

**JULIANA MACHADO AIRES**

**Maxadilan (Max) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*:**

**Detecção de anticorpos anti-Max em pacientes com**

**Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e expressão**

**gênica e protéica de Max símile em *Lutzomyia neivai***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em Medicina  
Área de Concentração: Clínica Médica.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Ferreira Roselino**

**RIBEIRÃO PRETO**

**-2006-**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Aires, Juliana Machado

Maxadilan (Max) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: Detecção de anticorpos anti-Max em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e expressão gênica e protéica de Max símile em *Lutzomyia neivai*.

124p.; 29,7 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Ferreira Roselino

1. Maxadilan 2. Leishmaniose Tegumentar Americana 3. *Lutzomyia neivai*  
4. Anticorpos anti-Max 5- Gene Max símile 6- Proteína Max símile

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido Guilherme, sempre sábio em seus conselhos  
e companheiro em seus incentivos.  
Seu amor incondicional foi importante para seguir em frente.

Ao meu filho Bernardo,  
presença constante nesta fase final, e com apenas 4 meses, comportou-se  
com muita tranquilidade e paciência, aguardando a finalização dessa etapa  
de minha vida.

Aos meus pais, Fernando e Anália,  
um tão próximo e o outro tão vivo nas lembranças,  
que me guiam na escolha dos melhores caminhos.

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Ferreira Roselino, pela confiança em mim depositada, por compreender os meus anseios e me dar o incentivo necessário para atingir os meus objetivos. Agradeço-lhe, também, pela constante orientação científica e profissional, assim como pela oportunidade de compartilharmos vários momentos, onde pudemos extravasar nossas preocupações e nossas conquistas.

Ao Prof. Dr. José Fernando C. Figueiredo, meu co-orientador, por sua agradável colaboração, ensinando-nos com tranquilidade e acalentando nossas inquietudes.

Foi uma honra e um privilégio ter, vocês dois, como professores e orientadores, e principalmente como amigos.

À Margarida M. P. Nascimento, pelo cuidado e dedicação aos meus experimentos. Agradeço ainda pela torcida por bons resultados e pelo apoio nas horas difíceis. Todos estes momentos foram mais leves devido ao seu carinho e amizade.

À Sandra Rodrigues, por sua disposição em ensinar-me e ajudar-me nos experimentos e por mantê-los, com extremo zelo, mesmo na minha ausência.

Ao Prof. Dr. Ethan A. Lerner, pelo envio da proteína Maxadilan, a fonte de nossas primeiras idéias e a essência deste projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Falcão, por gentilmente ceder-nos exemplares de *Lu. longipalpis*.

Ao Prof. Dr. Cláudio Casanova, pela sua disposição em coletar e identificar exemplares de *Lu. neivai*, assim como nos orientar nesta nova área que nos aventuramos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Galati, por sua gentileza em dividir conosco seus conhecimentos.

À Divisão de Dermatologia - professores, médicos assistentes, médicos residentes, equipe de enfermagem e funcionários - pela

oportunidade e colaboração na conclusão de mais uma etapa de minha formação.

Aos colegas pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular, que sempre estiveram disponíveis para ajudar-me e ensinar-me.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pelo auxílio financeiro e estímulo à pesquisa em nosso país.

À FAEPA – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - por financiar nossos projetos.

Aos meus irmãos, Guilherme, Larissa e Vinícius, e à tia Sandra que sempre estiveram na torcida.

À minha prima Christiane, que me acolheu em temporadas em sua casa, tornando esses dias alegres e familiares.

À Lúcia, Antônio Paulo e Letícia, pelo carinho e incentivo.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para este feito, minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA).....	2
1.1.1. Histórico da LTA.....	3
1.1.2. Ciclo de vida da leishmania.....	3
1.1.3. Classificação das espécies de leishmanias.....	8
1.1.4. Formas clínicas da LTA.....	10
1.1.5. Epidemiologia da LTA.....	13
1.2. MAXADILAN.....	22
1.2.1. <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).....	22
1.2.2. <i>Phlebotomus papatasi</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).....	31
1.2.3. <i>Lutzomyia intermedia</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).....	34
1.2.4. <i>Lutzomyia whitmani</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).....	34
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. CASUÍSTICA.....	39
3.2. GRUPO CONTROLE.....	40
3.3. ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-Max.....	43
3.4. CONTRAIMUNOELETROFORESE (CIE) PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-Max.....	45
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA, DNA E DE PROTEÍNAS.....	45
3.6. ELETOFORESE DE PROTEÍNAS.....	47

3.7. IMMUNOBLOTTING.....	48
3.8. <i>DOT BLOT</i> .....	49
3.9. IMUNIZAÇÃO DE COELHO CONTRA A PROTEÍNA Max.....	49
3.10. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) PARA PESQUISA DE Max EM <i>Lu. longipalpis</i> E <i>Lu. neivai</i> .....	50
3.11. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA POR PCR-RFLP (PCR- <i>RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM</i> ).....	52
3.12. SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR.....	52
3.13. RT-PCR ( <i>REVERSE TRANSCRIPTION-PCR</i> ).....	54
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. TÍTULOS DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-Max PELO MÉTODO ELISA.....	56
4.1.1. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo a forma clínica.....	58
4.1.2. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo a resposta da IRM (INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO).....	59
4.1.3. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo a resposta da RIFI (REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA).....	60
4.1.4. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo o encontro de parasitos no exame histopatológico de pele ou mucosa.....	61
4.1.5. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo o tempo de evolução clínica da LTA forma cutânea.....	62
4.2. TÍTULOS DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-Max POR CIE (CONTRAIMUNOELETOFORESE).....	63
4.2.1. Anticorpos anti-Max por CIE em amostras de soro do grupo controle.....	63

4.2.2. Anticorpos anti-Max por CIE em soros de coelhos.....	65
4.3. EXPRESSÃO PROTÉICA DE Max EM <i>Lu. neivai</i> POR ELETROFORESE DE PROTEÍNAS E IMMUNOBLOTTING.....	68
4.3.1. Eletroforese de proteínas.....	68
4.3.2. <i>Immunoblotting</i> (IB).....	69
4.4. DOT BLOT COM PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE <i>Lu. longipalpis</i> E <i>Lu. neivai</i> .....	72
4.4.1. <i>Dot blot</i> com soros de pacientes com LTA e controles.....	72
4.4.2. <i>Dot blot</i> com soros de coelhos.....	74
4.5. EXPRESSÃO GÊNICA DE Max EM <i>Lu. neivai</i> .....	75
4.5.1. PCR e restrição do fragmento de DNA (PCR-RFLP).....	75
4.5.2. RT-PCR.....	77
4.5.3. Seqüenciamento dos produtos da PCR.....	78
5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

## ANEXOS



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A: Ciclo da leishmaniose.....	6
Figura 1B: Ciclo da <i>Leishmania</i> em vetor competente.....	6
Figura 2: Distribuição da LTA no mundo.....	13
Figura 3: Mapa identificando as áreas ocupadas pelos municípios com registro de incidência de LTA, Estado de São Paulo, 1986 a 1995.....	15
Figura 4: Mapas identificando as áreas ocupadas pelos municípios com as correspondentes espécies de flebotomíneos, Estado de São Paulo, 1986 a 1995.....	17
Figura 5: A. Seqüência de aminoácidos do peptídeo Max. B. Estrutura secundária do Max apresentando duas $\alpha$ -hélices (10-22 e 47-61) e uma ponte dissulfeto (linha pontilhada).....	26
Figura 6: Seqüência de aminoácidos da proteína Max.....	28
Figura 7: Gel de acrilamida 12,5% mostrando eletroforese dos diferentes lotes da proteína Max (7kDa).....	44
Figura 8: Gene do Maxadilan.....	51
Figura 9: Gene do Max.....	53
Figura 10: Títulos de anticorpos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos soros de pacientes com LTA e no grupo controle.....	57
Figura 11: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA forma cutânea e LTA forma mucosa.....	58
Figura 12: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com IRM negativa (-) e LTA com IRM positiva (+).....	59
Figura 13: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com RIFI negativa (-) e LTA com RIFI positiva (+).....	60
Figura 14: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com parasito ausente (-) e LTA com parasito presente (+) no histopatológico de pele ou mucosa.....	61
Figura 15: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA,	

nos grupos controle, LTA 0-4 meses, LTA 4-8 meses e LTA maior que 8 meses.....	63
Figura 16: Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros do grupo controle.....	65
Figura 17: Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros de coelho imunizado (i) e não imunizado sadio (s).....	66
Figura 18: Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros de coelho imunizado (i) e não imunizados sadios (s).....	67
Figura 19: Gel de acrilamida 12,5% mostrando eletroforese de proteínas de amostras de <i>Lu. neivai</i> e <i>Lu. longipalpis</i> comparadas à proteína Max (aproximadamente 7kDa).....	69
Figura 20: <i>Immunoblotting</i> da proteína Max incubada com soro de coelho imunizado contra Max .....	70
Figura 21: <i>Immunoblotting</i> com proteína extraída dos vetores <i>Lu. longipalpis</i> e <i>Lu. neivai</i> e anticorpos anti-Max de coelho sensibilizado contra Max.....	71
Figura 22: <i>Dot Blot</i> com amostras de proteínas de <i>Lu. longipalpis</i> e de <i>Lu. neivai</i> e soros de pacientes com LTA.....	73
Figura 23: <i>Dot Blot</i> com amostras de proteínas de <i>Lu. longipalpis</i> e de <i>Lu. neivai</i> e soros de controles.....	73
Figura 24: <i>Dot Blot</i> com amostras de proteínas extraídas de <i>Lu. longipalpis</i> e de <i>Lu. neivai</i> e soro de coelho.....	74
Figura 25: Gel de acrilamida 10% mostrando produtos de PCR amplificados para Max (à esquerda do marcador de PM) e após a digestão enzimática (à direita do marcador de PM).....	76
Figura 26: Gel de acrilamida 10% mostrando resultado da RT-PCR com par de <i>primers</i> específicos para seqüência do gene Max, utilizando-se amostras de RNA de <i>Lu. longipalpis</i> e de <i>Lu. neivai</i> .....	77
Figura 27: Seqüenciamento do produto de 248 bp obtido pela PCR para Max de DNA extraído de <i>Lu. neivai</i> .....	78
Figura 28: Gene do Maxadilán descrito para <i>Lu. longipalpis</i> .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos e clínico-laboratoriais dos pacientes com LTA, atendidos no HCFMRP-USP, no período de 1999 a junho de 2004.....	41
Tabela 2: Títulos de anticorpos séricos anti-Max, pela técnica da CIE, no grupo controle.....	64

