis* (Samuelson *et al.*, 1991), *Lutzomyia whitmani/Leishmania braziliensis* (Bezerra & Teixeira, 2001), *P. papatasi/Leishmania major* (Belkaid *et al.*, 1998; Theodos *et al.*, 1991) e em uma combinação artificial de *Lutzomyia longipalpis/Leishmania major* (Titus & Ribeiro, 1988).

Para muitos estudos, homogenatos de glândulas salivares (SGH) foram introduzidos por inoculação; porém, infecções naturais por picadas de flebotomíneos e inoculação de *Leishmania*, seguida de uma picada de flebotomíneo também exacerbam as infecções (Moura *et al.*, 2007). A exacerbação da infecção é evidente quando os parasitos são introduzidos algumas horas após a exposição à saliva (Brodie *et al.*, 2007). Acredita-se que o reforço da infecção da *Leishmania* pela saliva dos flebotomíneos é devido as suas atividades imunomodulatórias não específicas. O efeito exacerbativo dos

SGH está correlacionado com o aumento do nível de citocinas Th2. Contudo, as citocinas Th1 são inibidas na presença de SGH (Wheat *et al.*, 2008). Portanto em um indivíduo que nunca foi exposto à saliva dos flebotomíneos, a presença da saliva durante a infecção de *Leishmania* induz a produção de citocinas Th2, que resulta no aumento da susceptibilidade.

Glândulas salivares de flebotomíneos contêm um complexo conjunto de moléculas com atividades biológicas que são conservadas e divergentes entre espécies de flebotomíneos. Maxadilan, por exemplo, foi encontrada apenas nos flebotomíneos do Novo Mundo, sendo o mais potente polipeptídeo vasodilatador conhecido até hoje (Brodie *et al.*, 2007), mediando o reforço da infecção da *Leishmania*. Maxadilan exibe uma gama de atividades imunomodulatórias, sendo uma das mais importantes a estimulação da hematopoiese dos hospedeiros (Guilpin *et al.*, 2002); esta atividade aumenta potencialmente a quantidade de células que as espécies de *Leishmania* infectam. Estudos recentes demonstraram que maxadilan difere geneticamente em até 23% entre as espécies irmãs que compõem o complexo *Lutzomyia longipalpis*. Esta variabilidade genética aparentemente não apresenta efeito na sua atividade vasodilatadora, apesar de terem sido observadas diferenças significativas na quantidade de mRNA de maxadilan nessas espécies (Lerner *et al.*, 2007). Vale ressaltar que picadas de espécies irmãs coletadas da América do Sul e Central produzem eritemas com tamanhos diferentes no local da picada, sendo postulado que diferenças na expressão de maxadilan nestes vetores contribuiria para leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania chagasi* na Costa Rica e leishmaniose visceral causado pela *L. chagasi* no Brasil (Yin *et al.*, 2000).

Phlebotomus sp. utiliza outras substâncias vasodilatadoras para facilitar a alimentação de sangue. Alguns membros do gênero *Phlebotomus* secretam adenosina e

adenosina monofosfato (AMP) seguindo uma alimentação de sangue. Estas moléculas são vasodilatadoras e apresentam propriedades antiplaquetárias (Volfova *et al.*, 2008). O tratamento de macrófagos murinos com saliva de *P. papatasi* inibe a produção de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Katz *et al.*, 2000). Este efeito é atribuído à adenosina presente apenas nas glândulas salivares de *P. papatasi*, sugerindo-se que diferentes flebotomíneos vetores reforcem a infecção de *Leishmania* por mecanismos distintos.

1.4.1. Proteína salivar SP15

Valenzuela *et al.* (2001) identificaram nove proteínas da saliva de *P. papatasi* que provocam respostas de anticorpos em ratos. A imunização com uma destas proteínas (SP15) extraída de géis SDS, ou como uma vacina de DNA, fornece a mesma proteção que a pré-exposição à saliva. Contudo, a imunização em ratos com células B deficientes na produção de anticorpos permaneceu conferindo proteção, indicando que anticorpos não são necessários para este tipo de imunidade.

A proteína SP15, assim como SGH, induziu respostas DTH Th1 além de anticorpos. Este tipo de resposta depende da interação do antígeno com moléculas MHC classe II. A vacinação com maxadilan recombinante também desencadeou respostas Th1 e Th2. Baseado no fato que SP15 induz proteção na ausência de anticorpos, sugere que a resposta DTH mediará à imunidade não específica. A pré-exposição a picadas de flebotomíneos, em vez de SGH, também induz respostas DTH que é caracterizada pelo aumento no nível de citocinas Th1 (Oliveira *et al.*, 2006). Estas observações podem explicar porque indivíduos que vivem em regiões endêmicas de *Leishmania* exibem leishmaniose atenuada, como estes indivíduos são expostos às picadas de flebotomíneos durante toda sua vida e apresentam reações DTH em resposta às picadas.

A prevalência de flebotomíneos infectados por *Leishmania* nos campos é bastante baixa; avaliações de flebotomíneos vetores em áreas específicas do Iraque revelaram que a maior taxa de infecção foi de apenas 2,3% (Aronson *et al.*, 2003). Indivíduos nestas áreas podem receber de 100 a 1000 picadas em uma noite; contudo, a quantidade de saliva de flebotomíneos que é injetada supera qualquer antígeno da *Leishmania* que possa ser inoculado. Curiosamente, a proteção por SGH não é mediada apenas por imunidade anti-SP15 ou anti-maxadilan, embora a proteína SP15 induza a maior proteção contra *L. major*. Tais observações suportam a idéia de que a imunidade anti-saliva não é mediada pela neutralização de alguns componentes salivares imunomodulatórios, mas pela reação DTH não específica que direciona as respostas anti-*Leishmania* subsequentes (Valenzuela *et al.*, 2001).

1.4.2. Polimorfismo dos genes que codificam proteínas salivares

Sabendo-se da importância das proteínas salivares na determinação do curso da infecção nos hospedeiros vertebrados, foram realizados alguns trabalhos acerca da variabilidade genética dos genes que codificam tais proteínas. Numa análise populacional de *P. papatasi* de diferentes regiões geográficas, foram identificados 40 alelos para o gene que codifica a proteína salivar SP15. Apesar de terem sido identificados 40 alelos, Elnaiem *et al.* (2005) mostrou que o número de substituições sinônimas nas sequências de DNA que codificam a proteína salivar SP15 é relativamente maior que o número de substituições não-sinônimas, sugerindo-se que este gene não esteja sob seleção natural diversificadora.

Devido ao baixo nível de polimorfismo genético encontrado nas formas variantes do gene SP15, a proteína salivar SP15 deve apresentar uma pequena variação antigênica e pode, portanto, induzir uma resposta DTH uniforme pelo hospedeiro. Este tipo de resposta seria vantajosa para os flebotomíneos, já que facilitariam a aquisição de sangue (Oliveira *et al.*, 2006). Analisando os resultados dos estudos sobre a variabilidade genética de SP15, pode-se observar que os dados contrastam drasticamente com os resultados encontrados nos genes que codificam a proteína salivar maxadilan em *Lutzomyia longipalpis*. Experimentos realizados por Milleron *et al.* (2004b) mostraram que anticorpos anti-maxadilan neutralizam a atividade vasodilatadora de maxadilan e, conseqüentemente, interferem na aquisição de sangue por parte da *L. Longipalpis*, reduzindo a produção de ovos. Ao contrário do que foi encontrado em SP15 de *P. papatasi*, Lanzaro *et al.* (1999) encontrou um alto nível de polimorfismo genético nas sequências de maxadilan, com um total de 54 substituições de aminoácidos, e 22 dos 61 resíduos de aminoácidos foram polimórficos, entre oito amostras de *L. longipalpis*.

O alto grau de variabilidade genética entre as sequências de maxadilan sugerem que esta proteína apresenta uma grande variação antigênica como uma forma de adaptação para evitar a resposta imune do hospedeiro (Milleron *et al.*, 2004a). Segundo M. Ramalho-Ortigão (comunicação pessoal) este gene é provavelmente um membro de uma família multigênica, assim como é observado com outros genes importantes que codificam proteínas secretadas, pois apresentam cópias múltiplas como uma forma de adaptação para aumentar a produção destas proteínas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Estudar os níveis de diversidade genética entre populações de *Phlebotomus papatasi* de diferentes áreas geográficas do Velho Mundo, tomando como base a análise de polimorfismos do gene que codifica a proteína salivar SP15. Associando estas informações com a predição epítomos de ligação às moléculas MHC classe II.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o grau de diversidade genética entre populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito e da Jordânia.
- Predizer a estrutura secundária da proteína SP15 através de programas computacionais, identificando as localizações dos pontos de mutações nas estruturas secundárias.
- Identificar possíveis epítomos da estrutura secundária que possam se ligar a moléculas MHC Classe II, associando estas informações com aquelas derivadas da identificação das regiões polimórficas das seqüências.
- Caracterizar epítomos conservados que possam servir como alvo para o desenvolvimento de vacinas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Flebotomíneos

3.1.1. Coleta

Os procedimentos realizados desde a coleta até o sequenciamento foram realizados por colaboradores da Universidade do Estado do Kansas. Os espécimes de *P. papatasi* utilizados no estudo foram obtidos de coletas de campo. Os flebotomíneos coletados foram capturados em três localidades diferentes: Bahrif (N 24°10', E 32° 52'), uma vila adjacente ao Rio Nilo no sul do Egito; Om Shihan (N 30° 50', E 34° 10') um povoado beduíno no Sinai do Norte; e Sweima (N 31° 48', E 35° 35'), próximo ao Mar Morto, na Jordânia (Figura 5). Estas três localidades representam diferentes ecótopos desérticos endêmicos para os flebotomíneos. Bahrif está localizado na margem leste do Nilo. É uma vila cultivada tipicamente com palmeira (*Phoenix dactylifera*), manga (*Mangifera indica*), trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*), e trevo (*Trifolium spp.*). Bahrif tem uma tribo de aproximadamente 400 indivíduos, que são misturados com cães, gados e cabras. As temperaturas diárias medem tipicamente de 24° a 25°C, e raramente chove. Esta localidade foi escolhida para o estudo por causa do grande número de flebotomíneos presentes.

