

Revisión

Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares

Elsa Nieves* y Maritza Rondon

Laboratorio de Parasitología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias
Universidad de Los Andes
Merida – Venezuela

Recibido 25 de julio de 2007; aceptado 10 de septiembre de 2007

Resumen: *Leishmania* requiere de dos hospedadores para completar su ciclo de vida, un vertebrado y un insecto vector. Los flebotominos vectores han logrado sobrevivir en coexistencia con el parásito *Leishmania*. Esta convivencia se ha logrado gracias a las diversas estrategias de defensa desarrolladas por el insecto, que incluyen estrategias de inmunidad innata. La sobrevivencia del parásito en el vector se debe a su vez, a mecanismos complejos de evasión y co-evolución. Reconocer estos mecanismos de interacción *Leishmania*-vector y profundizar su estudio molecular, puede contribuir al desarrollo de blancos para nuevas estrategias que reduzcan la capacidad vectorial de los flebotominos vectores de *Leishmania*.

Palabras clave: *Leishmania*, flebotominos, sobrevivencia, sistema inmune

Survival of the *Leishmania* parasite in the vector insect: molecular interactions

Abstrac: *Leishmania* require two hosts to complete their life cycle, a vertebrate and a vector insect. Vector phlebotomies have been able to survive in co-existence with the *Leishmania* parasite. This co-existence has been reached due to the diverse defense strategies developed by the insect, which include innate immunity strategies. On the other hand, the survival of the parasite in the vector is due to complex evasion and co-evolution mechanisms. To recognize these *Leishmania*-vector interaction mechanisms and to further their molecular study can contribute to the development of targets for new strategies that reduce the vectorial capacity of *Leishmania* vector phlebotomies.

Keywords: *Leishmania*, phlebotomies, survival, immune system

* Correspondencia:
E-mail: nevelsa@ula.ve

Introducción

La leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública en Venezuela y en otras partes del mundo. Su agente causal es *Leishmania*, un protozooario (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parásito de vertebrados, el cual produce diferentes manifestaciones clínicas y grados de severidad en los humanos. Los flebotominos (Diptera: Psychodidae) son insectos hematófagos vectores transmisores de *Leishmania* [1,2].

El desarrollo biológico de *Leishmania* en los flebotominos vectores es complejo, y los mecanismos involucrados en su sobrevivencia son poco entendidos [3-5]. Hay evidencias de susceptibilidad o resistencia a la infección con *Leishmania* en las diferentes especies de flebotominos, especialmente en las especies del Género *Phlebotomus*. Sin embargo, se ha estimado que de las 400 especies de *Lutzomyia* que existen en América, solo aproximadamente 50 están implicadas como transmisores. Tal susceptibilidad y refractoriedad se debe, en parte, a factores de especi-

ficidad especie-específica *Leishmania*-vector y a múltiples interacciones que ocurren dentro del sistema digestivo de los insectos [6-9].

Después de la entrada de las formas amastigotas de *Leishmania* al intestino del insecto vector, su ciclo de desarrollo continúa pasando por un proceso de división y de transformación, que va desde promastigotes procíclicos, nectomonas, leptomonas, haptomonas, paramastigotes, hasta la formación de promastigotes metacíclicos infectivos. Estos últimos son transmitidos por la picada de los flebotominos infectados a otro hospedador vertebrado sano [9-11].

Para poder completar su ciclo de vida en el insecto, *Leishmania* tiene que desarrollar estrategias adaptativas para sobrevivir a los mecanismos de injuria del insecto, y sobrellevar los cambios y agresiones de las condiciones fisiológicas específicas del intestino del flebotomino [9-13].

Barreras en la interacción *Leishmania*-vector

El éxito de la interacción *Leishmania*-vector depende de la eficiencia del sistema inmune del insecto. Los mecanismos de defensa de los insectos son pocos conocidos. Los insectos no tienen un complejo antígeno anticuerpo característico como el de los sistemas inmunes de vertebrados, pero tienen mecanismos de defensa de inmunidad innata con componentes de inmunidad celular y humoral [14].