## RESUMO

As leishmanioses são zoonoses que afetam pele, mucosas ou vísceras, resultantes do parasitismo dos macrófagos pelo protozoário do gênero *Leishmania*, inoculado no organismo pela picada de flebótomos. Na região de Ribeirão Preto, há registro de casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo *Leishmania Viannia braziliensis* e *Leishmania Leishmania amazonensis* as espécies implicadas, e *Lutzomyia neivai* seu vetor. Maxadilan (Max) é um peptídeo, presente na saliva de *Lu. longipalpis*, vetor da leishmaniose sistêmica ou calazar. Durante o repasto sanguíneo, seus mecanismos de vasodilatação e imunomodulação promovem campo perfeito para injeção do parasito no hospedeiro, produzindo resposta inflamatória mínima local. Sua capacidade imunomodulatória, desviando a resposta Th1 para Th2, implicam-no como fator de promoção da infecção. Diante destas evidências, Max (proteína e cDNA) tem sido empregado em vacina experimental para leishmaniose, conferindo proteção contra a infecção. Como a expressão de Max se limita exclusivamente a *Lu. longipalpis*, teve-se por objetivos: 1) detectar anticorpos anti-Max em soro de pacientes com LTA e 2) verificar a expressão do gene e da proteína Max em *Lu. neivai*, vetor na região estudada. Anticorpos anti-Max foram detectados por ELISA no soro de 41 pacientes com LTA e 63 controles. A extração de proteínas, DNA e RNA de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai* foi realizada pelo método Trizol. A detecção de proteínas foi feita por eletroforese. Para a detecção da proteína Max em ambos os vetores foram realizados *Dot Blot* e *Immunoblotting* (IB), utilizando-se soros de coelho imunizado contra Max, soros de coelhos sadios de biotério, e soros de pacientes com LTA e controles. A amplificação do gene Max foi feita por PCR-

RFLP com primers específicos, e digestão com as enzimas Hha I e Rsa I, além do seqüenciamento do DNA. A expressão do gene Max foi obtida por RT-PCR. Títulos maiores de anticorpos anti-Max foram observados na LTA ( $p=0,0043$ ). A eletroforese mostrou frações protéicas semelhantes para os dois vetores. A fração de peso molecular similar à proteína Max foi confirmada por IB com soro de coelho imunizado. Os grupos LTA, controles e coelhos de biotério apresentaram anticorpos contra proteínas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* por *Dot blot*, inferindo-se serem anticorpos anti-Max. A amplificação de fragmento do gene Max, em amostra de *Lu. neivai*, foi confirmada por PCR-RFLP, e seu seqüenciamento mostrou 66,5% de homologia com o gene de *Lu. longipalpis*. A RT-PCR mostrou amplificação do cDNA da amostra de *Lu. neivai*, confirmando que o gene Max guarda homologia quando expresso em *Lu. neivai*. Presença de anti-Max nos grupos estudados tornou imprescindível a pesquisa de Max no vetor da LTA da região, registrando pela primeira vez a expressão protéica e gênica de Max símile em *Lu. neivai*. A detecção de anti-Max em controles e em animais de laboratório confirma exposição natural a picadas de flebótomos. Títulos de anti-Max maiores na LTA sugerem que exposição prévia e natural à picada e, conseqüentemente, à proteína Max, não protege contra a evolução da doença, desfavorecendo seu emprego isolado em vacinação.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, Maxadilan, anticorpos anti-Max, expressão protéica, expressão gênica, Max símile, *Lutzomyia neivai*.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonoses that affect skin, mucosa or viscera, resulting from the parasitism of macrophages by the protozoa *Leishmania*, which is inoculated in the organism by sand fly bite. In the region of Ribeirão Preto, autochthons cases of American Tegumentar Leishmaniasis (ATL) are present, being *Leishmania Viannia braziliensis* and *Leishmania Leishmania amazonensis* mainly species related, and *Lutzomyia neivai* as their vector. Maxadilan (Max) is a peptide present in the *Lutzomyia longipalpis* saliva, vector of systemic leishmaniasis. Their vasodilatory and immunomodulatory properties promote a perfect scenario for the inoculation of parasite in the host, with minimum inflammatory response. Its immunomodulatory capacity switches Th1 to Th2 cytokine profile promoting infection. Therefore, Max (protein and cDNA) has been used in experimental vaccines for leishmaniasis. Since Max is shown exclusively in *Lu. Longipalpis* saliva, the purposes of our study were: 1) to detect antibodies anti-Max in sera samples from patients with ATL and 2) to verify the genetic and protein expression of Max in *L. neivai*, vector of ATL in the area of study. Antibodies anti-Max were detected by ELISA in sera from 41 patients with ATL and 63 controls. The extraction of proteins, DNA and RNA from *Lu. longipalpis* and *Lu. neivai* was accomplished by the method Trizol, following for the detection of proteins by electrophoresis. Dot Blot and Immunoblotting (IB) were performed for the detection of Max in both vectors, using immune rabbit's serum against Max, sera from healthy rabbits, and from patients with ATL and controls. Max gene's fragment was amplified by PCR-RFLP with specific primers following by enzymatic restriction with Hha I and Rsa I, besides DNA sequencing. Max gene expression was performed by RT-PCR. Increased

titles of anti-Max were observed in ATL ( $p=0.0043$ ). Electrophoresis of proteins showed similar fractions for both vectors, and a protein fraction with molecular weight similarity to Max was confirmed by IB with immune rabbit serum. Patients with ATL, controls and healthy rabbits presented antibodies to proteins of *Lu. longipalpis* and *Lu. neivai* by Dot blot, inferring that these antibodies could be anti-Max. Amplification of Max's genetic fragment was confirmed by PCR-RFLP, which DNA sequencing showed 66.5% of homology. RT-PCR showed amplification of cDNA from *Lu. neivai* samples, supporting the idea that the Max gene has homology when expressed in *Lu. neivai*. The description of antibodies anti-Max in ATL patients and controls turned indispensable the research of Max in the phlebotomy vector of ATL in the area of study. Protein and genetic expression of Max-simile in *Lu. neivai* was registered for the first time. Antibodies anti-Max detection in controls and rabbits confirms the previous exposition to sand fly bites. Increased titles of anti-Max in ATL patients suggest that previous and natural exposition to the bite and, consequently, to the protein Max, do not protect them against the disease, therefore discouraging its isolated employment in vaccination.

Keywords: American tegumentar leishmaniasis, Maxadilan, antibodies anti-Max, protein expression, genetic expression, Max-simile, *Lutzomyia neivai*.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



As leishmanioses são zoonoses que afetam a pele, mucosas ou vísceras, resultantes do parasitismo dos macrófagos pelo protozoário do gênero *Leishmania*, inoculado no organismo pela picada de um inseto flebótomo (TORO, 1983). É uma doença primária de pequenos mamíferos, principalmente roedores, desdentados e marsupiais - leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa - e de canídeos - leishmaniose visceral (LV) (TORO, 1983).

A infecção, na maioria das espécies reservatório, tende a ser benigna e inaparente, pois a relação entre parasito e o hospedeiro é balanceada, enquanto, no hospedeiro acidental, a infecção pode ocasionar lesões destrutivas da pele, ou alterações nos órgãos internos, as quais podem ser fatais (LAINSON; SHAW, 1978). A evolução para cada uma das diferentes formas clínicas da leishmaniose dependerá da espécie de leishmania infectante e da relação parasito-hospedeiro. Todavia, todas as formas desta infecção protozoária apresentam três fatores patogênicos em comum: macrófagos teciduais são alvos para a replicação do parasito em seu intracelular; a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro determina a expressão e evolução da doença; e infecção tecidual persistente pode ocorrer (MURRAY et al., 2005).

### **1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**

A leishmaniose tegumentar americana é definida como doença infecciosa crônica, não contagiosa, caracterizada pelo comprometimento da pele, mucosa e cartilagens. Causada por diferentes espécies de leishmania, até o momento, são reconhecidas 14 espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*. Pode produzir ampla variedade de lesões, por vezes dificultando e retardando o diagnóstico clínico (SAMPAIO; RIVITTI, 1998).

### 1.1.1. Histórico da LTA

Embora a leishmaniose cutânea existisse há centena de anos, uma das primeiras e mais importantes descrições clínicas da doença foi feita em 1756, por Alexander Russel, após examinar um paciente turco. Segundo dados da época, a doença acometia nativos durante a infância, que geralmente apresentavam lesões em face, embora alguns também tivessem lesões nas extremidades. Os estrangeiros somente manifestavam doença alguns meses após sua chegada na área endêmica. Poucos escapavam de ter lesões e, raramente, acometia o mesmo indivíduo mais de uma vez. Representações de lesões cutâneas e deformidades faciais são encontradas em cerâmicas do período pré-Inca do Equador e Peru, datadas do primeiro século DC. Elas mostram que as formas cutânea e cutâneo-mucosa prevaleciam no Novo Mundo desde aqueles tempos (WHO, 2005).