Om Shihan está localizada a aproximadamente 340 km ao leste do Cairo, 80 km ao interior da costa do Mediterrâneo e a 30 km a oeste da fronteira com Israel. A área do terreno é típica de rolamento desértico de areia com precipitação e umidade suficiente para permitir o cultivo de árvores de fruto, melão e milho pela população beduína local. As condições climáticas produzem uma precipitação média de 87 mm por ano, com a média de temperatura máxima de verão de 33,5°C; e a média de temperatura

mínima de inverno de 6°C. Om Shihan é uma área endêmica para infecções de *Leishmania major*.

Sweima na Jordânia é uma área de depressão à aproximadamente 350 m abaixo do nível do mar. O clima é considerado Mediterrâneo subsaariano com temperaturas que medem de um mínimo de 8 a 12°C no inverno, e a máxima no verão de 35 a 40°C. A precipitação média é menos que 50 mm, e a chuva cai inteiramente entre Novembro e Abril. Sweima também é uma área endêmica para *L. major*.

Os flebotomíneos foram capturados com armadilhas luminosas tipo CDC entre 18:00 e 06:00 da manhã seguinte. Nas coletas realizadas em Bahrif e Om Shihan foi utilizado gelo seco como isca, enquanto que as coletas realizadas em Sweima não tiveram isca. Os flebotomíneos foram transferidos para bolsas de coleta e mantidos vivos até o momento da dissecação. Os flebotomíneos foram eutanizados em água e detergente apenas antes da dissecação. *P. papatasi* foram identificados por exame microscópico da spermateca feminina de acordo com Lane (1986).



Figura 5: Mapa do Oriente Médio indicando os locais de coleta de *Phlebotomus papatasi* utilizados

neste trabalho. Os pontos em vermelho, verde e azul indicam Bahrif, Om Shihan e Sweima,

respectivamente. (Fonte: Wikipedia em <http://pt.wikipedia.org>). Acesso em 17/09/2009.

3.1.2. Preparação das amostras

Para os flebotomíneos capturados em campo, a cabeça com as glândulas salivares das fêmeas de *P. papatasi* foram separadas e colocadas em tubos de 1,5 ml contendo 50 µl RNAlater (Ambion) e homogeneizados imediatamente. As amostras foram armazenadas a 4°C por mais de 48 horas, congeladas em gelo seco para transporte e mantidas a -80°C até as análises posteriores. Para este estudo foram coletados 50 espécimes de cada população.

3.2. Métodos moleculares

3.2.1. Isolamento de RNA total

O RNA total foi isolado das amostras individuais dos flebotomíneos usando o kit de isolamento Mini RNA (Qiagen). As amostras tiveram as cabeças com as glândulas salivares dissecadas e o RNA total extraído, mas não quantificado devido à pequena quantidade de RNA em cada amostra. O RNA purificado foi aplicado a reação de síntese da primeira fita de cDNA usando oligo dT₁₂₋₂₀ com a transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de síntese foram utilizados 12 µl de RNA de cada amostra.

Para cada amostra de RNA, o cDNA foi sintetizado com reagentes da Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foram adicionados 2,5 µM de primer Oligo (dT) e 0,5 µM de dNTPs (10mM) aos 12µl de RNA, a reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos e mantida no gelo por pelo menos 1 minuto; foram adicionados à reação 4µl 5X do tampão da Transcriptase Reversa,

5mM de DTT (0.1M), 20 unidades de RNase OUT, e 200 unidades da Transcriptase Reversa SuperScript III (200 units/ μ l). A mistura foi incubada por uma hora a 50°C e estocada a -20°C.

3.2.2. Amplificação de DNA

Foram utilizadas sequências de cDNA de SP15 de *P. papatasi* para amplificar um fragmento 408 pb, utilizando os primers SP15F 5'-TTAATTTCGCGCAGTGTTTC-3' e SP15R 5'-TTATATATTGATTGTTTTATC-3'. As condições ótimas de PCR incluem um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por dois minutos, seguidos por 29 ciclos de 94°C por 20 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

3.2.3. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram lavados em 150 μ l (2x) de água livre de DNase/RNase usando placas de limpeza de PCR Multiscreen (Millipore, Billerica, MA) e por aplicação de vácuo (10 psi). Os produtos limpos da PCR foram suspensos em 50 μ l de água livre de DNase/RNase e ciclo-sequenciados utilizando dois conjuntos distintos de primers. Um conjunto incluiu os primers PpSP15_152 5'-TTAATTTCGCGCAGTGTTTC-3' forward e o reverse PpSP15_152 5'-TTATATATTGATTGTTTTATC-3; o segundo conjunto incluiu os primers PpSP15_206F 5'-CTGCCAAGCTGAAAATCCAT-3' forward e o reverse PpSP15_206R 5'-GCTTTCAGGCTTTTG-3'. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos da reação de sequenciamento foram lavados utilizando uma placa de limpeza

Multiscreen (Millipore, Billerica, MA) e analisados utilizando o seqüenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems, Foster City). Os dados do seqüenciamento foram compilados através do programa CAP3 (<http://egassembler.hgc.jp>) utilizando os parâmetros padrão do software para gerar uma seqüência consenso para cada amostra de cDNA.

3.3. Análises das sequências

3.3.1. Genética de populações

Todas as análises das sequências foram realizadas no laboratório de bioinformática e biologia evolutiva (LABBE) do departamento de genética da Universidade Federal de Pernambuco. As sequências foram alinhadas usando uma versão do programa Clustal W integrado ao programa MEGA v.4.0. Antes das primeiras análises, a ferramenta de predição de peptídeo sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizada para identificação do peptídeo sinal e posterior tratamento das sequências correspondentes ao peptídeo maduro. As primeiras análises foram realizadas ao nível intra-populacional, onde o nível de polimorfismo das sequências das três populações foi avaliado separadamente através dos seguintes parâmetros: diversidade de nucleotídeos (P_i); número de sítios segregantes (S) e diversidade haplotípica (H_d).

As análises posteriores foram realizadas ao nível inter-populacional. Para tanto, foi estimada a diferenciação genética entre as três populações, que foi avaliada através da determinação dos índices H_s e K_s (Hudson *et al.* 1992a); o primeiro parâmetro é obtido através dos haplótipos e o segundo é obtido através das seqüências de nucleotídeos. O fluxo gênico entre as populações foi avaliado através das estimativas do

índice de fixação F_{st} (Hudson *et al.*, 1992b), G_{st} (Nei 1973) e N_{st} (Lynch & Crease, 1990). As distâncias genéticas foram calculadas com base na correção de Jukes & Cantor (1969). Além da hipótese de evolução neutra (Kimura, 1968) que foi avaliada através de três testes de neutralidade: teste D de Tajima (1989), testes D^* e F^* de Fu & Li (1993). Todos estes parâmetros também foram calculados através do programa DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009).

3.3.2. Estrutura secundária

Para a predição da estrutura secundária foi gerada primeiramente uma sequência consenso utilizando todas as sequências de aminoácidos do peptídeo maduro através do programa Bioedit v. 7.0.9. A sequência consenso foi gerada a partir da regra da maioria. Posteriormente foi utilizada a ferramenta de predição de estrutura secundária (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) com os parâmetros padrões para a obtenção da predita organização estrutural secundária da proteína SP15 de *P. papatasi*. Esta informação foi associada com os dados dos sítios polimórficos para a localização dos sítios variáveis dentro da estrutura secundária.

3.3.3. Predição de epítomos de células T

Para identificar possíveis peptídeos de ligação a moléculas MHC classe II e epítomos de células T humanas, foi utilizada uma sequência consenso de aminoácidos correspondente ao peptídeo maduro através do servidor de predição de peptídeos de ligações a moléculas MHC classe II Propred [<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>] (Singh & Raghava 2001). O programa utiliza um algoritmo de predição que analisa os motivos de ligação às moléculas MHC classe II baseado numa matriz quantitativa e retorna uma resposta contendo os possíveis

motivos de ligação, os quais possuíram maior pontuação de acordo com a matriz. A pesquisa para possíveis epítomos foi ajustada com um limiar de 3% e a pesquisa foi realizada para 51 alelos do antígeno leucocitário humano (HLA), que são as formas humanas das moléculas MHC classe II.

4. Resultados

4.1. Variabilidade genética

As três populações de *P. papatasi* analisadas apresentaram um total de 99 sequências de excelente qualidade e que foram incluídas neste estudo (Tabela 1). Foram encontrados 73 haplótipos únicos, sendo 26 haplótipos para a população do Egito, 28 para a do Sinai do Norte e 25 para a da Jordânia. O haplótipo mais frequente foi denominado PPSP1501 (10,10%), tendo sido encontrado nas populações do Sinai do Norte e Jordânia. O haplótipo PPSP1502 (4,04%) foi identificado nas populações do Egito e Jordânia, sendo este o único haplótipo compartilhado entre a população do Egito e outra população.

O haplótipo SP1503 (4,04%) foi identificado nas populações do Sinai do Norte e Jordânia. Dois haplótipos de ocorrência tripla (3,03%) foram observados: SP1504 e SP1505, onde o primeiro apresentou-se nas populações do Sinai do Norte e Jordânia, enquanto que o último ocorreu apenas no Sinai do Norte. Além destes, foram observados sete haplótipos de ocorrência dupla (2,02%), que foram nomeados de SP1506 a SP1512. Os haplótipos SP1506 e o SP1510 foram encontrados nas populações do Sinai do Norte e Jordânia, o SP1507 e o SP1508 foram encontrados apenas no Egito; já os haplótipos SP1509 e SP1511 foram observados apenas no Sinai do Norte e por fim o haplótipo SP1512 foi encontrado apenas na população da Jordânia. Completando a lista, foram observados 61 haplótipos de ocorrência única (1,01%), sendo 23 deles localizados na população do Egito, 20 no Sinai do Norte e 18 na Jordânia.

Tabela 1. Distribuição dos haplótipos de SP15 e suas frequências observadas nas populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.