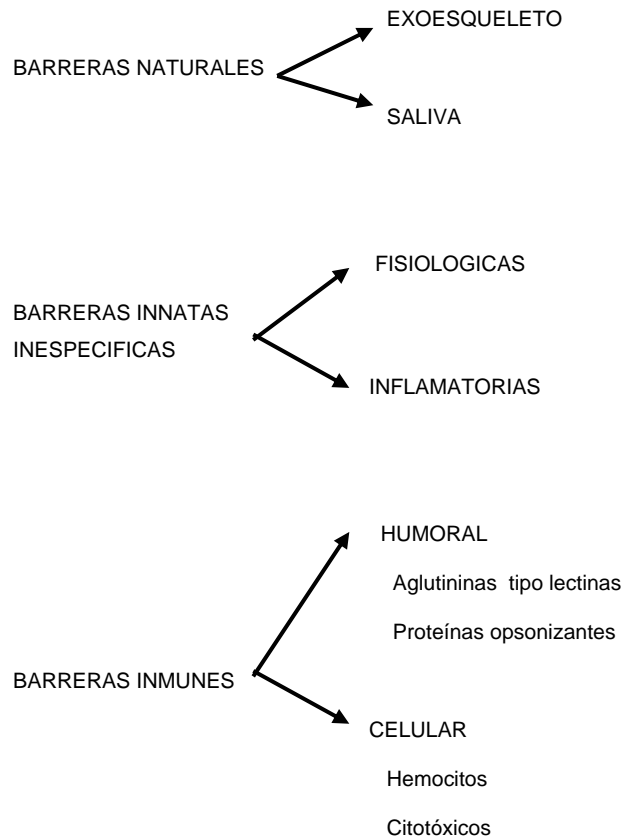
La primera barrera físico-química que el parásito *Leishmania* tiene que vencer en los insectos flebotominos vectores, está constituida por el exoesqueleto y la saliva (Fig. 1).

La segunda barrera la constituye el sistema inmune innato del insecto, representado por los mecanismos de defensa inespecíficos, establecidos por las condiciones fisiológicas especie-específicas del insecto, tales como, la formación de la matriz peritrófica, enzimas digestivas, diferentes regiones del sistema digestivo y cambios de pH en el intestino del insecto vector, entre otros [12,13].

La matriz peritrófica constituye uno de los grandes obstáculos, y consiste en una envoltura que cubre al bolo sanguíneo que se forma en el intestino medio abdominal en las primeras 4 horas post ingesta sanguínea. Está constituida por glicoproteínas, proteínas y fibrillas de quitina, cuya función es formar una barrera protectora para las células epiteliales del intestino medio abdominal del insecto, contra abrasiones de partículas provenientes del alimento y contra microbios. También permite la compartimentación de las enzimas digestivas, facilitando el proceso de digestión sanguínea [15].

El tercer mecanismo de defensa del insecto, está constituido por las células fagocíticas llamadas hemocitos y una respuesta tipo humoral, de componentes solubles [14,16]. La fagocitosis llevada a cabo por los hemocitos, incluye procesos de quimiotaxis, producción de hidrolasas lisosomales y de elementos citotóxicos, entre otros. Sin embargo, la respuesta principal de los flebotominos es la mediada por factores humorales solubles, tales como proteínas opsonizantes, aglutininas, hemolisinas, y la activación de mecanismos de oxidación, entre otros [14,17-22].

Figura 1. Mecanismo de resistencia de los flebotominos vectores



Los estudios muestran la presencia de aglutininas contra eritrocitos de humano y otros mamíferos en el tubo digestivo de varias especies de flebotominos. La mayoría son lectinas que están involucradas en el mecanismo de reconocimiento de la respuesta celular y/o humoral de los insectos, como moléculas receptoras así como reguladoras en la adhesión y diferenciación celular. Las lectinas, son glicoproteínas de origen no inmune, que se unen específicamente con varios sitios de unión de carbohidratos [17,19,23-25]. Por otro lado, la actividad de lectinas dentro del tracto digestivo de los flebotominos, está asociada principalmente al intestino medio torácico y abdominal. Dicha actividad es específica para cada especie y población geográfica de flebotominos, además de ser significativamente diferente entre macho y hembra, y entre hembras pre y post ingesta sanguínea [23]. Su presencia en los flebotominos parece ser importante en la defensa e interacción con *Leishmania*, ayudando a los promastigotes a mediar interacciones ligando-receptor con las células epiteliales del intestino para adherirse y formar rosetas entre ellos, manteniéndolos en grupos de promastigotes en el lumen del insecto [17,21,26].