Alexandre Cerqueira, em 1885 na Bahia, identificou primeiramente a moléstia e suspeitou do papel dos flebotomíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil (VIANNA, 1912).

### 1.1.2. Ciclo de vida da leishmania

O gênero *Leishmania* pertence à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida (REY, 1992). Em seu ciclo vital, os parasitos alternam entre formas amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado e formas promastigotas extracelulares em flebótomos, seus vetores biológicos.

A infecção inicia-se quando o flebótomo, ao se alimentar no vertebrado contaminado, infecta-se com formas amastigotas, as quais podem ser encontradas no

sangue circulante ou nos macrófagos da pele do hospedeiro. Dentro do aparelho digestivo, inicia-se o processo de diferenciação do parasito *Leishmania* em vários estágios distintos de desenvolvimento à medida que migra da sua porção posterior para a anterior, transformando-se em sua forma promastigota (KAMHAWI, 2006). Ao se alimentar em um novo hospedeiro, injeta saliva contendo formas infectantes do parasito, que se ligam a um ou mais receptores dos macrófagos para proceder a endocitose, sendo subseqüentemente fagocitadas, encapsuladas no vacúolo endossomal, que se funde com lisossomos. Há a perda do flagelo, com encolhimento do parasito, que se transforma na forma amastigota, multiplica-se, podendo chegar a romper o vacúolo para infectar outros macrófagos. As formas amastigotas estão adaptadas à temperatura corporal dos mamíferos e ao meio ácido dos fagolisossomos (GREVELINK; LERNER, 1996; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON, SHAW, 1978; PEARSON; SOUSA, 1996) (Figura 1A).

Cada estágio de diferenciação caracteriza-se por mudanças morfológicas e funcionais, necessárias para garantir sua sobrevivência dentro do flebótomo. As formas amastigotas se diferenciam em pequenos promastigotas procíclicos, que possuem flagelo curto, são relativamente resistentes à ação de enzimas digestivas e iniciam o primeiro ciclo de multiplicação dentro do vetor. Posteriormente, evoluem para formas nectomonadas (aderentes ao epitélio ao tubo digestivo), lectomonadas (segundo ciclo de multiplicação) e haptomonadas sucessivamente. Por último, apresentam-se como formas metacíclicas, infectantes, adaptadas para eficiente transmissão ao hospedeiro vertebrado (GREVELINK; LERNER, 1996; KAMHAWI, 2006; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON; SHAW, 1978). São formas alongadas, medindo 15-26 x 3 µm de diâmetro, possuem núcleo central e flagelo, que se estende a partir do pólo anterior do protozoário (GONTIJO; CARVALHO,

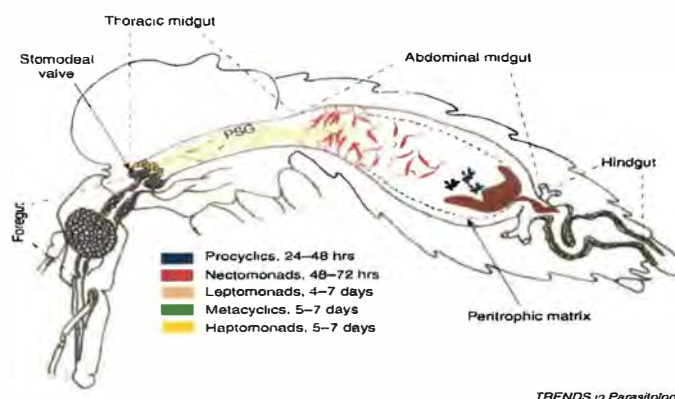
2003; MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987; PEARSON; SOUSA, 1996; TORO, 1983). Este flagelo proporciona mobilidade ao parasito, além de contribuir para a sua fixação ao epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (PESSOA; MARTINS, 1982) (Figura 1B).

As formas amastigotas encontram-se no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, medem 2-3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentando forma ovóide, com um núcleo excêntrico e citoplasma claro, onde se observa estrutura mitocondrial especializada - o cinetoplasto - que possui forma alongada, estendendo-se circularmente por todo o protozoário, apresentando na proximidade do flagelo, que é rudimentar, filamentos entrelaçados e compactos, que correspondem ao DNA. Este DNA extranuclear encontra-se na forma de maxi e minicírculos concatenados (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987; TORO, 1983).

Os insetos vetores são dípteros pequenos (2-3 mm), pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros *Phlebotomus* comum no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Américas), possuindo ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. Só a fêmea é antropofílica e hematófaga, pois necessita dos nutrientes do sangue de seus hospedeiros vertebrados para produção de ovos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARSELLA; GOPEGUI, 1998; ROHOUDOVA; VOLF, 2006; TORO, 1983). (Figura 1A).



**Figura 1A: Ciclo da leishmaniose.** O flebótomo, ao se alimentar no vertebrado contaminado, infecta-se com formas amastigotas. No seu tubo digestivo, ocorre a transformação da leishmania em sua forma promastigota. Ao picar um novo hospedeiro, injeta saliva contendo estas formas infectantes, que são fagocitadas pelos macrófagos. Há a perda do flagelo, com retorno à forma amastigota. Estas se multiplicam, rompendo o vacúolo para infectar outros macrófagos. VL: Leishmaniose Visceral. CL: Leishmaniose Cutânea. (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>)



TRENDS in Parasitology

**Figura 1B: Ciclo de vida da *Leishmania* em vetor competente.** Ilustração do surgimento tempo-dependente das diferentes formas morfológicas do promastigota em seu vetor (KAMHAWI, 2006).

De um total de 1000 espécies conhecidas de flebótomos, aproximadamente 70 transmitem leishmaniose. A competência vetorial, em muitas espécies, parece estar associada à capacidade do parasito em resistir às enzimas proteolíticas secretadas pela glândula salivar do flebótomo durante o antepasto sanguíneo, e da fixação da leishmania ao epitélio do tubo digestivo do vetor, evitando sua excreção. Esta ligação é mediada por lipofosfoglicans de superfície do promastigota (SACKS, 2001).

Fatores na saliva parecem elevar a infectividade do promastigota (CHARLAB et al., 1999; LERNER et al., 1991; PEARSON; SOUSA, 1996; QURESHI et al., 1996; VALENZUELA et al., 2001). Os insetos, ao picarem, injetam as formas promastigotas da leishmania juntamente com a sua saliva, contendo agentes vasodilatadores potentes (LERNER et al., 1991), anti-agregantes plaquetários (VALENZUELA et al., 2001) e prostaglandinas E<sub>2</sub> (LONARDONI et al., 2000). A estratégia vetorial, em inibir o sistema de coagulação e a resposta inflamatória do hospedeiro, promove redução da sensibilização e inflamação local, facilitando a infecção (GILLESPIE et al., 2000).

No hospedeiro, a resposta à infecção parece ser regulada pelo influxo de células de defesa e pela produção local de citocinas. Resposta celular Th1 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> predominante associa-se à ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  e à secreção de IL-12, IL-2 e TNF. Células Th1 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> também produzem IFN- $\gamma$  e promovem a ativação da resposta Th1 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, na tentativa de controle da infecção e cura da doença. Células CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de memória também regulam resistência à re-infecções e à imunidade induzida por vacinação. Em qualquer processo inflamatório, mecanismos de contrabalanço são normalmente ativados para reduzi-lo. Sabe-se que citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-13 (citocinas associadas à resposta Th2), e TGF- $\beta$  reduzem a resposta Th1 e desativam macrófagos, portanto,

moderando a destruição dos tecidos, mas, ao mesmo tempo, permitindo a infecção intracelular. Embora respostas Th1 e Th2 polarizadas possam ser produzidas em animais experimentais, relacionando-se com resistência e susceptibilidade respectivamente, em pacientes com infecção clinicamente ativa não há essa polarização definida, com detecção de citocinas ativadoras e supressoras da resposta celular (MURRAY, et al, 2005; PIRMEZ et al., 1993; SILVEIRA et al., 2004). Mais recentemente, há descrição das células T regulatórias (Treg CD4+CD25+) na fisiopatologia da leishmaniose tegumentar (CAMPANELLI et al., 2006).

### 1.1.3. Classificação das espécies de leishmanias

As principais espécies de *Leishmania* envolvidas na LTA no Brasil são descritas a seguir (GONTIJO et al., 2003; LAINSON et al., 1994):

- *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911: espécie mais prevalente no homem. É incriminada pela forma mais destrutiva de leishmaniose cutânea no Novo Mundo, cujas lesões se caracterizam por úlcera única ou em pequeno número, frequentemente persistente e desfigurante, com abundante reação inflamatória tissular e escassez de parasitos (GRIMALDI Jr., 1982). É responsável pelas formas cutânea localizada, cutâneo-mucosa e recidivante. É encontrada em todas as zonas endêmicas do país e associada à presença de animais domésticos. O homem é hospedeiro acidental, assim como os roedores domésticos (LAINSON et al., 1994), cães, eqüinos (AGUILAR et al., 1987; YOSHIDA et al., 1990), gatos (PASSOS et al., 1996) e mulas (BRASIL-MS, 2000). Seus hospedeiros naturais são mamíferos silvestres, tendo sido registrada em roedores (*Proechimys sp.*, *Rhipidomys sp.*,

*Oryzomys sp.*, *Akodon sp.* e *Rattus sp.*) e em marsupiais (*Didelphis sp.*). É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lu. whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. intermedia*, *Lu. neivai*, *Lu. mignorei* e *Lu. pessoai* (GONTIJO et al., 2003).