Haplótipos	Frequência (%)	Populações (Tamanho da amostra)		
		Egito (30)	Sinai do Norte (36)	Jordânia (33)
PPSP1501	10 (10,10)	-	PPSP15JM09; PPSP15JM16; PPSP15JM21; PPSP15JM26	PPSP15JS01; PPSP15JS04; PPSP15JS15; PPSP15JS31; PPSP15JS32; PPSP15JS33
PPSP1502	4 (4,04)	PPSP15AW02; PPSP15AW04; PPSP15AW25	-	PPSP15JS05
PPSP1503	4 (4,04)	-	PPSP15JM03; PPSP15JM08	PPSP15JS08; PPSP15JS09
PPSP1504	3 (3,03)	-	PPSP15JM07	PPSP15JS02; PPSP15JS26
PPSP1505	3 (3,03)	-	PPSP15JM28; PPSP15JM31; PPSP15JM35	
PPSP1506	2 (2,02)	-	PPSP15JM04	PPSP15JS27
PPSP1507	2 (2,02)	PPSP15AW12; PPSP15AW16	-	-
PPSP1508	2 (2,02)	PPSP15AW06; PPSP15AW19	-	-
PPSP1509	2 (2,02)	-	PPSP15JM23; PPSP15JM25	-
PPSP1510	2 (2,02)	-	PPSP15JM14	PPSP15JS21
PPSP1511	2 (2,02)	-	PPSP15JM01; PPSP15JM02	-
PPSP1512	2 (2,02)	-	-	PPSP15JS12; PPSP15JS13
PPSP1513	1 (1,01)	PPSP15AW01	-	-

PPSP1514	1 (1,01)	PPSP15AW03	-	-
PPSP1515	1 (1,01)	PPSP15AW05	-	-
PPSP1516	1 (1,01)	PPSP15AW07	-	-
PPSP1517	1 (1,01)	PPSP15AW08	-	-
PPSP1518	1 (1,01)	PPSP15AW09	-	-
PPSP1519	1 (1,01)	PPSP15AW10	-	-
PPSP1520	1 (1,01)	PPSP15AW11	-	-
PPSP1521	1 (1,01)	PPSP15AW13	-	-
PPSP1522	1 (1,01)	PPSP15AW14	-	-
PPSP1523	1 (1,01)	PPSP15AW15	-	-
PPSP1524	1 (1,01)	PPSP15AW17	-	-
PPSP1525	1 (1,01)	PPSP15AW18	-	-
PPSP1526	1 (1,01)	PPSP15AW20	-	-
PPSP1527	1 (1,01)	PPSP15AW21	-	-
PPSP1528	1 (1,01)	PPSP15AW22	-	-
PPSP1529	1 (1,01)	PPSP15AW23	-	-
PPSP1530	1 (1,01)	PPSP15AW24	-	-
PPSP1531	1 (1,01)	PPSP15AW26	-	-

PPSP1532	1 (1,01)	PPSP15AW27	-	-
PPSP1533	1 (1,01)	PPSP15AW28	-	-
PPSP1534	1 (1,01)	PPSP15AW29	-	-
PPSP1535	1 (1,01)	PPSP15AW30	-	-
PPSP1536	1 (1,01)	-	PPSP15JM05	-
PPSP1537	1 (1,01)	-	PPSP15JM06	-
PPSP1538	1 (1,01)	-	PPSP15JM10	-
PPSP1539	1 (1,01)	-	PPSP15JM11	-
PPSP1540	1 (1,01)	-	PPSP15JM12	-
PPSP1541	1 (1,01)	-	PPSP15JM13	-
PPSP1542	1 (1,01)	-	PPSP15JM15	-
PPSP1543	1 (1,01)	-	PPSP15JM17	-
PPSP1544	1 (1,01)	-	PPSP15JM18	-
PPSP1545	1 (1,01)	-	PPSP15JM19	-
PPSP1546	1 (1,01)	-	PPSP15JM20	-
PPSP1547	1 (1,01)	-	PPSP15JM22	-
PPSP1548	1 (1,01)	-	PPSP15JM24	-
PPSP1549	1 (1,01)	-	PPSP15JM27	-

PPSP1550	1 (1,01)	-	PPSP15JM29	-
PPSP1551	1 (1,01)	-	PPSP15JM30	-
PPSP1552	1 (1,01)	-	PPSP15JM32	-
PPSP1553	1 (1,01)	-	PPSP15JM33	-
PPSP1554	1 (1,01)	-	PPSP15JM34	-
PPSP1555	1 (1,01)	-	PPSP15JM36	-
PPSP1556	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS03
PPSP1557	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS06
PPSP1558	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS07
PPSP1559	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS10
PPSP1560	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS11
PPSP1561	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS14
PPSP1562	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS16
PPSP1563	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS17
PPSP1564	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS18
PPSP1565	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS19
PPSP1566	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS20
PPSP1567	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS22

PPSP1568	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS23
PPSP1569	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS24
PPSP1570	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS25
PPSP1571	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS28
PPSP1572	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS29
PPSP1573	1 (1,01)	-	-	PPSP15JS30

As 99 sequências de nucleotídeos analisadas corresponderam a 50 diferentes sequências de peptídeos maduros (Tabela 2), que foram nomeadas de PEPSP1501 a PEPSP1550. O peptídeo de maior frequência foi nomeado de PEPSP1501 (12,12%), sendo encontrado nas populações do Sinai do Norte e Jordânia. O segundo peptídeo mais frequente PEPSP1502 (8,08%) foi observado nas populações do Sinai do Norte e da Jordânia.

O peptídeo PEPSP1503 (7,07%) foi observado nas populações do Egito, Sinai do Norte e Jordânia. A sequência denominada de PEPSP1504 (6,06%) foi encontrada nas populações do Egito e da Jordânia. O peptídeo PEPSP1505 (5,05%) ocorreu nas sequências do Egito, Sinai do Norte e Jordânia. Quatro peptídeos apresentaram a mesma frequência (3,03%) e foram nomeados de PEPSP1506 a PEPSP1509, as sequências PEPSP1506 e PEPSP1509 foram encontradas no Sinai do Norte e Jordânia, o peptídeo PEPSP1507 ocorreu apenas na população do Sinai do Norte, enquanto que PEPSP1508 foi observado apenas no Egito.

Oito seqüências distintas de peptídeos obtiveram a mesma freqüência (2,02%), denominadas de PEPSP1510 a PEPSP1517. Os peptídeos PEPSP1510, PEPSP1514 e PEPSP1517 apareceram nas populações do Egito e Sinai do Norte. As sequências PEPSP1511, PEPSP1513 e PEPSP1516 apareceram apenas no Egito, enquanto que o peptídeo PEPSP1512 ocorreu apenas na Jordânia. Já o peptídeo PEPSP1515 foi encontrado no Sinai do Norte e na Jordânia. Foram observadas 33 sequências de ocorrência única, denominados de PEPSP1518 a PEPSP1550. A população do Egito obteve 13 destas sequências, que foram as sequências PEPSP1518 a PEPSP1530, a população do Sinai do Norte conteve 11 destas sequências: PEPSP1531 a PEPSP1541. Nove seqüências de ocorrência única foram observados na população da Jordânia e denominados de PEPSP1542 a PEPSP1550.

Tabela 2. Distribuição dos peptídeos SP15 e suas frequências observadas nas populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.

Peptídeo	Frequência (%)	Populations (Sample size)		
		Egito (30)	Sinai do Norte (36)	Jordânia (33)
PEPSP1501	12 (12,12)	-	JM09; JM16; JM19; JM21; JM26	JS01; JS04; JS15; JS19; JS31; JS32; JS33
PEPSP1502	8 (8,08)	-	JM01; JM02; JM03; JM08	JS08; JS09; JS22; JS25
PEPSP1503	7 (7,07)	AW22	JM28; JM31; JM35	JS12; JS13; JS20
PEPSP1504	6 (6,06)	AW02; AW04; AW25	-	JS03; JS05; JS10
PEPSP1505	5 (5,05)	AW17	JM07; JM29	JS02; JS26
PEPSP1506	3 (3,03)	-	JM04; JM32	JS27
PEPSP1507	3 (3,03)	-	JM23; JM25; JM27	-
PEPSP1508	3 (3,03)	AW12; AW16; AW26	-	-
PEPSP1509	3 (3,03)	-	JM11; JM24	JS06
PEPSP1510	2 (2,02)	AW07	JM06	-
PEPSP1511	2 (2,02)	AW05; AW09	-	-
PEPSP1512	2 (2,02)	-	-	JS16; JS24
PEPSP1513	2 (2,02)	AW06; AW19	-	-
PEPSP1514	2 (2,02)	AW21	JM34	-
PEPSP1515	2 (2,02)	-	JM14	JS21
PEPSP1516	2 (2,02)	AW03; AW10	-	-
PEPSP1517	2 (2,02)	AW29	JM13	-

PEPSP1518	1 (1,01)	AW01	-	-
PEPSP1519	1 (1,01)	AW08	-	-
PEPSP1520	1 (1,01)	AW11	-	-
PEPSP1521	1 (1,01)	AW13	-	-
PEPSP1522	1 (1,01)	AW14	-	-
PEPSP1523	1 (1,01)	AW15	-	-
PEPSP1524	1 (1,01)	AW18	-	-
PEPSP1525	1 (1,01)	AW20	-	-
PEPSP1526	1 (1,01)	AW23	-	-
PEPSP1527	1 (1,01)	AW24	-	-
PEPSP1528	1 (1,01)	AW27	-	-
PEPSP1529	1 (1,01)	AW28	-	-
PEPSP1530	1 (1,01)	AW30	-	-
PEPSP1531	1 (1,01)	-	JM05	-
PEPSP1532	1 (1,01)		JM10	-
PEPSP1533	1 (1,01)		JM12	-
PEPSP1534	1 (1,01)	-	JM15	-
PEPSP1535	1 (1,01)	-	JM17	-
PEPSP1536	1 (1,01)	-	JM18	-
PEPSP1537	1 (1,01)	-	JM20	-
PEPSP1538	1 (1,01)	-	JM22	-
PEPSP1539	1 (1,01)	-	JM30	-
PEPSP1540	1 (1,01)	-	JM33	-
PEPSP1541	1 (1,01)	-	JM36	-

PEPSP1542	1 (1,01)	-	-	JS07
PEPSP1543	1 (1,01)	-	-	JS11
PEPSP1544	1 (1,01)	-	-	JS14
PEPSP1545	1 (1,01)	-	-	JS17
PEPSP1546	1 (1,01)	-	-	JS18
PEPSP1547	1 (1,01)	-	-	JS23
PEPSP1548	1 (1,01)	-	-	JS28
PEPSP1549	1 (1,01)	-	-	JS29
PEPSP1550	1 (1,01)	-	-	JS30

Todas as sequências analisadas apresentaram um total de 369 pares de bases, onde 339 foram sítios monomórficos quando se tratando das três populações juntas (Tabela 3). As populações da Jordânia e do Sinai do Norte foram as que apresentaram o menor número de sítios polimórficos: 18 cada uma, sendo, portanto a população do Egito a que apresentou o maior número de sítios variáveis (23). As análises dos logos apresentaram sítios fixados entre as populações (Figura 6).