Luego de la digestión sanguínea y adhesión de los promastigotes procíclicos y los promastigotes nectomonas a las microvellosidades de las células intestinales de los flebotominos, a través de la inserción del flagelo o recepto-

res corporales, se disparan mecanismos celulares de defensa del insecto, mediados principalmente por opsonización, aglutinación y citotoxicidad [14].

Migración al intestino medio torácico

Otro aspecto importante para completar el desarrollo de *Leishmania* en los flebotominos, luego de la digestión sanguínea, es la migración de los parásitos hacia las regiones anteriores del sistema digestivo del insecto y así, conseguir la salida a través de la picada del insecto a otro hospedador vertebrado sano. La migración es facilitada por la formación de un gel en el lumen del intestino del insecto. El gel solo está presente en el lumen de los intestinos infectados, producto tal vez, del daño a las células epiteliales y microvellosidades del intestino medio abdominal y/o a productos del sistema inmune del insecto [27]. En realidad, no se sabe si el origen del gel es producto de las secreciones del insecto y/o del parásito; lo cierto es que el gel podría facilitar la migración y adhesión de los promastigotes a las partes anteriores del intestino medio torácico [28,29].

La migración del parásito se logra también, gracias a la formación de un gradiente de carbohidratos que se genera en el lumen del intestino, producido por la digestión de la dieta rica en azúcares ingeridos por el insecto y acumulados en el divertículo, que se va dispersando a través del intestino medio torácico [13,28-30].

El desarrollo del gel en el lumen intestinal de los insectos infectados, además de facilitar la adhesión de los promastigotes metacíclicos, en el lumen del intestino medio torácico, y facilitar la migración de las distintas formas de promastigotes a las regiones quitinosas del intestino medio torácico, también juega un papel importante en el proceso de metaciclologénesis (gradiente de carbohidratos formado desde el divertículo), otro aspecto que estimula la migración. La metaciclologénesis constituye un proceso vital para la transmisión de *Leishmania* y consiste en el proceso de transformación y multiplicación de promastigotes no infectivos (procíclicos, paramastigotes, leptomonas, haptomonas y nectomonas) a formas infectivas de promastigotes metacíclicos, que poseen diferencias bioquímicas y funcionales [5,9].

Para que la transmisión de *Leishmania* ocurra, se deben transformar las formas de promastigotes desarrolladas en el intestino en promastigotes metacíclicos infectivos y además, llegar a la región torácica del insecto. La alimentación azucarada almacenada en el divertículo y la secreción de saliva en los insectos vectores, parecen ser factores determinantes en el proceso de metaciclologénesis. Los promastigotes metacíclicos están altamente adaptados para infectar y sobrevivir en el hospedador vertebrado. Esta adaptación morfofisiológica de los promastigotes metacíclicos está mediada por moléculas de carbohidratos especie-específicos que permiten la modificación de la molécula de LPG (lipofosfoglicano) que cubre la superficie del parásito. Lamentablemente, el mecanismo de la metaciclologénesis *in vivo* es pobremente conocido. Sin embargo, estudios *in vitro* demuestran que se encuentra relacionada

con la declinación de nutrientes, pH y disminución de cofactores para la producción de óxido nítrico [9,31]. Estas transformaciones coinciden con la finalización del proceso de digestión sanguínea y la subsiguiente ingesta de carbohidratos por parte de los flebotominos.