- *Leishmania (V.) guyanensis* Floch, 1954: causa, sobretudo, lesões cutâneas. Sua maior incidência é na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associadas com desdentados e marsupiais. Os flebotomíneos envolvidos na transmissão da doença são *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (GONTIJO et al., 2003).
- *Leishmania (V.) naifi* Lainson & Shaw, 1989: ocorre na Amazônia, nos estados do Pará e Amazonas, sendo o tatu seu reservatório natural. Este parasito causa LTA de evolução benigna. Os principais vetores envolvidos são *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayrozai* (GONTIJO et al., 2003).
- *Leishmania (V.) shawi* Lainson et al., 1989: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, tem como reservatório vários animais silvestres, como macacos, preguiças e, como vetor, *Lu. whitmani* (GONTIJO et al., 2003).
- *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira et al., 1987: registrada apenas na Amazônia, tem a paca como animal suspeito de reservatório natural e, como vetor, *Lu. ubiquitousis* (GONTIJO et al., 2003).



- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972: agente etiológico da LTA, incluindo a forma anérgica, também conhecida como leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta*, *Lu. olmeca* e *Lu. nociva* os principais vetores. Apresenta pouca atração pelo homem (BRASIL-MS, 2000; LAINSON et al., 1994;).

#### 1.1.4. Formas clínicas da LTA

O curso clínico da infecção em humanos depende dos fatores de virulência do parasito e da resposta imune do hospedeiro. Citaremos a seguir as formas clínicas da LTA mais freqüentemente encontradas no Brasil.

##### Leishmaniose cutânea localizada (LCL)

Endêmica na América Central e do Sul, é causada por espécies pertencentes aos complexos *Viannia* e *Leishmania*. Após período de incubação médio de uma semana a três meses, a lesão cutânea primária se desenvolve no local da picada do inseto, que, com freqüência, localiza-se em área cutânea exposta do hospedeiro, podendo ser única ou múltipla. Como regra geral, o tamanho da lesão é inversamente proporcional ao número das lesões primárias (GRIMALDI Jr., 1982).

A lesão primária surge como pápula eritematosa, que se desenvolve de maneira insidiosa, evoluindo para nódulo sem ulceração (forma nodular) ou torna-se vegetante (forma verrucosa). Estas formas durante sua evolução podem sofrer ulceração. Freqüentemente, a lesão primária evolui para úlcera desde o início, apresentando-se circunscrita com borda violácea hipertrófica, e base granulomatosa e crostosa (GRIMALDI Jr, 1982). Quando presentes, dor e prurido são moderados. Pode ocorrer disseminação

linfática, principalmente associada a lesões cutâneas extensas, que se evidencia pela presença de nódulos subcutâneos ou cordões linfáticos, que podem se desenvolver em torno da úlcera. A ulceração cutânea tende à resolução espontânea após 6 a 12 meses, deixando cicatriz hiper ou hipocrômica (GREVELINK; LERNER, 1996; GRIMALDI Jr., 1982).

Chulay et al. (1988) recomendam o tratamento de todos os pacientes com lesão ativa, como também daqueles com confirmação ou suspeita de infecção por *Le. braziliensis*, mesmo após cura espontânea da lesão, com o intuito de reduzir o risco de desenvolvimento de doença cutâneo-mucosa.

#### Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

Variante anérgica da LCL, tem sido descrita nas Américas e África, sendo *Leishmania (Leishmania) amazonensis* a principal espécie implicada na América do Sul. Inicia-se com lesão única, que posteriormente se dissemina metastaticamente, originando lesões nodulares múltiplas, não ulceradas, que se distribuem em todo o tegumento, principalmente nos membros, região glútea e face, lembrando a hanseníase Virchowiana. As lesões são ricas em macrófagos, com abundantes parasitos, havendo ausência de linfócitos. A intradermoreação de Montenegro é negativa. Não invade órgãos internos, apresentando resposta parcial ao tratamento, com recidivas ocasionais, tornando-se crônica (COSTA et al., 1998; GREVELINK; LERNER, 1996; GRIMALDI Jr., 1982).

#### Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM)

Tem como agente mais comum *Leishmania (Viannia) braziliensis*. O envolvimento mucoso pode ocorrer por extensão direta de lesões cutâneas de regiões próximas, ou devido

à disseminação linfática ou hematogênica, que ocorre em 1-10% dos infectados. Surgem meses ou anos após a resolução da lesão cutânea inicial localizada à distância, mas em alguns casos podem ser concomitantes (MURRAY et al., 2005). Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam lesões cutâneo-mucosas dentro de dois anos da lesão cutânea inicial, e 90% dentro de 10 anos (GREVELINK; LERNER, 1996).

Alguns fatores encontram-se associados ao seu desenvolvimento: sexo masculino, lesões primárias extensas ou múltiplas, lesão com persistência maior que 1 ano e tratamento inadequado da lesão cutânea (GRIMALDI Jr., 1982). Frequentemente, inicia-se no septo nasal, que se torna inflamado e infiltrado, com subsequente perfuração. Há predileção pela parte da cartilagem distal do nariz, devendo-se ao fato de que as narinas externas recebem ar frio, e a baixa temperatura favorece o desenvolvimento da leishmania. A deformação resultante denomina-se nariz em tapir. A doença isolada do palato é rara (MARSDEN, 1994). Pode levar à mutilação do septo nasal, palato, faringe, amígdalas, língua e lábio, permanecendo intactas as estruturas ósseas. A disseminação nas membranas mucosas dos olhos e genitais é rara. A invasão do trato respiratório, incluindo laringe, traquéia e brônquios, pode resultar em comprometimento respiratório e da deglutição, com conseqüente má nutrição e pneumonia aguda, que podem levar ao óbito (GREVELINK; LERNER, 1996; GRIMALDI Jr., 1982; MARSDEN, 1994).

#### Leishmaniose recidivante (LR)

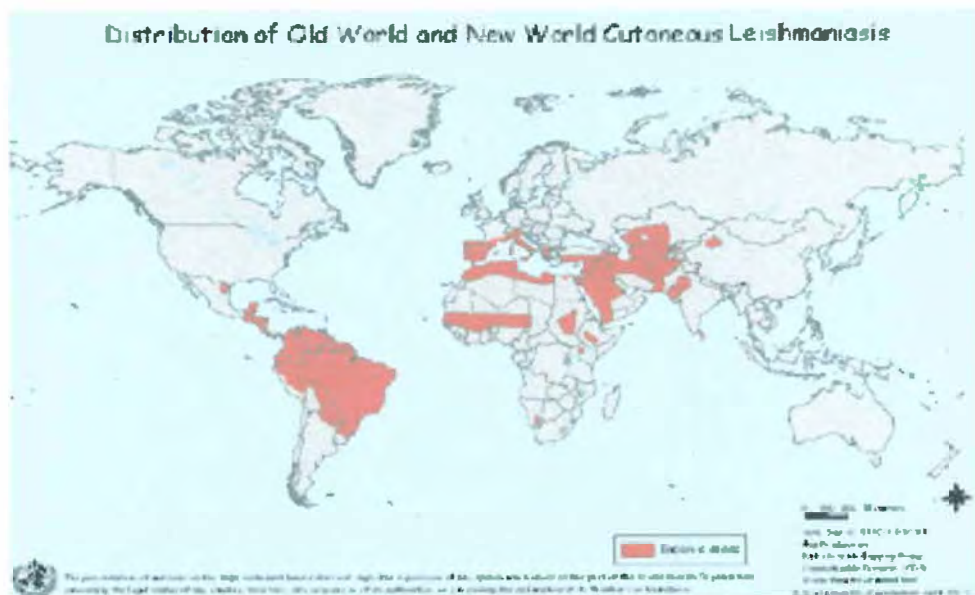
Tem como agente implicado na América do Sul *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de novas lesões no centro ou periferia de cicatrizes de lesões agudas curadas. Clinicamente, apresentam-se como pápulas eritematosas escamosas

dentro de cicatrizes de lesões curadas. As lesões tendem a tornarem-se resistentes ao tratamento e à cronificação (COSTA et al., 1996; GREVELINK; LERNER, 1996; GRIMALDI Jr., 1982; OLIVEIRA-NETO et al., 1998).

Recentemente, Silveira et al. (2004) propuseram o termo “leishmaniose cutânea disseminada *borderline*” como forma intermediária entre a LCL e os pólos extremos patogênicos LCM e LCD.

### 1.1.5. Epidemiologia da LTA

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é endêmica em 88 países distribuídos em 4 continentes. Aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem nessas áreas. Mais de 90% dos casos de LTA ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru (DESJEUX, 2004) (Figura 2).



**Figura 2: Distribuição da LTA no mundo** ([http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/))

Anualmente, estima-se que 1 a 1,5 milhões de crianças e adultos evoluem com LTA, e a incidência da infecção torna-se ainda maior quando as formas subclínicas são consideradas (MURRAY et al., 2005).

No Novo Mundo, é encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO et al., 2003). Historicamente, a LTA sempre foi uma doença de áreas rurais, associada à derrubada das florestas. Geralmente, adultos do sexo masculino e em idade produtiva eram infectados em consequência do trabalho no campo ou atividades militares (MEDEIROS; ROSELINO, 1999).

A incidência da LTA no Brasil vem aumentando, e surtos epidêmicos foram notificados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados à colonização predatória (GONTIJO et al., 2003). No período de 1985 a 2001, observou-se tendência de crescimento da endemia, com registro de autoctonia em todos os Estados. A região Nordeste apresenta o maior número de casos, e a região Norte, os coeficientes mais elevados (SUCEN, 2004). De acordo com dados de 2003 do Ministério da Saúde, são registrados, por ano, no Brasil, aproximadamente 33 mil casos de leishmaniose em sua forma tegumentar.