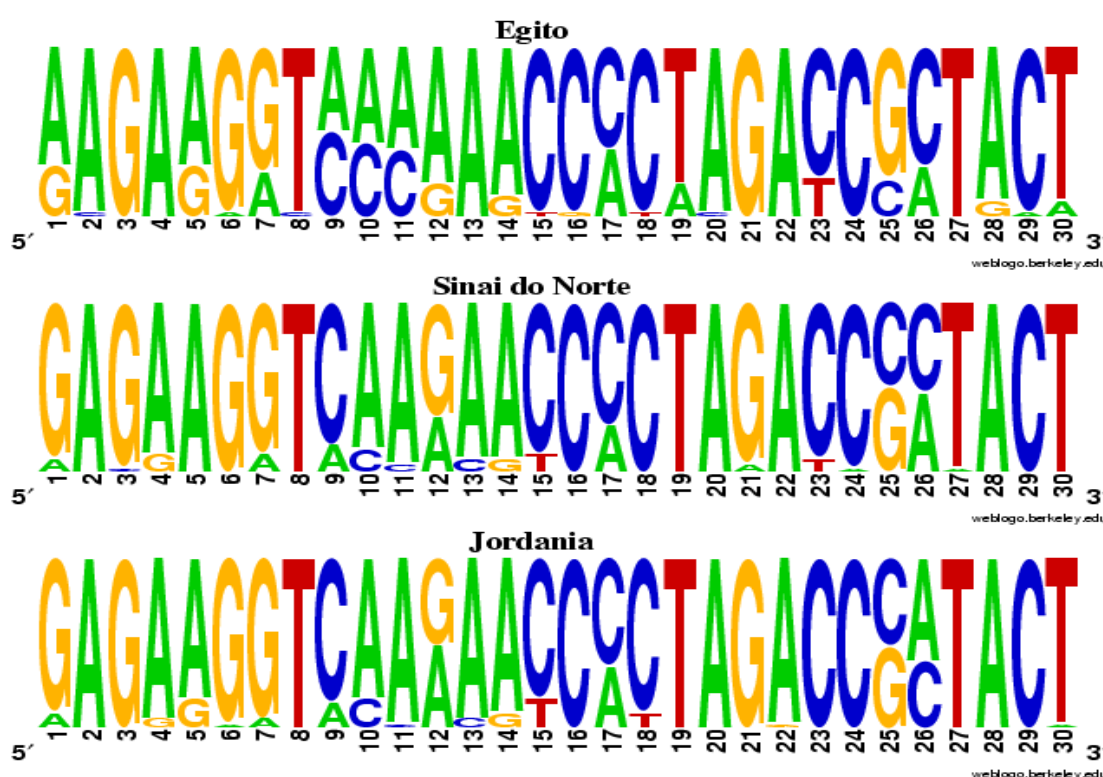


Figura 6: Representação gráfica dos sítios variáveis do gene SP15 de *Phlebotomus papatasi* das populações do Egito, Sinai do Norte e Jordânia. O tamanho de cada nucleotídeo é proporcional à sua frequência para os determinados sítios.

O sítio nove, que correspondeu ao primeiro sítio variável, apresentou uma frequência maior de nucleotídeos com adenina em relação à guanina na população do Egito, ao contrário da que foi observada nas populações do Sinai do Norte e Jordânia

que apresentaram uma frequência maior de nucleotídeos com guanina a adenina. O sítio 12 (segundo sítio polimórfico) tornou-se polimórfico apenas na população do Egito com adenina e citosina, e foi fixado nas populações do Sinai do Norte e Jordânia. O sítio 22 (terceiro sítio polimórfico) também foi polimórfico em apenas uma das populações, Sinai do Norte. O sítio 26 (quarto sítio polimórfico) foi determinado como um sítio fixado apenas na população do Egito. Os sítios 29 e 48 que corresponderam aos quinto e sexto sítios polimórficos respectivamente, também foram fixados, sendo desta vez no Sinai do Norte. Os sítios 129 (oitavo sítio polimórfico) e 185 (décimo sexto sítio polimórfico) foram fixados em duas populações: Sinai do Norte e Jordânia. Já os sítios 207 (décimo oitavo) e 216 (décimo nono) foram fixados apenas na população do Sinai do Norte com citosina e timina, respectivamente. O nucleotídeo 217 (vigésimo) apresentou-se como polimórfico apenas no Egito, o sítio 301 (vigésimo primeiro) foi polimórfico apenas no Sinai do Norte, e o sítio 304 foi polimórfico apenas na Jordânia. Ao contrário do sítio 312 (vigésimo terceiro) que foi fixado apenas na Jordânia. As populações da Jordânia e Egito apresentaram o sítio 330 (vigésimo quarto) como fixado. O sítio 351 (vigésimo sétimo) foi polimórfico apenas no Sinai do Norte. Apenas o Egito apresentou os sítios 352 (vigésimo oitavo) e 360 (vigésimo nono) como polimórficos. A população do Sinai do Norte obteve o sítio 363 (trigésimo) como fixado.

Dentre os 30 sítios variáveis na população total, apenas nove sítios se apresentaram na forma de singletons para as três populações; separadamente a população que apresentou o menor número de singletons (três) foi a população do Sinai do Norte: a população que apresentou o maior número foi a população do Egito: oito. Para todos os sítios variáveis as formas variantes apresentaram apenas duas formas, tanto nos singletons como nos informativos de parcimônia. O número estimado de sítios segregantes (S) para a população total foi 30; para as populações do Egito, Sinai do

Norte e Jordânia tratadas separadamente foram observados os seguintes valores para S: 23, 18 e 18, respectivamente.

O número total de mutações Eta (η) também foi estimado para a população total e para as populações separadamente, tendo apresentado os mesmo valores que S para todas as populações e para a três populações misturadas, sustentando a informação de que todos os sítios variáveis apresentaram apenas duas variantes. Os números observados de substituições sinônimas para as populações unidas e separadamente foram: 11 para o total; 10 para o Egito; cinco para Sinai do Norte; e cinco para a Jordânia. Conseqüentemente o número de substituições não-sinônimas foi 19 para as populações misturadas, as três populações separadamente apresentaram o mesmo número de substituições não-sinônimas: 13.

As populações foram analisadas quanto à diversidade haplotípica e mostraram valores próximos entre si; a população da Egito apresentou o maior valor deste parâmetro dentre as três populações, implicando que nesta população os haplótipos tiveram frequências menores que nas demais populações, inclusive menor que a população total. As populações do Egito e Sinai do Norte apresentaram os valores da diversidade haplotípica mais próximos entre si do que com a população da Jordânia. Porém a variância e o desvio padrão deste estimador foram maiores para a população da Jordânia apesar de apresentar o menor valor da diversidade haplotípica, sugerindo que distribuição haplotípica nesta localidade é mais heterogênea que nas outras. Os menores valores de variância e desvio padrão foram observados pela população total, e quando analisadas separadamente as populações do Egito e do Sinai do Norte apresentaram os mesmo valores para variância e desvio padrão deste índice.

O número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio entre as seqüências (π) foi maior na população do Egito, indicando que esta população acumula um número

maior de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos da amostra. A população do Sinai do Norte foi a que apresentou o menor valor de π , demonstrando que esta população apesar de apresentar vários haplótipos distintos, os mesmos em média diferem menos entre si nesta população do que nas outras. Porém o Sinai do Norte apresentou o maior valor de desvio padrão de π entre todas as populações, inclusive a população total, indicando que diferença par a par entre todas as sequências desta localidade possui uma distribuição mais heterogênea comparada com as outras populações. Quando as três populações foram tratadas como única, a população total apresentou menos diferenças nucleotídicas por sítio entre as sequências que a população do Egito. Já para a diversidade nucleotídica com o modelo de substituição de nucleotídeos de Jukes & Cantor (π_{JC}), as três populações apresentaram valores próximos aos apresentados por esse estimador sem a correção de Jukes & Cantor, observando-se padrões semelhantes entre os dois π .

Os valores do estimador de Watterson ou Theta (θ) foram medidos através de duas variáveis: número total de mutações por sítio entre as sequências (η) e o número de sítios segregantes. Este parâmetro que avalia a taxa de mutação populacional apresentou os mesmos valores quando calculados através das duas variáveis. A população do Egito apresentou a maior taxa de mutação populacional, taxa igual à apresentada pela população total, corroborando com os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica de que as sequências desta população apresentam o maior polimorfismo genético. As populações do Sinai do Norte e da Jordânia apresentaram os valores de θ mais baixos e mais próximos, indicando que suas sequências possuem uma taxa de mutação por sítio menos elevada que a população do Egito. Foram analisadas a variância e o desvio padrão de θ através de dois métodos: havendo recombinação entre os sítios e não havendo recombinação entre os sítios. Em ambos os casos, a população do Egito obteve

o maior valor destes índices (adotando ou não o equilíbrio de ligação, uma vez que se assume o equilíbrio para não superestimar a variância sem recombinação) sugerindo que as sequências desta população apresentam taxas de mutação mais heterogêneas entre si, do que as outras populações. A população total obteve o desvio padrão da taxa de mutação superior a duas populações separadamente: Egito e Jordânia.

Os valores de θ também foram obtidos a partir de π , e apresentaram um padrão idêntico ao padrão observado deste estimador calculado através de S e η , com exceção da população total que não apresentou a taxa igual a da população do Egito quando calculado com π . O estimador θ também foi calculado por sequência através de “S” e indicou que a população do Egito apresenta uma taxa de mutação populacional superior aos das outras duas populações e igual ao da população total.

Os valores da variância e desvio padrão (com ou sem recombinação) demonstraram que as sequências do Egito apresentam maior variação na taxa de mutação populacional, havendo ou não ocorrência de recombinação entre os sítios. O θ por sequência a partir de η indicou os mesmos valores que θ calculado a partir de “S”. A média de diferenças de nucleotídeos por sequências da mesma localidade foi maior na população do Egito, maior até que a população total, consolidando que a população do Egito possui uma maior taxa de mutação e conseqüentemente acumula mais mutações que as demais localidades.

Os testes de neutralidade foram realizados através da estatística “F” e “D” de Fu e Li, e Teste “D” de Tajima. Nos testes de Fu e Li a população do Egito apresentou um valor negativo, assim como a população total. As outras duas populações apresentaram valores positivos, ambos não significativos. Ao contrário do que foi observado nos testes de Fu e Li, no teste “D” de Tajima apenas a população do Egito apresentou valor positivo, sendo a população total que apresentou o valor negativo mais baixo, mesmo

assim nenhum dos valores foi estatisticamente significativo. O teste “D” de Tajima também foi calculado para a região codificante e apresentou valor igual ao teste de Tajima para a sequência completa.