Por otro lado, cada vez que el flebotomino ingiere alimento, sanguíneo o azucarado, ocurre el proceso de salivación. La saliva de los flebotominos posee un conjunto de moléculas que juegan diferentes funciones para mediar el éxito de la ingesta sanguínea del insecto. Funciones que van desde vasodilatación (maxadilan), anticoagulación, anti-agregación de plaquetas, hemostasia, inhibición de la inflamación, citoquinas moduladoras de la respuesta inmune y también facilitadoras de la infectividad del parásito en el hospedador vertebrado [32-34]. Los estudios muestran que los componentes de la saliva son especie específicos y varían en calidad y cantidad de sus componentes [20]. Además, existen evidencias de que los componentes de la saliva promueven la sobrevivencia y transmisión de *Leishmania* al vertebrado [8,35].

Mecanismo de evasión de *Leishmania* en el flebotomino vector

La primera barrera presentada por los flebotominos, el exoesqueleto y la saliva, es superada por el parásito mediante una estrategia de entrada pasiva por medio de la cadena de alimentación, a través de la ingestión de sangre proveniente del hospedador vertebrado infectado, por parte del insecto. En relación a la saliva, además de facilitar la alimentación del insecto, por medio de un conjunto de productos, también posee sustancias con actividad protectora contra patógenos. Sin embargo, en la relación *Leishmania*-vector, estos componentes de la saliva actúan también como coadyuvantes que favorecen la entrada de *Leishmania* al hospedador invertebrado y su salida del vertebrado, capacidad desarrollada por medio de mecanismos de coevolución parásito hospedador. Logra así el parásito vencer la primera barrera del hospedador invertebrado y llegar al intestino medio abdominal para completar su ciclo de vida [16,36].

Los promastigotes procíclicos escapan de la matriz peritrófica, gracias a la ruptura de ésta por parte del parásito, producto de la secreción de quitinasa, logrando su salida y adhesión al epitelio intestinal antes de que ocurra la desintegración normal de la matriz peritrófica originada por el proceso de digestión del insecto [15,37-39].

Además, estudios de interacción con distintas especies de *Leishmania* demuestran que *Leishmania* es capaz de reducir los niveles de las enzimas digestivas en el intestino del insecto [6,40-43]. Aunque recientemente se han clonado y caracterizado algunos genes de proteasas alcalinas del proceso de digestión del insecto [44], poco se conoce acerca de la expresión y regulación de las enzimas digestivas de los flebotominos, y de como *Leishmania* es capaz de modularlas. No obstante, se conoce que las secreciones y la expresión de moléculas en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, permiten modular las enzimas digestivas del flebotomino vector, logrando resistir a la respues-

ta inmune y sobrevivir a los diferentes cambios fisiológicos del insecto [9].

Por otro lado, estudios de interacción *Leishmania*-vector muestran que el parásito es capaz de inhibir los movimientos peristálticos del intestino del insecto gracias a la excreción de los productos no digeridos durante la digestión sanguínea en el intestino del insecto [45,46].

El sistema inmune del flebotomino y las condiciones específicas del intestino, son los responsables de que una gran cantidad de parásitos sean eliminados durante las primeras horas de infección, produciendo su destrucción durante las primeras 72 horas postinfección [6,13]. Sin embargo, en la dupla parásito-vector, las diferentes formas de promastigotes son capaces de establecerse en el intestino del insecto vector y resisten al embate digestivo y al mecanismo de defensa de los flebotominos vectores. El parásito lo logra por medio de mecanismos de evasión y resistencia, a través de un proceso que incluye transformación, migración hacia el intestino medio torácico y secreción de sustancias y moléculas expresadas en su superficie. El proceso de transformación va desde amastigotes a promastigotes procíclicos, de promastigotes procíclicos a promastigotes nectomonas, promastigotes leptomonas, promastigotes haptomonas, paramastigotes y finalmente promastigotes metacíclicos [9,47].