No Estado de São Paulo, com a devastação da cobertura florestal primitiva, verificou-se a redução na notificação de LTA a casos esporádicos. A partir da década de 80, no entanto, novos casos da doença foram notificados, cuja transmissão foi relacionada a fatores antrópicos, sem vínculos com grandes ecossistemas florestados. Nesta nova feição da doença, marco de uma transição do seu perfil epidemiológico, a distribuição espacial da autoctonia dos casos ampliou-se, com aproximadamente 25% dos municípios do Estado

apresentando ao menos a notificação de um único caso (Figura 3). Os dados epidemiológicos mostram que o padrão de transmissão da LTA se alterou, sendo evidente o aumento da incidência com tendência à endemidade, e ocorrência de casos esporádicos e/ou micro surtos, além de expansão geográfica das áreas (CAMARGO-NEVES et al., 2002).



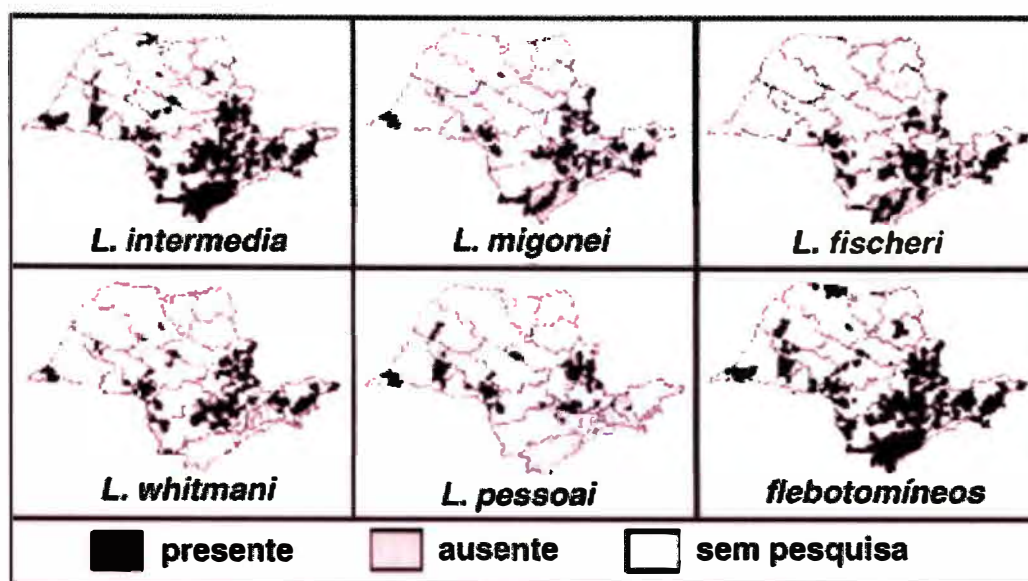
**Figura 3: Mapa identificando as áreas ocupadas pelos municípios com registro de incidência de LTA, Estado de São Paulo, 1986 a 1995 (CAMARGO-NEVES et al., 2002).**

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003786822002000400004&tlng=es&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822002000400004&tlng=es&lng=en&nrm=iso)

A re-emergência da LTA sob novo perfil epidemiológico não apresentou risco diferenciado entre os grupos de idade e sexo, e sua transmissão parece não poder ser atribuída a uma única espécie de flebotômíneo. No entanto, atribui-se preponderante papel vetorial de *Le. braziliensis* a *Lu. intermedia* (Lutz & Neiva) no ambiente domiciliar, e a *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho) e *Lu. migonei* (França) no ambiente extradomiciliar (CAMARGO-NEVES et al., 2002; FERREIRA, et al., 2001).

Camargo-Neves et al. (2002) realizaram estudo da correlação da presença de espécies de flebotômíneos com os registros de casos de LTA no Estado de São Paulo, no período de 1986 a 1995. Nos 140 municípios com transmissão da doença, a pesquisa

entomológica realizada mostrou que as espécies mais freqüentemente capturadas no ambiente domiciliar foram: *Lu. intermedia*, em 87,1% dos municípios; *Lu. whitmani*, em 53,6%; *Lu. migonei*, em 49,7%; *Lu. pessoai*, em 28,5% e *Lu. fischeri*, em 53,6%. Os autores admitem o envolvimento de mais de uma espécie na transmissão de *Le. braziliensis*. Os resultados deste trabalho mostram mais claramente que *Lu. intermedia* foi a espécie mais abundante. Porém, dado ao seu alto grau de endofilia, apresenta menor poder vetorial no ambiente domiciliar do que *Lu. migonei*, ao se considerar que, inicialmente, não há fonte de infecção primária neste ambiente. Apesar de ambas as espécies estarem presentes nas áreas de maiores incidências da doença, *Lu. migonei* esteve associada com os maiores coeficientes padronizados de incidência, ou seja, nos ambientes alterados ou do tipo mata residual, ambos favoráveis à presença desta espécie. Isto pode ser explicado pelo seu comportamento tanto zoofílico quanto antropofílico. Conseqüentemente, haveria maior chance de se infectar em reservatórios primários e em animais domésticos, como o cão (Figura 4).



**Figura 4:** Mapas identificando as áreas ocupadas pelos municípios com as correspondentes espécies de flebotomíneos, Estado de São Paulo, 1986 a 1995 (CAMARGO-NEVES et al., 2002). [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003786822002000400004&tlng=es&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822002000400004&tlng=es&lng=en&nrm=iso)

Estudo realizado no litoral norte de São Paulo, na cidade de Ubatuba, evidenciou aumento da incidência da LTA nos anos de 1993 e 2003, sugerindo comportamento cíclico da doença. A presença de casos em todas as faixas etárias e em ambos os sexos indica transmissão no ambiente peri ou intradomiciliar, e o registro elevado de *Lu. intermedia* no intradomicílio sugere ser esta a espécie implicada na transmissão da LTA em Ubatuba (SUCEN, 2004). Ainda, no litoral norte, Brito et al. (2002) conduziram um estudo com o objetivo de caracterizar a fauna flebotomínica e a distribuição sazonal e horária das espécies existentes na localidade de Jaraguá, situada no município de São Sebastião. Coletas quinzenais foram feitas no ambiente domiciliar, peridomiciliar e na floresta durante um ano. *Lu. intermedia* mostrou-se como a espécie predominante em todos os ambientes pesquisados (94,8% em relação às demais espécies), principalmente no ambiente domiciliar. Observaram atividade do vetor ao longo do período noturno, mas com picos nas



primeiras horas após o crepúsculo vespertino, e maior densidade durante o período seco e frio do ano. Sugerem que as alterações ambientais, resultantes da manipulação humana, podem estar contribuindo para os diferentes comportamentos de populações da mesma espécie. Alia-se o fato de que as manchas de florestas residuais em ambientes modificados podem fornecer a *Lu. intermedia* e a animais silvestres e ou sinantrópicos, estes últimos eventuais reservatórios do agente, possibilidade de envolvimento na manutenção do ciclo. Além disto, permitem que, a partir destas áreas, o vetor possa freqüentar as matas ou invadir os domicílios, aumentando os riscos da população humana de contrair a leishmaniose (APARICIO, 2004).

Mayo et al. (1998) publicaram estudo realizado no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, sobre 12 casos de LTA ocorridos em 1992. A área apresenta alta diversidade de flebotomíneos, provavelmente em virtude da vegetação e relevo diversificados. Do total de flebotomíneos coletados no ambiente domiciliar e na mata, 81,4% pertenciam a quatro espécies: *Lu. migonei* (32,4%), *Lu. whitmani* (26%), *Lu. intermedia* (12%) e *Lu. fisheri* (10,9%). A predominância de *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* no ambiente domiciliar indica que estas espécies, juntamente com *Lu. intermedia*, podem desempenhar importante papel na transmissão da LTA na área de estudo. Foi constatada ainda a presença de *Lu. longipalpis*, quase que exclusivamente no ambiente domiciliar, e isto se reveste de importância para a Vigilância Epidemiológica devido ao risco de introdução da LV no Estado de São Paulo.

Um aspecto importante na medicina tropical é a análise de características geográficas relacionadas com o risco de transmissão de doenças. Devido à ausência de dados detalhados de saúde pública, estas análises são freqüentemente reduzidas à

compreensão da distribuição de espécies críticas como vetores e reservatórios. No trabalho realizado por Peterson et al. (2003 e 2004), foi examinada a aplicabilidade de nova técnica, modelagem de nicho ecológico, no estudo da distribuição de cinco espécies de mosquitos do gênero *Lutzomyia* encontrados nos municípios do Estado de São Paulo. A técnica resultou em previsões altamente significativas, sendo a amostragem mínima para obtenção de previsões eficazes de 40 municípios.

Na região Nordeste do Brasil, de forma semelhante, a doença está ocorrendo na interface entre as áreas peri-urbanas e rurais, e acometendo indivíduos de todas as idades e ambos os sexos. Sugerem que as espécies de *Lutzomyia*, responsáveis pela transmissão da doença, tenham se adaptado com sucesso ao seu novo meio (OLIVEIRA et al., 2004). Follador et al. (1999) relatam surto de LTA em povoado na Bahia e a leishmania envolvida foi caracterizada como *Le. braziliensis*, e o vetor, *Lu. intermedia*. O acometimento de crianças, de indivíduos de ambos os sexos e o componente de agregação familiar sugerem padrão de transmissão peri ou intradomiciliar. Nas regiões amazônicas do Estado do Maranhão, a doença apresenta as mesmas características epidemiológicas do passado (adultos, masculinos e agricultores), mas nota-se aumento proporcional dos casos acometendo crianças e mulheres, sugerindo a transmissão em ambiente antrópico (MARTINS et al., 2004).