Os sítios sinônimos foram testados com o teste de Tajima e todas as populações apresentaram valores negativos, também confirmando a hipótese nula. Os sítios não-sinônimos também foram testados quanto à neutralidade e a população do Sinai do Norte apresentou valor negativo, mas assim como as outras populações estes valores não foram estatisticamente significativos para rejeitar a hipótese nula. A razão de sítios não-sinônimos por sinônimos foi testada através do teste “D” de Tajima e apresentou valor positivo apenas na população do Sinai do Norte, evidenciando que esta população apresentou o menor valor do teste de neutralidade para os sítios não-sinônimos em relação aos sinônimos. Ambos os testes foram realizados com significância de $P > 0,10$ e confirmaram a hipótese nula.

Tabela 3. Dados gerais sobre a diversidade genética do marcador SP15 de populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito, Sinai do Norte e Jordânia.

População:	Egito	Sinai do Norte	Jordânia	Total
Número de seqüências:	30	36	33	99
Número de sítios:	369	369	369	369
Sítios Monomórficos:	346	351	351	339
Sítios Polimórficos:	23	18	18	30
Sítios variáveis singleton:	8	3	4	9
Sítios parcimônio informativos:	15	15	14	21
Sítios variáveis singleton (duas variantes):	8	3	4	9
Posição dos sítios:	12 48 129 178 185 207 217	22 330 351	48 134 304 363	12 22 129 185 217 304 330
	360			351 360
Sítios parcimônio informativos (duas variantes):	15	15	14	21
Posição dos sítios:	9 29 119 130 132 134 142 173	9 26 119 130 132 134 142 172	9 26 29 119 130 132 142 172	9 26 29 48 119 130 132 134
	189 216 312 340 345 352 363	173 178 189 301 312 340 345	173 178 189 207 340 345	142 172 173 178 189 207 216
				301 312 340 345 352 363
Sítios segregantes (S):	23	18	18	30
Número total de mutações (Eta):	23	18	18	30

Número total de substituições sinônimas:	10	5	5	11
Posição dos sítios:	9 12 48 129 132 178 207 216 312 360	9 132 172 178 312	9 48 132 178 207	9 12 48 129 132 172 178 207 216 312 360
Número total de substituições não-sinônimas:	13	13	13	19
Posição dos sítios:	29 119 130 134 142 173 185 189 217 340 345 352 363	22 26 119 130 134 142 173 189 301 330 340 345 351	26 29 119 130 134 142 172 173 189 304 340 345 363	22 26 29 119 130 134 142 173 185 189 217 301 304 330 340 345 351 352 363
Número de haplótipos:	26	28	25	73
Diversidade haplotípica, Hd:	0,989	0,981	0,966	0,986
Variância da Diversidade haplotípica:	0,00016	0,00016	0,00049	0,00003
Desvio padrão da Diversidade haplotípica:	0,013	0,013	0,022	0,006
Diversidade nucleotídica, Pi:	0,01700	0,01097	0,01163	0,01424
Variância de Pi:	0,0000009	0,0000009	0,0000007	0,0000004
Desvio padrão de Pi:	0,00094	0,00097	0,00085	0,00063
Diversidade nucleotídica (Jukes and Cantor), Pi(JC):	0,01723	0,01108	0,01174	0,01441
Theta (por sítio) de Eta:	0,01573	0,01176	0,01202	0,01573
Theta (por sítio) de S, Theta-W:	0,01573	0,01176	0,01202	0,01573

Variância de theta (sem recombinação):	0,0000328	0,0000189	0,0000202	0,0000221
Desvio padrão de theta (sem recombinação):	0,00573	0,00435	0,00449	0,00470
Variância de theta (com recombinação):	0,0000108	0,0000077	0,0000080	0,0000083
Desvio padrão de theta (com recombinação):	0,00328	0,00277	0,00283	0,00287
Theta (por sítio) de Pi:	0,01740	0,01114	0,01181	0,01452
Média de diferenças de nucleotídeos, k:	6,274	4,049	4,292	5,255
Theta (por sequência) de S, Theta-W:	5,806	4,341	4,435	5,806
Variância de theta (sem recombinação):	4,467	2,576	2,751	3,003
Variância de theta (com recombinação):	1,465	1,047	1,093	1,124
Theta estimado de Eta:	5,806	4,341	4,435	5,806
Teste estatístico D* de Fu and Li:	-0,55328	0,53028	0,20170	-1,03833
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste estatístico F* de Fu and Li:	-0,33497	0,33468	0,11942	-0,89411
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste D de Tajima:	0,28475	-0,22348	-0,10940	-0,28916
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste D de Tajima para regiões codificantes:	0,28475	-0,22348	-0,10940	-0,28916
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10

Teste D de Tajima para sítios sinônimos (Syn):	-0,60290	-0,61667	-0,46878	-0,71567
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste D de Tajima para sítios não-sinônimos	0,95445	-0,00649	0,07416	0,02500
(NonSyn):				
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste D de Tajima para sítios silenciosos (Sil):	-0,60290	-0,61667	-0,46878	-0,71567
Significância estatística:	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10	NS, P > 0,10
Teste D de Tajima para razão (NonSyn/Syn):	-1,58310	0,01052	-0,15820	-0,03493

Partindo para as análises genéticas entre as populações, podemos observar que os valores encontrados de distância genética entre as populações são baixos (Tabela 4). Para este tipo de análise é importante estimar o índice de fixação de polimorfismo entre as populações (F_{st}); esta variável quantifica o conteúdo de diferenciação genética das populações baseado nas diferenças de nucleotídeos, as populações que apresentaram a maior distância genética (F_{st}) entre si foram as populações do Egito e do Sinai do Norte, e um valor próximo foi observado entre as populações do Egito e da Jordânia, e as populações da Jordânia e do Sinai do Norte apresentaram um valor negativo deste índice, indicando que estas populações são muito próximas geneticamente.

O índice (N_{st}) que é muito semelhante ao F_{st} , com a correção de Jukes & Cantor, apresentou os valores muito próximos ao do índice F_{st} . Alguns dos parâmetros apresentados aqui indicaram que a maior diversidade genética intrapopulacional foi observada no Egito e o menor pôde ser observado no Sinai do Norte. E as populações que apresentaram a menor diferenciação genética entre si foram às populações da Jordânia e do Sinai do Norte. Contudo, os índices não suportaram uma separação das populações.

O índice G_{st} que calcula a diferenciação genética entre populações baseado na diversidade haplotípica indicou que as populações da Jordânia e Sinai do Norte foram as mais próximas e apresentou um valor negativo, porém as populações do Egito e Sinai do Norte foram geneticamente mais próximas que as populações do Egito e Jordânia. A média ponderada das diversidades haplotípicas entre populações (H_s), indicou que a maior variabilidade haplotípica entre duas populações ocorreu entre as populações do Egito e Sinai do Norte, e as populações com menor diversidade haplotípica entre si foram as populações do Sinai do Norte e Jordânia. As três populações foram analisadas aos pares, com o índice K_s que representa a média ponderada das médias numéricas das

diferenças de nucleotídeos entre as sequências de cada população. As populações do Egito e Jordânia apresentaram o maior número de diferenças de nucleotídeos entre as sequências, seguidas pela população do Egito e Sinai do Norte com o segundo maior índice entre os pares de populações. Embora o fato das populações apresentarem uma alta diversidade haplotípica, indicando que existe a ocorrência de múltiplos haplótipos, os índices de diferenciação genética entre as populações não estruturou as mesmas como populações geneticamente distintas.

Analisando os índices de divergência genética entre as populações duas a duas (Tabela 5), podemos observar que as populações que apresentaram a maior média de diferenças nucleotídicas por sítio e por sequência são Egito e Jordânia, apesar destas populações serem as que apresentam o maior número de mutações compartilhadas. As mutações polimórficas em uma população e monomórficas na outra foram maior entre o Egito e Sinai do Norte, contrastando com o dado anterior. Todos os dados de divergência genética entre populações indicaram maior proximidade entre Sinai do Norte e Jordânia.

Tabela 4. Índices de diferenciação genética entre as populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito, Sinai do Norte e Jordânia; estimados a partir do gene SP15. Os índices Hs, Ks, Gst, Nst, Fst, Dxy e Da significam: Média ponderada das diversidades haplotípicas entre populações, média das diferenças de nucleotídeos entre as sequências de cada população, índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade haplotípica, índice de fixação de polimorfismo com correção de Jukes & Cantor, índice de fixação de polimorfismo estimado a partir da diversidade nucleotídica, média numérica de substituições de nucleotídeos por sítio entre populações e número líquido de substituições de nucleotídeos por sítio entre populações, respectivamente.

POP 1	POP 2	Hs	Ks	Gst	Nst	Fst	Dxy	Da
Egito	Sinai	0,98436	5,06028	0,00776	0,17751	0,17662	0,01699	0,00300
Egito	Jordânia	0,97663	5,23543	0,01003	0,16047	0,15960	0,01703	0,00272
Sinai	Jordânia	0,97378	4,16517	-0,00016	-0,00067	-0,00070	0,01129	-0,00001

Tabela 5: Índices de divergência genética entre as populações de *Phlebotomus papatasi* do Egito, Sinai do Norte e Jordânia; estimados a partir do gene SP15.