Leishmania no solo debe sobrellevar el mecanismo inmune del insecto, sino también tienen que soportar los cambios hostiles del intestino, el embate de las enzimas digestivas, escapar de la matriz peritrófica, resistir el proceso de diuresis del insecto y expresar proteínas de adhesión al epitelio que impidan su expulsión durante el proceso de digestión. Todo esto lo logra por medio de la expresión en su superficie de moléculas especie específicas que le permiten la adhesión y sobrevivencia en el intestino del insecto vector [9,14,15,48-52]. Entre esas moléculas se encuentran los glicoconjugados, que incluyen moléculas ancladas a unidades repetidas de fosfoglicano. Estos fosfoglicanos consisten en glicoproteínas, tales como: proteofosfoglicano (PPG), implicado en la sobrevivencia de los promastigotes procíclicos, modulación enzimática en el vector y en la formación del gel por los promastigotes leptomonas [9,49] y glicolipidos, tales como lipofosfoglicanos (LPG), implicados en la adhesión de los promastigotes neptomonas y determinante específico parásito-vector, debido a un polimorfismo de la molécula *Leishmania* específico. Esta heterogeneidad es correspondida por los receptores de las células intestinales de los insectos vectores [53]. Los glicoconjugados también incluyen moléculas que no son fosfoglicanos, tales como glicoproteínas, como la metaloproteasa gp63 o leishmanosilín. Esta proteína de 63 kDa expresada por los promastigotes, se encuentra implicada principalmente con la virulencia en el hospedador vertebrado, sin embargo, los estudios reconocen otras funciones, dependiendo de la especie de *Leishmania* [9,49,51,54]. Su función en el insecto vector no está clara, sin embargo, estudios recientes muestran que la sobre expresión de gp63 no compensa al LPG defectuoso (mutante) en el insecto vector, como si ocurre en el hospedador vertebrado, lo que sugiere que en los flebotominos

no tiene función de cooperación con las moléculas de LPG [55].

Por otro lado, el desarrollo del gel en el lumen del intestino de los flebotominos infectados se debe considerar como un mecanismo que favorece la sobrevivencia de las formas de desarrollo del parásito, inclusive, de los promastigotes metacíclicos, los cuales no están adheridos al epitelio, al facilitarles adherirse a un sustrato en el lumen del insecto y no ser arrastrados por los movimientos peristálticos del intestino durante el proceso de excreción del alimento no digerido [28].

También son determinantes, en el proceso de migración y la metaciclo génesis de los parásitos hacia la región anterior del tracto digestivo, la participación de componentes derivados de los azúcares del divertículo, como los componentes de la saliva del insecto [9]. Los carbohidratos cumplen funciones muy importantes en el reconocimiento biológico. Los carbohidratos se unen específicamente a diferentes moléculas, tales como lectinas y glicoproteínas, mediando interacciones célula-célula y célula-epitelio. La glicosilación, una modificación covalente frecuente en las proteínas que genera una gran diversidad, dada la variedad de glicanos que se pueden producir a partir de un número relativamente limitado de monosacáridos [56].

Por otro lado, el genoma de *Leishmania* expresa en ambas formas de vida, promastigotes y amastigotes, estados de adaptación para su supervivencia y división. En cada uno de sus ambientes, en los flebotominos vectores o en los macrófagos de su hospedador vertebrado, expresa un grupo diferente de genes que le permiten su adaptación y sobrevivencia [57]. La adhesión de *Leishmania* en el epitelio de los insectos vectores, esta correlacionada con la presencia de glicoproteínas N-acetilgalactosamina y con la presencia de actividad semejante a lectina en la superficie del parásito [58].

El patrón de glicosilación de una proteína es dependiente del tipo celular que la produce, que puede modificarse ante diversas situaciones fisiológicas o ante la presencia de patologías. La glicosilación contribuye, por ejemplo, al correcto patrón de plegamiento de las proteínas; les confiere mayor resistencia a las proteasas y mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio, entre otras propiedades. Existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas: la N-glicosilación, caracterizada por uniones de enlaces entre una N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina y la O-glicosilación, en la cual se han identificado diferentes tipos; la más frecuente se encuentra determinada por la unión de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a serinas o treoninas presentes en el esqueleto polipeptídico. Este tipo de glicosilación se conoce como glicosilación tipo mucina, debido a que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacáridas presentes en las mucinas, glicoproteínas de muy alto peso molecular que recubren la superficie de diferentes tipos celulares y de parásitos, protozoarios y helmintos. Los glicoconjugados cumplen funciones muy importantes en la interacción que se establece entre *Leishmania* y el epitelio intestinal del hospedador invertebrado [56,59].