Vários estudos sobre a distribuição de flebotomíneos nas diversas regiões do país foram publicados. Souza et al. (2002) constataram, no Estado do Rio de Janeiro, predomínio de *Lu. intermedia* (38,3%) no peridomicílio e com maior densidade nos meses mais quentes do ano, enquanto *Lu. whitmani* (38,6%) foi observada em áreas de plantação de bananas e florestas, e principalmente nos meses mais frios. No Maranhão há relato da

peri-urbanização de *Lu. whitmani* em um foco de LTA (LEONARDO; REBELO, 2004). Oliveira et al. (2003) conduziram estudo de flebotomíneos na zona urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no período de 1999 a 2000. Destaca-se a presença em áreas urbanas de vetores da leishmaniose visceral (*Lu. longipalpis*) e da leishmaniose tegumentar (*Lu. whitmani*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei*).

Na região nordeste do Estado de São Paulo, a área em estudo, são citados por Bechelli et al. (1961): o relato de Silveira, que data de 1919, no qual referem ter encontrado na região da Mogiana prevalência de LTA de 9,4%, e o relato de Barbosa, que data de 1936, que na mesma região encontrou prevalência de 2,8%. Também Pessoa e Pestana *apud* Furtado (1980) descreveram a ocorrência de casos no município de São Carlos, em 1939. Após este período, não mais houve notificação ou relato de casos na região nordeste do Estado.

Em 1961, Bechelli et al. (1961) relatam caso autóctone da cidade de Ribeirão Preto e após, em 1972, Forattini et al. (1972a) descrevem foco ativo no município de Luís Antônio, ambos pertencentes à região nordeste do Estado.

Em 1999, Medeiros (1999), em levantamento realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 1978 a 1998, verificou 223 casos, sendo 25 casos autóctones do município de Ribeirão Preto.

Mais recentemente, Medeiros (2002) realizou trabalho de sequenciamento, com análise filogenética de 61 amostras de produtos de PCR de pacientes com LTA atendidos no HC-FMRP-USP, detectando a presença dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* nos casos analisados.

Tem-se a informação que o vetor encontrado nesta região é *Lutzomyia intermedia* (dados da SUCEM - Araraquara). No entanto, segundo informações de Cláudio Casanova (SUCEN - Mogi-Guaçu), a espécie prevalente na região de Ribeirão Preto é *Lutzomyia neivai*. A discordância destes dois dados justifica-se, pois, até 1996, os flebotomíneos antes classificados como *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) foram agrupados em duas espécies [*Lu. intermedia* s.s. e *Lu. neivai* (Pinto, 1926)] que constituem um complexo de espécies (MARCONDES, 1996). A identificação das fêmeas é facilmente feita pelas características das espermatecas e de seus dutos, além de existirem várias diferenças morfométricas adicionais (MARCONDES et al., 1998). Os machos podem ser diferenciados por morfometria, utilizando proporções entre medidas de estruturas e análise por rede neural (MARCONDES; BORGES, 2000). O estudo do DNA mitocondrial permitiu distinguir dez haplótipos, alguns característicos de cada espécie, e ressaltou a proximidade entre as espécies (MARCONDES et al., 1997). Com a reclassificação, revisando-se as amostras anteriores e as coletas atuais, confirma-se *Lu. neivai* como principal vetor desta região (MARCONDES et al., 1998).

Sabe-se que, nas áreas deste vetor, a endemia ocorre em região florestal remanescente e/ou residual, atingindo indivíduos de ambos os sexos e todos os grupos etários, com tendência ao acometimento familiar. A característica focal de transmissão sugere adaptação em ambientes modificados pelo homem, tanto em zonas rurais, como na periferia de grandes cidades (MEDEIROS; ROSELINO, 1999). Um estudo sobre o molde de dispersão de *Lu. neivai* na região sudeste do Brasil, onde se localiza nossa área de estudo, mostrou que a movimentação espacial deste vetor é focal e a sua possível dispersão

da floresta para o peridomicílio pode ser um importante meio de introdução da leishmaniose na zona urbana (CASANOVA et al., 2005).

Segundo dados fornecidos pela Professora Eunice Galati, do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), que realizou capturas na região de Cássia dos Coqueiros - SP, as espécies vetoras que ocorrem são: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia/ Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia pessoai*, *Migonemyia migonei*. As duas espécies mais frequentes são *Lutzomyia/ Nyssomyia neivai* e *Lutzomyia longipalpis*.

Vale ressaltar que a nomenclatura – *Nyssomyia* - adotada é uma classificação recente, por ela proposta, mas a mesma ainda não é seguida pela maioria dos estudiosos de flebotomíneos (ANDRADE FILHO et al., 2003).

## 1.2. Maxadilan

### 1.2.1. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é o vetor mais importante de *Leishmania chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Novo Mundo. Grande número de artigos sobre *Lu. longipalpis* foi publicado recentemente e a melhor compreensão da biologia do vetor se constitui em mais uma medida no controle da leishmaniose.

A saliva de artrópodes hematófagos apresenta diversidade de substâncias que compreendem peptídeos vasodilatadores, anti-inflamatórios, anti-histamínicos, anticoagulantes e muitos outros, e são responsáveis pela sucção efetiva, com percepção mínima pelo hospedeiro vertebrado (RIBEIRO, 1987; SOARES; TURCO, 2003).

Na leishmaniose experimental, milhões de parasitos são injetados por seringa para indução da doença. Ao contrário, na infecção natural, o vetor injeta de 1 a 100 parasitos (WARBURG et al. 1986). A partir desta observação, Titus e Ribeiro (1988) realizaram experimentos nos quais camundongos eram infectados com *Le. major* na presença e ausência de lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis*. Este procedimento resultou em lesões cutâneas maiores (5 a 10 vezes) e presença de grande número de parasitos (até 5580 vezes a mais) nos animais infectados com ambos *Le. major* e glândula salivar, comparados aos animais infectados na ausência da saliva. Material obtido de outros artrópodes hematófagos não promoveu este fenômeno. A partir deste trabalho inicial com *Le. major*, observou-se que a saliva dos flebótomos exacerba a infecção com todas as espécies de *Leishmania* já testadas. Samuelson et al. (1991) mostraram que a infecção com *Le. braziliensis* e lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* em camundongos BALB/c promoveu lesões cutâneas progressivas, enquanto nos controles, quando se injetou somente parasitos, observaram pequenos nódulos cutâneos e com rápida regressão espontânea. Theodos et al. (1991) determinaram que a exacerbação das lesões pela infecção conjunta do parasito e glândula salivar é um fenômeno observado em camundongos de diferentes espécies, BALB/c, CBA, C57BI/6, C3H e DBA/2, embora a intensidade e as características do efeito variassem nos grupos.

Theodos e Titus (1993), baseados em trabalhos anteriores que mostravam maior infectividade do parasito quando associado à saliva do vetor (*Lu. longipalpis*), testaram a seguinte hipótese: o extrato de glândula salivar age inibindo a resposta imune do hospedeiro. Os resultados deste experimento, *in vitro*, indicaram que a saliva inibe os macrófagos em sua apresentação de antígenos às células T. Lima e Titus (1996) observaram

que o lisado da glândula salivar de *Lu. longipalpis* estimula, significativamente, a infecção por *Le. braziliensis* em camundongos BALB/c, e que estes animais produziram duas a três vezes mais IL-4 se comparados aos animais infectados na ausência da saliva. Tratamento com anticorpos neutralizantes anti-IL-4 bloquearam os efeitos da saliva. Norsworthy et al. (2004) concluíram que o lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* estimula a infecção por *Le. amazonensis* e correlacionaram este fato com o aumento da produção de IL-10 por linfócitos T e macrófagos.

A maioria dos trabalhos utiliza animais experimentais, nos quais se avalia a resposta imune, principalmente de camundongos, perante a saliva dos flebótomos. Em 2004, Costa et al. examinaram os efeitos do homogeneizado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* sobre monócitos, macrófagos e células dendríticas humanas em relação à produção de citocinas e expressão de moléculas de superfície celular. Estas células foram obtidas de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia, em Salvador. Demonstraram aumento na produção de IL-6, IL-8 e IL-12p40 e redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 pelos monócitos humanos incubados com glândula salivar e estimulados por LPS. Já a pré-incubação destas células com soro humano, contendo anticorpos específicos anti-glândula salivar, aboliu os efeitos sobre a produção de citocinas. A intensidade dos efeitos estimulatórios e inibitórios variou entre os diferentes doadores, e este fato não foi considerado inesperado, visto que é descrito em várias publicações de estudos com humanos. A capacidade da saliva em interferir na produção dos componentes da resposta imune inata, aumentando IL-6 e reduzindo TNF- $\alpha$ , promove a sobrevivência de *Leishmania* dentro das células infectadas e, conseqüentemente, a evolução da doença no hospedeiro.