Egito x Sinai do Norte	
Número de diferenças fixadas:	0
Mutações polimórficas no Egito e monomórficas no Sinai do Norte:	11
Mutações polimórficas no Sinai do Norte e monomórficas no Egito:	6
Número de mutações compartilhadas:	12
Número médio de diferenças de nucleotídeos entre as populações:	6,269
Número médio de substituições de nucleotídeos entre as populações (Dxy):	0,01699
Número líquido de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações (Da):	0,00300
Egito x Jordânia	
Número de diferenças fixadas:	0
Mutações polimórficas no Egito e monomórficas na Jordânia:	8
Mutações polimórficas na Jordânia e monomórficas no Egito:	3
Número de mutações compartilhadas:	15
Número médio de diferenças de nucleotídeos entre as populações:	6,286
Número médio de substituições de nucleotídeos entre as populações (Dxy):	0,01703
Número líquido de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações (Da):	0,00272
Sinai do Norte x Jordânia	
Número de diferenças fixadas:	0
Mutações polimórficas no Sinai do Norte e monomórficas na Jordânia:	5
Mutações polimórficas na Jordânia e monomórficas no Sinai do Norte:	5
Número de mutações compartilhadas:	13
Número médio de diferenças de nucleotídeos entre as populações:	4,168
Número médio de substituições de nucleotídeos entre as populações (Dxy):	0,01129
Número líquido de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações (Da):	-0,00001

4.2. Estrutura secundária

A sequência consenso de aminoácidos da proteína SP15 de *P. papatasi* apresentou 122 aminoácidos. A análise da sequência de consenso resultou na identificação de quatro regiões de estrutura alfa-hélice e duas de estrutura secundária tipo beta-pregueada (Figura 7). A primeira estrutura alfa-hélice começa no terceiro aminoácido e se estende até o décimo segundo aminoácido; a segunda hélice começa no sítio 40 e se estendendo até o aminoácido 52. A terceira hélice localiza-se entre os sítios 58 e 79, imediatamente próximo a segunda estrutura de hélice. A quarta e última estrutura alfa-hélice compreende os aminoácidos situados da posição 106 a 117. As duas estruturas beta-pregueadas localizam-se entre as estruturas de alfa-hélice. A primeira estrutura beta localiza-se entre os aminoácidos 21 e 31, entre a primeira e a segunda região de hélice. A segunda região beta compreende os aminoácidos situados na posição 90 até 99, esta folha beta-pregueada situa-se entre a terceira e quarta regiões de hélice.

Associando as informações sobre a estrutura secundária com as referentes aos sítios polimórficos, foram observados 19 sítios polimórficos de aminoácidos (Figura 8). A maioria (79%) das variações foi observada em estruturas de alfa-hélice, com apenas quatro delas (21%) tendo sido detectadas em região de alça e nenhuma mutação foi observada nas folhas beta. A primeira região de hélice apresentou três sítios variáveis de aminoácidos nas posições 8, 9 e 10; a segunda região de hélice apresentou quatro sítios variáveis: 40, 44, 45 e 48. A terceira estrutura de hélice exibiu quatro aminoácidos variáveis, que foram os sítios: 58, 62, 63 e 73. Também foram encontrados quatro sítios variáveis na quarta estrutura de hélice, nas seguintes posições: 110, 114, 115 e 117. Outros quatro sítios variáveis foram observados nas regiões de alça, sendo que dois deles (101 e 102) foram observados entre a segunda estrutura beta e quarta estrutura de

Posição:	10	20	30	40	50		
Sequência:	ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYINV						
Predição:	CCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCEEEEEEEEEEECCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCC						
Posição:	60	70	80	90	100	110	120
Sequência:	VDKSLKADIRKIMHECAK_KVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCILTDKRIQPQRFDRALIEDYDKTININ						
Predição:	CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEEEECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCC						

Figura 8: O posicionamento dos sítios variáveis dentro da estrutura secundária da proteína SP15 de *Phlebotomus papatasi*. Os retângulos amarelos referem-se às regiões de alfa-hélice, os cinzas às de folha beta-pregueada e as letras sublinhadas correspondem aos sítios variáveis.

4.3. Predições dos epítomos

Foram identificados muitos epítomos MHC classe II usando a ferramenta de predição. O limiar foi ajustado para 3% (em uma escala que vai de um a dez); o número de epítomos preditos variou de acordo com os alelos HLA, medindo de nenhum (alelos DRB1-1104, DRB1-1106 e DRB1-1311) a sete (DRB1-0306, DRB1-0307, DRB1-0308, DRB1-0309 e DRB1-0311 (Figura 9).

As classes de epítomos por alelo menos frequentes foram aquelas que correspondiam a nenhum epítomo (DRB1-1104, DRB1-1106 e DRB1-1311) e a dois epítomos por alelo (DRB1-0101, DRB1-1304 e DRB1-1307). A classe mais frequente de epítomos por alelo foi a de quatro epítomos por alelo, apresentando uma frequência de 13 alelos. O número de epítomos contendo sítios polimórficos variou de nenhum para os alelos DRB1-1120, DRB1-1128, DRB1-1302, DRB1-1305 e DRB1-1321, até quatro para os alelos DRB1-0301, DRB1-0306, DRB1-0307, DRB1-0308, DRB1-0309, DRB1-0311 e DRB1-1107. Classificando os epítomos de acordo com o número de epítomos contendo sítios polimórficos, observamos que a classe de menor frequência foi a que apresentou três epítomos com sítios polimórficos por alelo, num total de sete alelos. Dois grupos apresentaram a maior frequência com 16 alelos para cada, e foram os grupos que contiveram um epítomo e dois epítomos polimórficos.

Para a ligação de alta afinidade dos peptídeos é necessário um resíduo âncora (P1), e apenas os aminoácidos Metionina (M), Fenilalanina (F), Isoleucina (I), Valina (V), Triptofano (W) e Tirosina (Y) foram encontrados na posição P1 (Sturniolo *et al.*, 1999). Grande parte dos preditos peptídeos de ligação às moléculas MHC classe II foram localizados entre a Isoleucina na posição 43 e a Glutamina (Q) na posição 107, na sequência da proteína PPSP15 madura. Quatro peptídeos preditos de ligação a MHC classe II foram encontrados entre a Tirosina no sítio 28 e a Alanina (A) no sítio 39, e um

peptídeo predito único foi detectado entre a Fenilalanina na posição 11 e a Alanina na posição 19.

A região da proteína SP15 que abrigou a maioria dos epítomos de ligação a MHC classe II (Isoleucina na posição 43 a Glutamina na posição 107), também teve o maior número de resíduos variantes, cinco dos quais foram identificados anteriormente (Elnaiem *et al.*, 2005). Nas nossas análises, nós identificamos outros resíduos dentro desta mesma região da proteína salivar SP15. Outros dois resíduos que foram identificados por Elnaiem *et al.*, (2005), um deles foi detectado nas nossas análises como um sítio variante na posição 40, enquanto o outro na posição 25, não foi identificado como um sítio variável nas populações usadas nos nossos estudos.

```

-----10-----20-----30-----40-----50-----
DRB1_0101: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0102: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0301: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0305: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0306: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0307: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0308: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0309: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0311: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3
DRB1_0401: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDK3

```

```

60-----70-----80-----90-----100-----110-----120
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKVKKKQARED SHWLNCR TTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI

```



```

-----10-----20-----30-----40-----50-----
DRB1_0402: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0404: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0405: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0408: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0410: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0421: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0423: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0426: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0701: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0703: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS

```

```

60-----70-----80-----90-----100-----110-----120
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQARED SHWLNCRTTINY YRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI

```



```

-----10-----20-----30-----40-----50-----
DRB1_0801: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0802: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0804: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0806: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0813: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_0817: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1101: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1102: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1104: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1106: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS

```

```

60-----70-----80-----90-----100-----110-----120
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYYRCILTDKRIGPQREDRAIEDYDKTINI

```



```

-----10-----20-----30-----40-----50-----
DRB1_1107: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1114: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1120: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1121: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1128: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1301: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1302: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1304: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1305: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS
DRB1_1307: ENPSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIARPEIRKFSNVLIKYNVVDKS

```

```

60-----70-----80-----90-----100-----110-----120
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI
LKADIRKIMHECAKKVKKQAREDSHWLNCRTTINYRCLTDKRIGPQREFDRAIEDYDKTINI

```




Figura 9: Sequências de aminoácidos da proteína SP15 de *Phlebotomus papatasi* indicando possíveis epítomos de ligação aos 51 tipos de HLA. Os aminoácidos em vermelho indicam o resíduo âncora, os aminoácidos em azul representam os epítomos e os aminoácidos delineados representam os sítios variáveis.

5. Discussão

As análises populacionais das sequências que codificam a proteína salivar madura SP15 de *P. papatasi* indicaram que existe um grande número de haplótipos (73 em 99 sequências), embora nenhum haplótipo foi compartilhado pelas três populações, alguns foram compartilhados por duas das três populações. No que diz respeito às sequências de aminoácidos, foram identificados 50 tipos distintos de sequências entre os 99 espécimes coletados, que representa também uma grande variedade de peptídeos distintos, porém este número diferiu substancialmente do número de haplótipos de nucleotídeos, devido ao grande número de substituições sinônimas identificadas. Um trabalho anterior realizado por Elnaiem *et al.* (2005) apresentou valores próximos entre o número de haplótipos e o número de sequências de aminoácidos diferentes, sendo 40 haplótipos codificando 30 sequências de aminoácidos.

As três populações tanto misturadas quanto separadas apresentaram uma diversidade haplotípica elevada, que implica na ocorrência de vários haplótipos e, subsequentemente, na ausência de seleção purificadora. Os índices de diversidade haplotípica para todas as populações demonstraram ser bastante homogêneos, indicando que forças evolutivas semelhantes são regidas em ambas as localidades. O polimorfismo genético para tal marcador é considerado como mediano: 30 sítios variáveis em 369 nucleotídeos (8,13%) e 19 aminoácidos para uma sequência de 122 aminoácidos de comprimento (15,57%). Estes valores ficaram abaixo dos observados por Elnaiem *et al.* (2005), que foi de 13,81% para a composição de nucleotídeos e 23,42% para os aminoácidos.

Os índices de polimorfismo genético, assim como o π , também foram relativamente baixos; associando-se esses parâmetros com a alta diversidade haplotípica observada, pode-se sugerir que, entre as três populações analisadas, existe um nível

moderado de fluxo gênico ou retenção de polimorfismo ancestral. Apesar da população do Egito possuir uma diversidade nucleotídica maior que as três populações juntas, ainda assim este estimador foi relativamente baixo. O fato de que a maior diversidade nucleotídica foi identificada na população do Egito em relação às outras localidades, também pode ser explicado pelo maior fluxo gênico entre as populações do Sinai do Norte e da Jordânia.

O nível de diferenciação genética entre as populações sustentou a hipótese de que as populações do Sinai do Norte e Jordânia são geneticamente mais próximas devido a maior proximidade geográfica. As diversidades haplotípicas calculadas apenas para duas populações combinadas também se apresentou alta e homogênea entre os três pares possíveis e quando comparadas com as populações separadas ou a população total. Desta forma, corroborando com a hipótese anterior de que os genes em questão não estão sobre o efeito da seleção purificadora, a hipótese de seleção diversificadora ou balanceadora também foram refutadas pelos testes de neutralidade, que indicou a deriva genética como uma das forças evolutivas atuantes.