Patología en los flebotominos vectores

El parásito puede modular o inhibir los fenómenos fisiológicos del insecto vector mediante mecanismos de adaptación especie específica y por mecanismos de evasión, tales como, transformación de amastigote a promastigote procíclico, secreciones y/o excreciones del parásito, y expresión de proteínas de superficie, pudiendo así causar ruptura de la matriz peritrófica, alteraciones en los movimientos peristálticos del intestino y alteraciones enzimáticas en los flebotominos [40-42].

Aunque *Leishmania* no atraviesa el epitelio del insecto como ocurre con *Plasmodium* y mosquitos, y solo se desarrolla en el lumen del intestino, hay evidencias del efecto nocivo de *Leishmania* a nivel de la válvula esofágica de los flebotominos. La quitinasa, además de romper la matriz peritrófica del insecto, causa daño cuando los promastigotes

colonizan las regiones quitinosas de la válvula esofágica del flebotomino, impidiendo el proceso de alimentación normal del insecto [60-62]. También, se ha reportado daño celular en el intestino medio abdominal de los flebotominos infectados, a través de estudios ultraestructurales de las células epiteliales intestinales, las cuales presentan alteraciones, vacuolización y destrucción de las microvellosidades [63].

[Poco se conoce del efecto de la infección de *Leishmania* sobre la longevidad y fecundidad de los flebotominos. Sin embargo, se ha reportado que *Leishmania* reduce la longevidad y fecundidad en los flebotominos del viejo mundo [64]. Aunque *Leishmania* no rompe el epitelio intestinal, se han detectado células epiteliales con cromatina compacta en los flebotominos infectados, lo que pudiera disparar mecanismos apoptóticos, como ocurre en el modelo *Plasmodium* y mosquito [64,65]. (Tabla 1).

Tabla 1. Patología en el insecto vector ocasionado por *Leishmania*

Patología en el insecto vector	Referencia
Alteraciones digestivas Secreciones de las formas de promastigotes alteran los patrones normales de enzimas digestivas	Schlein et al 1983, Borovsky & Schlein 1987, Dillon & Lane 1993
Daño tisular Ruptura de la matriz peritrófica, secreción de quitinasa por los procíclicos, perforación de la matriz peritrófica antes del tiempo normal	Schlein et al 1991
Daño epitelio intestinal Alteraciones ultraestructurales de las células epiteliales y microvellosidades, degeneración y vacuolización	Nieves et al 2004
Daño válvula esofágica	Schlein et al 1992
Costo inmunitario Formación del gel en el lumen del intestino Inhibición de los movimientos peristálticos del intestino	Stierhof et al 1999, Roger et al 2002, 2004 Vaidyanathan 2004, 2005
Modificaciones comportamentales Los insectos realizan mas pruebas antes de la ingesta sanguínea Fecundidad y Mortalidad	Volf et al 2004 El Sawae et al 1994

Conclusiones

Los amastigotes de *Leishmania* consiguen sobrellevar los cambios fisiológicos del intestino del insecto por medio de mecanismos de adaptación y evasión a través del proceso de transformación. La transformación de las amastigotas a promastigotes procíclicos, que son formas capaces de secretar quitinasa, les permite escapar de la matriz peritrófica y adherirse a las microvellosidades de las células epiteliales y multiplicarse. Por la transformación a promastigotes nectomonas y leptomonas, son capaces de resistir a los cambios de la digestión sanguínea; por la transformación a haptomonas, paramastigotes, (cuyo rol no ha sido clarificado) y a promastigotes metacíclicos, resisten en el lumen del intestino y migran hacia el intestino medio torácico con la capacidad de ser infectivos para el hospedador vertebrado.