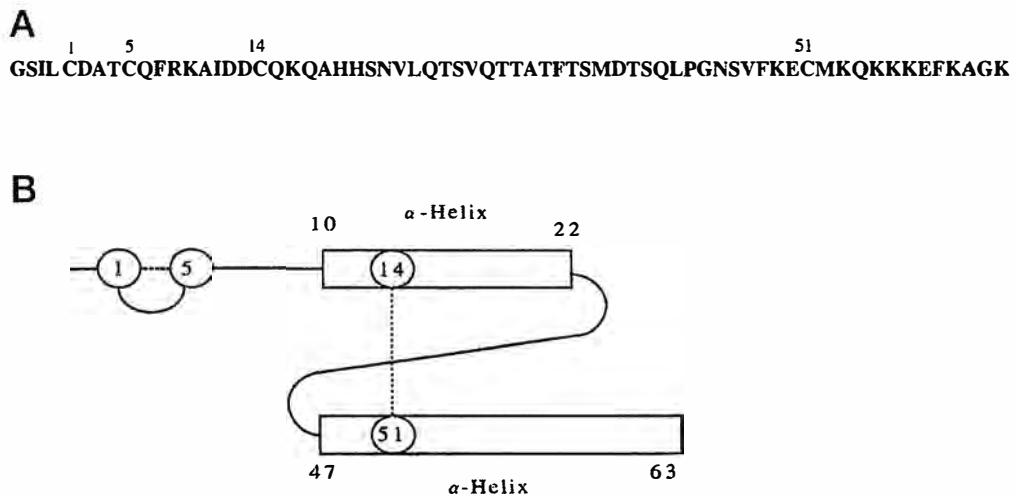
IL-8 é uma substância quimiotática de neutrófilos e estes estão presentes em grande quantidade nas lesões cutâneas recentes de leishmaniose. Relato recente mostra que neutrófilos infectados por *Le. major* apresentam menor taxa de apoptose celular, sugerindo que a *Leishmania* seja responsável pela maior sobrevivência dos neutrófilos e, conseqüentemente, dos parasitos infectantes. Finalizando, sugerem que componentes da saliva promovem o desenvolvimento de uma resposta imune celular a partir do aumento de IL-12p40 e inibição da produção de IL-10. Em relação à expressão de moléculas de superfície em células apresentadoras de antígenos, demonstraram que a saliva afeta a expressão dessas moléculas (CD80 e CD86 – MHC classe II) em monócitos e macrófagos, mas muito pouco sobre as células dendríticas (AGA et al., 2002).

Diante de todas as evidências, indaga-se sobre qual fator na saliva seria responsável por estes efeitos e qual o mecanismo da ação desta molécula. Inicialmente, foi proposto que tanto a vasodilatação quanto os mecanismos imunomodulatórios eram mediados por um único peptídeo na saliva e que este estaria relacionado à neuropeptídeos dos mamíferos (TITUS; RIBEIRO, 1990). Posteriormente, o gene codificador do peptídeo vasodilatador presente na saliva dos flebótomos foi identificado, clonado e seu produto denominado Maxadilan (GILLESPIE et al., 2000; SOARES et al., 2003).

Maxadilan (Max) é um peptídeo vasodilatador potente e com propriedades imunomodulatórias, extraído do lisado de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* por Lerner et al. (1991). É um peptídeo composto por 63 aminoácidos que, após clivagem C-terminal, passa a ter 61 aminoácidos, contendo 4 resíduos de cisteína ligados por pontes dissulfeto nas posições 1-5 e 14-51 (Figura 5). Um par de glândulas salivares contém em



média 10ng de Max (1-2% da proteína salivar total) e seu peso molecular é de aproximadamente 7kDa (LERNER et al., 1991).



**Figura 5: A. Seqüência de aminoácidos do peptídeo Max. B. Estrutura secundária do Max apresentando duas  $\alpha$ -hélices (10-22 e 47-61) e uma ponte dissulfeto (linha pontilhada) (MORO et al., 1992) (<http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/33/23103>)**

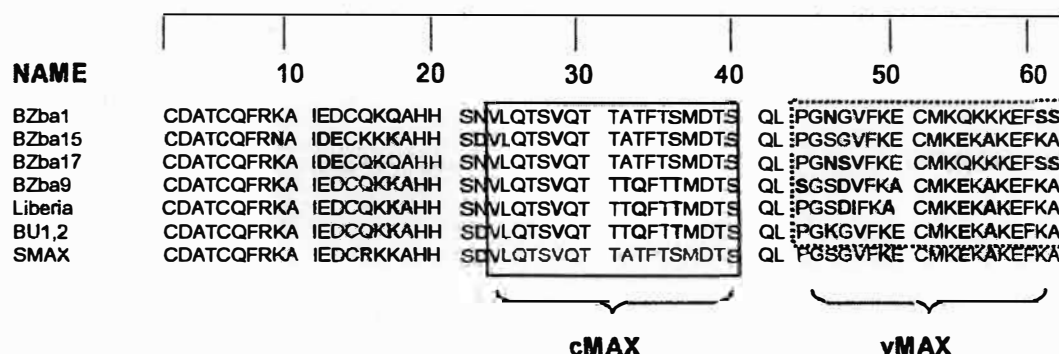
Lerner e Shoemaker (1992) clonaram e produziram Max recombinante em *Escherichia coli* com as mesmas propriedades do natural, possibilitando sua caracterização estrutural e funcional. Quando injetado na pele, produz eritema prolongado equivalente ao observado tanto pela injeção do Max extraído da saliva, quanto pela injeção da saliva total ou pela picada do flebótomo. Portanto, Max parece ser o principal vasodilatador salivar de *Lu. longipalpis*, o que possibilita sucção efetiva ao picar a pele do hospedeiro.

A atividade vasodilatadora do Max é 500 vezes maior que a do CGRP (*calcitonin gene related peptide*), até então o mais potente vasodilatador conhecido. Seu mecanismo de ação é endotélio-independente, ligando-se a receptores na superfície celular e promovendo aumento intracelular de AMPc associado à redução do  $\text{Ca}^{+2}$ , com subsequente

vasodilatação (JACKSON et al., 1996). Moro e Lerner, em 1997, demonstraram que Max é um agonista específico dos receptores pituitários tipo 1 (PAC1) do peptídeo ativador da adenil-ciclase (PACAP-*pituitary adenylate cyclase activating peptide*), um peptídeo endógeno encontrado nos mamíferos. Surpreendentemente, o peptídeo salivar não apresenta qualquer sequência homóloga ao PACAP, apesar de se ligar no mesmo sítio em seu receptor tipo 1 e promover sua ativação. Com o objetivo de melhor caracterização do Max, estes mesmos autores estudaram a relação entre estrutura e atividade do Max, através de substituições e deleções de aminoácidos. Concluíram que a substituição das cisteínas na posição 14 ou 51 suprime sua atividade e a deleção da sequência de aminoácidos 24-42 resulta em um antagonista específico do receptor PACAP tipo 1 (MORO et al., 1999).

Lanzaro et al. (1999) observaram polimorfismo na sequência de aminoácidos do Max, e isto se torna considerável em se tratando de uma proteína tão pequena (7kDa). Max obtido de diferentes espécies do complexo *Lu. longipalpis*, em diversas regiões geográficas, mostrou, aproximadamente, 23% de discordância em sua sequência de aminoácidos. No entanto, todas as variantes apresentam atividade vasodilatadora equivalente. Em estudo mais recente, Milleron et al. (2004) apresentaram a diversidade antigênica do Max. Os resultados sugerem que: 1 - Max é imunogênico quando introduzido através da picada do flebótomo, 2 - o polimorfismo protéico do Max ocorre em uma mesma população de flebotomos, 3 - a porção variável do Max induz respostas antigênicas específicas em uma população de hospedeiros naturais e 4 - a porção variável parece ser mais antigênica que sua porção constante. Inferem que as regiões variáveis do Max se ligam à IgG, pois elas são responsáveis pela interação da proteína com os receptores tipo 1 do PACAP. Ao contrário, as regiões constantes do Max parecem ser essenciais para sua atividade vasodilatadora, mas

não se ligam a receptores. Diante de todas as observações, os autores propõem a hipótese de que os flebótomos tenham desenvolvido essa diversidade do Max como meio de defesa à resposta imune do hospedeiro (Figura 6).



**Figura 6. Seqüência de aminoácidos da proteína MAX.** As regiões variáveis da proteína estão sombreadas em cinza. Os resíduos diferentes da seqüência consensual estão em negrito. As abreviações das variantes de MAX são as seguintes: BZba=Baturité, Brasil; Libéria=Libéria, Costa Rica; BU=Bucaramanga, Colômbia; SMAX=MAX sintético. Peptídeos variantes sintéticos (vMAX) foram compostos por 19 aminoácidos mostrados dentro da linha pontilhada. O peptídeo constante (cMAX) foi composto pela seqüência consensual de 18 aminoácidos dentro da linha contínua (MILLERON et al. (2004) <http://www.ajtmh.org/cgi/content/full/70/3/286>)

Além das alterações qualitativas, Yin et al. (2000) demonstraram diferenças quantitativas na expressão do mRNA para Max em diferentes espécies do complexo *Lu. longipalpis* capturadas na América Central e América do Sul. Sugerem que a diferença na vasodilatação induzida pelo Max, observada entre as espécies, resulta da quantidade de Max na saliva (quantificada através do RNA mensageiro) e não pela potência das variantes do Max.

A partir da clonagem do Max e, posteriormente, sua síntese em laboratório, várias publicações sobre sua capacidade de imunomodulação surgiram. Bozza et al. (1997) investigaram os efeitos do Max sobre as funções dos macrófagos de BALB/c. Os resultados apresentados neste trabalho indicam efeito imunomodulatório do Max, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e aumentando a de IL-6, através da ligação a receptores PACAP tipo 1 dos macrófagos, com ativação e subsequente elevação de AMPc intracelular. Demonstraram que o tratamento dos macrófagos com o antagonista do receptor PACAP tipo 1 (PACAP6-38) bloqueou a ação do Max, e que a utilização do ligante natural desses receptores (PACAP38) teve o mesmo efeito do Max. Estes mesmos autores, em 1998, publicaram que Max e PACAP38 protegem camundongos BALB/c contra endotoxemia letal. Essa proteção correlaciona-se com a redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , aumento dos níveis de IL-10 e pela inibição da ativação plaquetária *in vivo*. No entanto, experimentos com camundongos IL-10<sup>-/-</sup> demonstraram que Max reduz, mas não previne a morte pela endotoxemia. Em suas conclusões sugerem que a ativação dos receptores PACAP tipo 1 pode controlar a superprodução de citocinas pró-inflamatórias durante a endotoxemia mediada por mecanismos parcialmente dependentes de IL10 (BOZZA et al., 1998).