Os vetores artrópodes são capazes de dispensar uma infinidade de compostos farmacologicamente ativos na pele dos hospedeiros. Estas moléculas quando inoculadas tem efeitos profundos no sistema imune, exibindo atividades anti-hemostáticas, antiinflamatória e imunossupressiva que facilitam a alimentação sanguínea, enquanto reforçam o estabelecimento dos patógenos que eles transmitem. A saliva dos flebotomíneos tem poderosas moléculas imunogênicas que elicitam reações de hipersensibilidade forte em indivíduos que são picados repetidamente. Estudos recentes indicam que a história das picadas dos flebotomíneos e reações à saliva criam uma condição adversa para o estabelecimento da infecção da *Leishmania*, conduzindo à atenuação da doença (Valenzuela *et al.*, 2001).

Uma molécula como SP15 de *P. papatasi* induziu uma forte resposta DTH em animais, sendo suficiente para protegê-los contra infecção de *Le. major*, assim como animais com células B deficientes vacinados com SP15 também são protegidos (Valenzuela *et al.*., 2001). Contudo, apenas a resposta DTH não é uma indicação de proteção, assim como a proteína SP44 de *P. papatasi* mostrou promover tal tipo de resposta e foi associada com a exacerbação da lesão (Oliveira *et al.*, 2008).

Evidências recentes sugerem que componentes salivares podem variar entre diferentes populações de campo (Lanzaro *et al.*, 1999; Elnaiem *et al.*, 2005). No estudo anterior realizado com *P. papatasi*, Elnaiem *et al.* (2005) reportou baixo nível de variação genética em SP15 de uma única população de campo do Sudão em comparação a indivíduos obtidos de várias colônias de laboratório. Estes autores relataram também uma forte evidência que SP15 é um gene de cópias múltiplas. Outras investigações sugeriram que SP15 pode de fato representar uma família de proteínas que são altamente conservados entre flebotomíneos de distantes localidades (Kato *et al.*, 2006).

Em um estudo comparando o transcriptoma salivar de duas populações geograficamente distantes, uma do Mali e outra do Quênia, de *P. duboscqi* (Kato *et al.*, 2006), três sequências de cDNA de SP15 foram identificadas para cada população. Análises filogenéticas indicaram três grupos distintos de sequências com um grupo formado por sequências ortólogas contendo duas sequências: PduM06 e PduK01. PduK01 foi altamente representado na biblioteca de cDNA, considerando que PduM06 foi menos representado, isto sugere que a proteína foi mais frequente na população do Quênia em relação a outra do Mali. Assim, esses dados ressaltaram a necessidade de investigar diferentes níveis de expressão entre populações de flebotomíneos de populações distintas.

Aqui foram comparadas as variabilidades da proteína SP15 entre três populações naturais do Oriente Médio. As populações incluídas no presente trabalho foram representativas de três ecótipos de deserto, onde cada uma difere no que diz respeito a componentes bióticos e abióticos. Entre tais diferenças, distintas coberturas vegetais e distintas fontes de alimentação sanguínea. Em contradição, um local de estudo (população do Egito) não é endêmico para *Le. major*. Para nosso conhecimento, este estudo representa a maior análise de variabilidade genética de proteína salivar de flebotomíneos em populações naturais, contribuindo significativamente para o conhecimento da variabilidade genética e como isto pode afetar as respostas imunes humanas. Nossos resultados indicam variabilidade genética intra e inter-populacional da proteína SP15.

O precursor SP15 completo possui 142 aminoácidos de comprimento, incluindo 21 resíduos de peptídeo sinal. Anteriormente, sete sítios variáveis foram relatados apenas para os haplótipos de SP15 com mais de uma ocorrência (Elnaiem *et al.*, 2005). Nas nossas análises, detectamos muito mais sítios polimórficos dentro da sequência predita da proteína secretada (sem o peptídeo sinal). Possivelmente até 19 sítios de aminoácidos dentro de SP15 são polimórficos, incluindo os sítios identificados por Elnaiem *et al.* (2005). Com exceção de um único sítio identificado anteriormente por Elnaiem *et al.* (2005) uma Lisina na posição 25 da proteína secretada que pode ser substituído por Ácido Glutâmico, todos os outros sítios polimórficos estiveram presentes em nossas análises. Esta pequena discrepância pode estar associada com erros de clonagem/PCR introduzidos no estudo anterior, como sugerido pelo autor.

Quando analisamos os preditos epítomos de moléculas MHC classe II, foram apresentados muitos peptídeos preditos localizados nos sítios de aminoácidos variáveis. O polimorfismo nos preditos peptídeos de associação a MHC classe II podem afetar

potencialmente a apresentação via MHC, assim como diferentes resíduos de aminoácidos podem interferir na estrutura do peptídeo que está sendo apresentado (Borbulevych *et al.*, 2007). Todavia, pelo menos três epítomos de MHC classe II, FKNDASKMAC, VLIKYNVVD e VKKQAREDS não mostraram nenhum sítio polimórfico de aminoácido. Além disso, mesmo considerando o polimorfismo predito, para muitos epítomos a substituição dos aminoácidos é conservada, e em outros epítomos o aminoácido variante está nos últimos nove resíduos do peptídeo predito. Assim, é concebível que mesmo com esta variabilidade, muitos peptídeos de MHC classe II deveriam reter a habilidade de ligar-se ao complexo MHC com grande afinidade, sendo apresentado e ativando de forma eficaz as células T.

No que diz respeito à variabilidade de aminoácidos encontrada e o potencial de SP15 como uma candidata a vacina, tem sido sugerido (Elnaïem *et al.*, 2005) que esta molécula não está sob seleção diversificadora e que suas aplicações como vacina deveria produzir uma resposta imune uniforme. Apesar do número de sítios polimórficos detectados em SP15 neste e no estudo anterior (Elnaïem *et al.*, 2005), o teste D de Tajima e a proporção de substituições não sinônimas por sinônimas concorda em parte com a ausência de seleção diversificadora de SP15. Isto foi visto para cada população analisada separadamente, ou quando todas três foram combinadas.

Análises comparativas de proteínas da glândula salivar de *P. duboscqi* revelaram identidade de 100% para dois grupos separados de sequências ortólogos de SP15, com epítomos de MHC classe II identificados para cada grupo (Kato *et al.*, 2006). Para as sequências ortólogas: PduK01 e PduM06 dois peptídeos preditos foram detectados: LIKHGVVEI, cujo ortólogo SP15 cai dentro da região de grande variabilidade, e o outro: WLNCRSIVD, sem polimorfismo previsto para as sequências analisadas no presente trabalho.

Para as outras duas sequências ortólogas de *P. duboscqi* (PduM03 e PduK03), um dos epítomos preditos (YGFIDVNYNI) está também localizado dentro de uma área de SP15 que possui variabilidade de aminoácidos de acordo com os nossos dados. Um segundo epítomo: YRCVLTSKL mostrou duas possíveis trocas em dois resíduos centrais (T e D) em *P. papatasi*. Assim, mesmo entre espécies diferentes, algum grau de conservação pode ser vista para os peptídeos SP15. Contudo, os flebotomíneos não foram analisados individualmente, e as bibliotecas de cDNA foram obtidas de pelo menos 45 indivíduos (Kato *et al.*, 2006). Além disso, para a população do Quênia, os flebotomíneos foram obtidos de uma colônia mantida em laboratório. Assim, não é possível atribuir variações individuais em relação às sequências de aminoácidos.

Populações humanas que habitam regiões endêmicas de *Leishmania* exibem infecções atenuadas e são menos prováveis de contrair a doença quando comparados as pessoas recém-chegadas nessas áreas. Historicamente, este fenômeno foi atribuído a um início gradual da imunidade contra os parasitas de *Leishmania* nos indivíduos de áreas endêmicas. As respostas imunes para os componentes salivares dos flebotomíneos podem influenciar o resultado da doença, conduzindo ao aumento da susceptibilidade em populações nativas e proteção em indivíduos que são expostos repetidamente à saliva dos flebotomíneos (Gomes *et al.*, 2009). Controversamente, componentes salivares também podem reforçar a virulência da *Leishmania* (Oliveira *et al.*, 2008). Trabalhos anteriores sugeriram que vacinas desenvolvidas a partir de SP15 não serão prejudicadas pela inconsistência da resposta imune dos hospedeiros devido as variações nas populações naturais flebotomíneos (El-naïem *et al.*, 2005), mas pode depender do nível individual de proteínas salivares injetadas nos hospedeiros.

6. Conclusões

- As populações de *Phlebotomus papatasi* do Oriente Médio, através de análises de diversidade nucleotídica do gene que codifica a proteína salivar SP15 apresentaram uma variabilidade genética muito baixa.
- Foi observada a presença de haplótipos compartilhados entre as populações estudadas, evidenciado a ocorrência de fluxo gênico ou retenção de polimorfismo ancestral entre as populações do Oriente Médio.
- Apesar do baixo nível do polimorfismo genético do gene SP15 de *P. papatasi*, as análises indicaram que este marcador não está sob efeito da seleção purificadora.
- O peptídeo maduro de SP15 possuiu um grande número de substituições de aminoácidos localizados dentro de epítomos preditos para MHC classe II, contudo tais mutações parecem não interferir na ligação entre a proteína secretada com moléculas MHC classe II.
- Alguns epítomos demonstraram ser bastante conservados, assegurando a interação entre as formas distintas da proteína SP15 e moléculas MHC classe II.
- Atrelando as informações de ausência de seleção e conservação de epítomos, a proteína SP15 deveria induzir uma resposta imune uniforme do hospedeiro vertebrado, tornando-se assim um forte candidato para o desenvolvimento de uma vacina anti-*Leishmania*.

7. Referências Bibliográficas

- Alexander B and Young DG (1992) Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania* (Viannia) braziliensis. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 397-403.
- Al-Jawabreh A, Diezmann S, Müller M, Wirth T, Schnur LF, Strelkova MV, Kovalenko DA, Razakov SA, Schwenkenbecher J, Kuhls K and Schönian G (2008) Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania* (*Leishmania*) *major* by microsatellite analysis. BMC Evol Biol 8:183.
- Almeida RP, De Jesus AR and Rosa MEA (2007) Immunopathogenesis and immunotherapy in tegumentary leishmaniasis. Curr Res Immunol 1:91-126.
- Alvar J, Yactayo S and Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol 22 (12): 552-557.
- Aronson N, Coleman R, Coyne P, Rowton E, Hack D, Polhemus M, Wortman G, Cox K, Weina P and Herwaldt BL (2003) Cutaneous Leishmaniasis in U.S. Military Personnel Southwest/Central Asia, 2002-2003. Mortality and Morbidity Weekly Report 52:1009.
- Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 30: 1269-1281.
- Barak E, Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N and Zilberstein D (2005) Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. Mol Biochem Parasitol 141:99-108.