Leishmania utiliza una variedad de proteínas que median su adhesión al epitelio; estas, además le permiten la pro-

tección contra las enzimas digestivas, por medio de la modulación y/o inhibición de éstas, lo que le permite a su vez, superar las condiciones adversas del intestino, logrando así su sobrevivencia y reproducción. Ello es posible, gracias a que existe una compatibilidad de interacciones moleculares entre las dos especies parásito y vector, producto de una co-evolución.

Aunque *Leishmania* logra sobrevivir y completar su desarrollo en los flebotominos vectores, evadiendo los mecanismos de defensa implementados por el insecto, existe un costo en la patogenidad para los flebotominos, evidenciado por varios estudios, que muestran cierto daño en diferentes niveles del insecto vector, tales como, cambios fisiológicos, comportamentales, celulares e inhibitorios, que podrían ocasionar mortalidad en los flebotominos infectados. Es necesario profundizar los estudios relacionados con la interacción *Leishmania*-vector, principalmente a nivel molecular, que pudieran contribuir al desa-

rollo de nuevas estrategias que reduzcan la competencia vectorial de los flebotominos transmisores.

Referencias

1. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 230-50.
2. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9.
3. Walters LL, Irons KP, Chaplin G, Tesh RB. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *J Med Entomol* 1993; 30: 699-718.
4. Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994; 79: 215-8.
5. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 2003; 33:1027-34.
6. Schlein Y, Warburg A, Schur LF, Shlomai J. Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* on differentially induced digestion. *Acta Trop* 1983; 40: 65-70.
7. Hanafi HA, El Sawaf BM, Fryauff DJ, Beavers GM, Tetreault GE. Susceptibility to *Leishmania major* of different populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera:Psychodidae) from endemic and non-endemic regions of Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 1-57.
8. Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PFP, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitol* 2000; 121: 25-33.
9. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22: 439-45.
10. Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65: 37-42.
11. Schlein, Y. *Leishmania* and sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today* 1993; 9: 255-8.
12. Ready PD. Sand fly evolution and its relationships to *Leishmania* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 589-90.
13. Pimenta PFP, Secundino NFC, Nieves BEE. Interação *Leishmania*-Hospedeiro Invertebrado. En: *Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil. Cap. 5. Editorial FIOCRUZ, 2003. 360 pp.*
14. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol* 2006; 22: 262-8.
15. Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitol* 1997; 115: 359-69.
16. Dimopoulos G. Insect immunity and its implications in mosquito-malaria interactions. *Cellular Microbiol* 2003; 5: 3-14.
17. Wallbanks K R, Ingram R A, Molyneux D H. The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts: evidence for lectin activity. *Trop Med Parasitol* 1986; 37: 409-13.
18. Grubhlffer L, Muska M, Volf P. Midgut hemagglutinins in five species of tsetse flies (*Glossina* spp): two different lectin systems in the midgut of *Glossina tachinoides*. *Folia Parasitol* 1994, 41: 229-32.
19. Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J. Blocked stomodeal valve of insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models *Int J Parasitol* 2004; 34:1221-7.
20. Volf P, Tesarova P, Nohynkova E. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotominae sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* 2000; 14: 251-6.
21. Volf P, Killick-Kendrick R, Bates PA, Molyneux DH. Comparison of the haemagglutination activities in gut and head extracts of various species and geographical populations of phlebotomine sandflies. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88: 337-40.
22. Armstrong PB, Melchior R, Quigley JP. Humoral immunity in long-lived arthropods. *J Insect Physiol* 1996; 42: 53-64.
23. Volf P, Killick-Kendrick R. Post-engorgement dynamics of haemagglutination activity in the midgut of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 1996; 10: 247-50.
24. Volf P, Kiewegova A, Svobodova M. Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med Vet Entomol* 1998; 12: 151-4.
25. Volf P, Skarupová S, Man P. Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem* 2002; 269: 6294-6301.
26. Cuervo PE. Uso de las lectinas en la comprensión de la biología de *Leishmania*. *Medicas UIS* 1998; 12: 320-6.
27. Roger ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430: 463- 7.
28. Ilg T, Stierhof YD, Craik D, Simpsom R, Handman E, Bacic A. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 1996; 271: 583-96.
29. Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E, Ilg T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like tree-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol* 1999; 78: 675-89.
30. Kamhawi S. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 2004; 119: 329-41.
31. Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 2001; 292: 285-7.
32. Hall LR, Titus RG. Sandfly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 1995; 155: 3501-16.
33. Charlab R, Valenzuela JG, Rowton D, Ribero JMC. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15155-60.
34. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasitec Immunol* 2000; 22: 319-31.
35. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Nobentrauth N, Rowton E, Ribero J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998; 188: 1941-5.
36. Jania MT, Romero CT, Bezerril BA, Barral-Neto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2006; 22: 32-40.
37. Roger ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective

- stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol 2002; 124: 495-507.
38. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. Exp Mol Pathol 2002; 72: 132-41.
 39. Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. Proc R Soc Lond B 1991; 245: 121-6.
 40. Soares RPP, Barron T, McCoy-Simandle K, Svobodova M, Warburg A, Turco SJ. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. Exp Parasitol 2004; 107: 105-14.
 41. Schlein, Y, Romano H. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). Exp Parasitol 1986; 62: 376-80.
 42. Borovsky D, Schlein Y. Tripsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence Med Vet Entomol 1987; 1: 235-42.
 43. Dillon RJ, Lane RP. Influence of *Leishmania* infection on blood meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. Parasitol Res 1993; 79: 492-6.
 44. Ármalo-Ortigao J M. Cloning and characterization of tripsin and chymotrypsin-like proteasas from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. Insect Biochem Mol Biol 2003; 33: 163-71.
 45. Vaidyanathan R. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. J Invertebr Pathol 2004; 87: 123-8.
 46. Vaidyanathan R. Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) and its function in the vector sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera:Psychodidae). J Med Entomol 2005; 42: 142-52.
 47. Nieves E, Pimenta FPP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the Sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera:Psychodidae). J Med Entomol 2000; 37: 134-40.
 48. Nieves E, Pimenta FPP. Influence of vertebrate blood meals on sand fly *Lutzomyia (Vianna) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Amer J Trop Med Hyg 2002; 67: 640-7.
 49. Soares RP. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis Int J Parasitol 2005; 35: 245-53.
 50. Turco SJ. The lipophosphoglycan of *Leishmania*. Parasitol Today 1988; 4: 255-7.
 51. Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions PNAS 2000; 97: 406-11.
 52. Turco SJ, Spayh GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. Trends Parasitol 2001; 17: 223-6.
 53. Dillon RJ, Lane RP. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. Parasitol 1999; 118: 27-32.
 54. Hajmova M Doown-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia Longipalpis*. Microbes Infect 2004; 6: 646-9.
 55. Sádlová J, Volf P, Victor K, Dujardin JC, Votýpka J. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. Folia Parasitol 2006; 53: 81-90.
 56. Freire T, Robello C, Casaravilla C, Alvarez DE, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. Actas Fisiol 2002; 8: 89-107.
 57. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. Mol Biochem Parasitol 2007; 152: 35-46.
 58. Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect 2007; 9: 317-24.
 59. Cuervo P, Saabóia-Vahia L, Silva-Filho FC, Fernandes O, Cupolillo E, De Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. Parasitol 2006; 132: 77-185.
 60. Schlein Y, Jacobson L, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 9944-9.
 61. Barillas-Mury C, Wizel B, Han Y. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. Insect Biochem Mol Biol 2000; 30: 429-42.
 62. Ferguson HM; Read A. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved. Trends Parasitol 2002; 18: 256-61.
 63. Nieves E, Dávila-Vera D, Palacios-Prü E. Daño ultraestructural del intestino medio abdominal de *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae) ocasionado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Parasitol Latinoam 2004; 59: 115-22.
 64. El Sawae BM, El Sattar SA, Shehata MG. Reduced longevity and fecundity in *Leishmania* infected sand flies. Am. J Trop Med Hyg 1994; 51: 767-70.
 65. Hopwood JA, Ahmed AM, Polwart A, Williams GT, Hurd H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. J Exp Biol 2001; 204: 2773-80.