- Bates PA and Rogers ME (2004) New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Cur Mol Med* 601-609.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J and Sacks DL (1998) 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. *J Exp Med* 188:1941.
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH and Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37(10): 1063-1075.
- Bezerra HS and Teixeira MJ (2001) Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:349.
- Borbulevych OY, Insaído FK, *et al.* (2007) Structures of MART-126/27-35 Peptide/HLA-A2 complexes reveal a remarkable disconnect between antigen structural homology and T cell recognition. *J Mol Biol* 372(5): 1123-1136.
- Bray RS (1983) Chemotactic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J Protozool* 30: 323-329.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV and Titus RG (2007) Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Protein Maxadilan on Mouse Macrophages. *Infect Immun* 2359-2365.

- Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, *et al.* (2009) Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for *Leishmania*. PLoS Pathog 5(5): e1000441. doi:10.1371/journal.ppat.1000441.
- Davis AJ, Murray HW and Handman E (2004) Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. Trends Parasitol 20(2): 73-76.
- Depaquit J, Lienard E, Verzeaux-Griffon A *et al.* (2008) Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA epidemiological consequences . Infect Gen Evol 8: 159-170.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27:305-18.
- Dhiman RC and Mittal PK (2000) A note on susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) populations to insecticides . J Com Dis 32: 65-66.
- Elfari M, Schnur LF, Strelkova MV, Eisenberger CL, Jacobson RL, Greenblatt CL, Presber W and Schonian G (2005) Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa. Microbes Infect 7: 93-103.
- Elnaiem D-EA, Meneses C, Slotman M and Lanzaro GC (2005) Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*. Ins Mol Biol 14 (2): 145-150.

- Erisoz Kasap O and Alten B (2005) Comparative demography of the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures. J Vector Ecol 31: 378-385 .
- Feliciangeli MD (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 18: 71-80.
- Ferro C, Pardo R, Torres M and Morrison AC (1997) Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol 34: 719-728.
- Forattini OP (1973) Entomologia médica (Psychodidae. Phlebotominae. Leishmaniose. Bartonelose). Ed Edgar Blucher Ltda, São Paulo.
- Fu YX; Li WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.
- Ghosh KN, Mukhopadhyay JM, Guzman H, Tesh RB and Munstermann LE (1999) Interspecific hybridization and genetic variability of *Phlebotomus* sandflies . Med Vet Entomol 13: 78-88.
- Gomes R, Teixeira C, *et al.* (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 7845-50.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boalart M, Croft SL, Dejeux P, Wasunna MK and Bryceson ADM (2002) Visceral Leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet 2: 494-501.
- Guernaoui S, Boumezzough, A, Pesson B and Pichon G (2005) Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. J Med Entomol 42: 697-701.

- Guilpin VO, Swardson-Oliver C, Nosbisch L and Titus RG (2002) Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437.
- Hamarsheh O, Presper W, Yaghoobi-Ershadir MR, Amro A, Al-Jawabreh A, Sawalha S, Al-Lahem A, Das ML, Guernaoui S, Seridi N, *et al.* (2009) Population structure and geographical subdivision of the Leishmania major vector *Phlebotomus papatasi* as revealed by microsatellite variation. *Med Vet Entomol* 23: 69-77.
- Hamarsheh O, Presber W, Abdeen Z, Sawalha S, Al-Lahem A and Schönián G (2007) Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Med Vet Entomol* 21: 270-277.
- Herrer A and Christensen HÁ (1975) Implication of *Phlebotomus* sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. *Science* 190: 154-155.
- Hudson RR, Boos DD and Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting population subdivision. *Mol Biol Evol* 9: 138-151.
- Hudson RR, Slatkin M and Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Jukes TH and Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York. pp.21-132.
- Kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22:439-45.

- Kato H, Anderson JM, Kamhawi S, Oliveira F, Lawyer PG, Pham VM, Sangare CS, Samake S, Sissoko I, Garfield M, *et al.* (2006) High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). BMC Genomics 7:226.
- Katz O, Waitumbi JN, Zer R and Warburg A (2000) Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. Am J Trop Med Hyg 62:145.
- Killick-Kendrick R (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp 1: 37-42.
- Kimura M 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature. 217: 624-626.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR and Ishikawa EAY (1994) The dermal leishmaniasis in Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz 89: 435-443.
- Lane RP (1986) The sand flies of Egypt (Diptera: Phlebotominae). Bull Br Mus Nat Hist (Ent) 52: 1-35.
- Lanzaro GC, Lopes AH, Ribeiro JM, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M and Titus RG (1999) Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. Insect Mol Biol 8:267.
- Lerner EA, Iuga AO and Reddy VB (2007) Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. Peptides 28(9): 1651-1654.
- Lewis DJ (1982) A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). Bull Br Mus Nat Hist (Ent) 45: 121-209.

- Li W-H (1997) Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Lynch M and Crease (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. Mol Biol Evol 7: 377-394.
- Marcondes CB (2001) Entomologia médica e veterinária. São Paulo, Ed. Atheneu.
- Milleron RS, Mutebi JP, Valle S, Montoya A, Yin, H, Soong L and Lanzaro GC (2004a) Antigenic diversity in Maxadilan a salivary protein from the sand fly vector of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 70: 278-285.
- Milleron RS, Ribeiro JMC, Elnaiem D, Soong L and Lanzaro GC (2004b) Negative effect of antibodies against Maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American Visceral Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 70: 286-293.
- Morrison AC, Ferro C and Tesh RB (1993) Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of american visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg 49: 68-75.
- Moura TR, Oliveira F, Novais FO, Miranda JC, Clarêncio J, *et al.* (2007) Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. PLoS Negl Trop Dis 1(2): e84. doi:10.1371/journal.pntd.0000084.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.
- Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G and Soong L (2004) Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. Infect Immun 72:1240.

- Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG (2008) Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. PLoS Negl Trop Dis 2(4): e226.
- Oliveira F, Jochim RC, Valenzuela JG and Kamhawi S (2009) Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. Parasitol Int 58: 1-5.
- Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, Fischer L, Ward J and Valenzuela JG (2006) From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. Vaccine 24(3): 374-390.
- Piscopo TV and Mallia AC (2006) Review: Leishmaniasis. Postgrad Med J. 82:649–657.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P and Perieres J (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of enzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp. 65: 111-125.
- Rogers ME, Bates PA (2007) *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog 3(6): e91.
- Sacks D and S Kamhawi (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol 55:453.
- Samuelson J, Lerner E, Tesh R and Titus R (1991) A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. J Exp Med 173:49.
- Schlein Y and Jacobson RL (1996) Why is man an unsuitable reservoir for the transmission of *Leishmania major*? Exp Parasitol 82: 298-305.

- Schlein Y and Muller G (1995) Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 32: 882-888.
- Schlein Y and Yuval B (1987) Leishmaniasis in the Jordan Valley. Attraction of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to plants in the field. J Med Entomol 24: 87-90.
- Schnur LF, Sarfstein R and Jaffe CL (1990) Monoclonal antibodies against leishmanial membranes react with specific excreted factors (EF). Ann Trop Med Parasitol 84: 447-456.
- Singh H and Raghava GPS (2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites." Bioinformatics 17(12): 1236-37.
- Sturniolo T, Bono E, *et al.* (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand database using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nat Biotechnol 17: 555-561.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
- Tesh RB and Guzman H (1996) Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty BJ, Marquadt WC. The biology of disease vectors. Univ Press Colorado, Niwot, Colorado, p. 117-127.
- Theodos CM, Ribeiro JM and Titus RG (1991) Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infect Immun 59:1592.
- Titus RG and Ribeiro JM (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science 239:1306.

- Tripet F, Clegg S, Elnaïem D-E, Ward RD (2009) Cooperative Blood-feeding and the Function and Implications of Feeding Aggregations in the Sand Fly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). PLoS Negl Trop Dis 3(8): e503.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL and Ribeiro JM (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. J Exp Med 194:331.
- Volfova V, Hostomska J, Cerny M, Votypka J, Volf P (2008) Hyaluronidase of Bloodsucking Insects and Its Enhancing Effect on *Leishmania* Infection in Mice. PLoS Negl Trop Dis 2(9): e294.
- Wheat WH, KE, Morris RV and Titus RG (2008) *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7 and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. J Immunol 180(12): 8286-8298.
- WHO (2007) Leishmaniasis. Burden of disease. World Health Organization. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>.
- Wilson ME, Jeronimo SM and Pearson RD (2005) Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. Microb Pathog 38: 147-60.
- Yin H, Norris DE and Lanzaro GC (2000) Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. Insect Mol Biol 9:309.
- Young DC and Duncan NA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem An Ent Inst 54: 1-881.

8. Memorial do aluno

Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior, nascido em 10 de Maio de 1984 na cidade do Recife – PE. Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), colando grau no dia 22 de Fevereiro de 2008. Portador do e-mail: cjsantifigo@hotmail.com e conta do Orkut: Carlos Figueirêdo Júnior.

Participou dos seguintes resumos publicados em congressos: (1) Avaliação da sintenia e dos padrões de utilização de códons sinônimos dos genes da ilha de alta patogenicidade de *Yersinia pestis*; (2) Tipagem de cepas brasileiras de *Yersinia pestis* através da amplificação por PCR dos "variable-number tandem repeats" (VNTR); (3) Evaluation of the genetic markers cacophony and period in the development of topologies applied to phylogeography of *Lutzomyia longipalpis*; (4) Bioinformatics analysis determined for design primers to the mitochondrial genome of the yeast *Dekkera bruxellensis*; (5) Otimização da extração de DNA mitocondrial de *Dekkera bruxellensis*; (6) Establishment and evaluation of degenerate and type-specific primers for detection and typing of bovine papillomavirus (BPV); (7) Análise do genoma mitocondrial de duas espécies de flebotomíneos epidemiologicamente importantes; (8) Desenho e avaliação de primers degenerados para o gene da tripsina de *Colossoma macropomum* (tambaqui).

Recebeu menção honrosa no 54º Congresso Brasileiro de Genética pela participação no prêmio de pós-graduação, com o trabalho intitulado: Avaliação da sintenia e dos padrões de utilização de códons sinônimos dos genes da ilha de alta patogenicidade de *Yersinia pestis*.