A saliva dos flebótomos, contendo fatores vasodilatadores e imunomodulatórios, resulta em sucção efetiva e com resposta inflamatória mínima do hospedeiro. Estes mecanismos promovem campo perfeito para a injeção do parasito em seu hospedeiro através da picada e salivação do vetor. Isso, talvez, possa explicar porque os artrópodes são vetores extremamente eficientes na transmissão de várias doenças. Experimentos desenvolvidos por Morris et al. (2001) demonstraram que Max pode substituir toda saliva e exacerbar a infecção por *Le. major* em camundongos na mesma intensidade. Determinaram

que 3ng de Max e metade da glândula salivar de *Lu. longipalpis* são igualmente eficientes na multiplicação parasitária em camundongos CBA infectados por injeções com *Le. major* e Max ou *Le. major* e glândula salivar. Submeteram grupos à vacinação prévia com Max e observaram que as lesões cutâneas em animais vacinados foram 3 a 5 vezes menores, com crescimento parasitário reduzido, e que cicatrizaram 50 dias após a infecção, enquanto nos grupos tratados somente com adjuvante ou diluente, a cicatrização ainda não havia ocorrido após 65 dias. Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos na proteção observada nos animais vacinados, os pesquisadores caracterizaram as respostas anti-Max promovidas pela vacinação. Por meio de ELISA, detectaram altos títulos de anticorpos anti-Max no soro. Células de linfonodos regionais, extraídas dos animais tratados, foram estimuladas *in vitro* com Max e produziram INF- $\gamma$  e NO (óxido nítrico) em quantidades significativas. Determinaram o fenótipo dessas células por citometria de fluxo e constataram 82% de CD4, 10% de CD8 e 4% de células I-A<sup>+</sup>. Portanto, respostas humoral e celular foram estimuladas em camundongos vacinados.

Castro-Sousa et al. (2001) estudaram a capacidade do Max e do lisado de glândulas salivares de *Lu. longipalpis* na promoção de infecção de camundongos CBA por *Le. major* e de BALB/c por *Le. braziliensis*. Não observaram diferenças no tamanho das lesões entre os grupos de camundongos CBA tratados com salina (controle) ou Max ou lisado de glândula salivar, embora o número de parasitos no local de injeção e no baço fosse maior no grupo tratado com Max, porém sem diferença estatística. No grupo de camundongos BALB/c, as lesões nos animais tratados com Max eram ligeiramente maiores se comparado com o grupo não tratado, mas essa diferença não foi mais observada após a 14<sup>a</sup> semana de infecção.

O estudo, publicado por Guilpin et al. (2002); sugere que o aumento da hematopoiese possa ser outro mecanismo de maior suscetibilidade dos camundongos à infecção por *Leishmania*. Demonstraram que Max estimula a produção de IL-6 pelas células estromais da medula óssea com consequente aumento da hematopoiese, que é promovido pela interação entre Max e os receptores PACAP.

Rogers e Titus (2003) apresentaram os efeitos do Max sobre a resposta imune primária humana *in vitro*. Células mononucleares periféricas e monócitos foram obtidos de doadores de sangue saudáveis, isolados e colocados em cultura. Após, eram incubados com Max por 3 horas e, posteriormente, estimulados com *Le. major*. O sobrenadante foi coletado em 48 e 72 horas e processado à dosagem de citocinas. Observaram redução da secreção de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 pelas células mononucleares periféricas e de TNF- $\alpha$  pelos monócitos e, contrariamente, detectou-se aumento na produção de IL-6. Finalizando, determinaram que Max atua sobre essas células através da ligação a receptores PACAP. Sugerem que os efeitos imunomodulatórios do Max sobre células humanas têm importante implicação para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose.

### **1.2.2. *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

Estudos prévios mostraram que o lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*, mosquito transmissor da leishmaniose no Novo Mundo, estimula a infecção causada por *Le. major* em camundongos CBA. Portanto, a saliva atuaria sobre a resposta imune do camundongo infectado. Entretanto, no Velho Mundo, *Le. major* é transmitida na natureza pelo mosquito *Phlebotomus papatasi*.

Mbow et al. (1998) pesquisaram a capacidade de imunomodulação do lisado de glândula salivar de *Phlebotomus papatasi* sobre camundongos CBA infectados por *Le. major*. Analisaram o tamanho das lesões e o crescimento parasitário, e dosaram mRNA de citocinas do material obtido dos linfonodos em sítios de drenagem das lesões cutâneas. Constataram aumento no tamanho das lesões cutâneas, acompanhado de maior crescimento parasitário em camundongos infectados com *Le. major* e lisado de glândula salivar (equivalente à metade da glândula). Camundongos CBA são resistentes à doença e sua exacerbação é correlacionada à inibição da produção de citocinas Th1 e fatores associados - IFN- $\gamma$ , IL-12 e NO sintase - e aumento da citocina Th2 - IL-4. Entretanto não houve alteração nas dosagens de IL-10 e TGF- $\beta$ . Importante ressaltar que o lisado de glândula salivar também aumentou a expressão de IL-4 nos camundongos não infectados por *Le. major*.

Está claro que lisado de glândulas salivares de flebotomíneos, tanto do Velho quanto do Novo Mundo, exacerba a infecção por *Leishmania* em camundongos, porém apresenta diferentes efeitos farmacológicos nos experimentos animais. Enquanto que na saliva de *Lu. longipalpis* foi identificado o peptídeo Maxadilan, em *Ph. papatasi* não foi detectada nenhuma molécula semelhante. Os autores sugerem que a saliva de *Ph. papatasi* possa conter molécula semelhante ao Max, que perdeu sua capacidade de vasodilatação, mas não de imunomodulação, ou molécula não relacionada ao Max (GILLESPIE et al., 2000; MBOW et al., 1998). Foi demonstrado que adenosina é, possivelmente, o fator na saliva de *Ph. papatasi* que altera a capacidade dos macrófagos em destruir os parasitos (KATZ et al, 2000; VALENZUELA et al, 2001).

Belkaid et al. (2000) demonstraram que *Ph. papatasi* induz resposta de hipersensibilidade do tipo tardia em humanos e roedores, facilitando a sucção de sangue. Em ambos, a resposta de hipersensibilidade foi associada ao aumento do fluxo sanguíneo, avaliada pelo método Doppler. Provavelmente, como consequência do aumento do fluxo de sangue, o mosquito necessita de menor tempo para picar e se alimentar. Ainda não é certo se isto constitui processo de seleção ou resposta adaptativa. Camundongos desenvolveram resposta de hipersensibilidade tardia após inoculação intradérmica da glândula salivar. Observaram a migração de células mononucleares, eosinófilos e linfócitos T CD4, sugerindo que a glândula salivar de *Ph. papatasi* promova resposta mista Th1 e Th2. De forma semelhante, esse mesmo infiltrado é visto na pele humana após picada de inseto. Uma das principais hipóteses sobre a saliva dos flebótomos é que ela promova imunossupressão local. No entanto, nesse estudo, os autores sugerem que os componentes da saliva são altamente imunogênicos, induzindo resposta de hipersensibilidade tardia. Um dado observado no experimento foi que aqueles camundongos, pré-sensibilizados por picadas de mosquitos não infectados, apresentavam maior resistência à leishmaniose transmitida, e esta resistência parece ser promovida, inespecificamente, pela resposta de hipersensibilidade tardia do hospedeiro aos antígenos salivares. Portanto, a identificação e clonagem dos componentes salivares poderão ser úteis para a dessensibilização dos indivíduos com as formas graves da doença, além de poder ser incluídos como componentes de vacina anti-leishmaniose.



### 1.2.3. *Lutzomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

Pouco se sabe sobre a composição ou o papel da saliva de *Lu. intermedia*, o principal vetor de *Le. braziliensis*. Baptista et al. (2004) analisaram a presença de anticorpos contra a saliva de *Lu. intermedia* em pacientes moradores de área endêmica de leishmaniose no Estado do Rio de Janeiro. Foram selecionados 33 indivíduos que apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* com títulos acima de 1:160 e submetidos ao ensaio de ELISA, utilizando-se como antígeno glândulas salivares extraídas de fêmeas de *Lu. intermedia*, criadas em laboratório. Destes indivíduos, 23 tinham lesão cutânea ou mucosa ativa e 10 estavam curados há mais de 12 meses, após tratamento específico. Dos 33 pacientes testados, cinco, todos com lesão ativa, mostraram a presença de anticorpos contra a saliva do inseto. Embora preliminares, os resultados indicam que indivíduos moradores de áreas endêmicas e, portanto, expostos as picadas do inseto, desenvolvem anticorpos contra saliva de *Lu. intermedia*.

### 1.2.4. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

Estudos anteriores mostraram que a saliva de *Lu. longipalpis* estimula a infecção por *Le. braziliensis* em camundongos. No entanto, *Le. braziliensis* não é transmitida na natureza, nem por *Lu. longipalpis*, nem por *Ph. papatasi*. O hematófago *Lutzomyia whitmani* é um dos seus vetores naturais e responsáveis pela transmissão do parasito no Brasil. Para determinar se a saliva de *Lu. whitmani* pode aumentar a infectividade de *Le. braziliensis*, Bezerra e Teixeira (2001) inocularam grupos de camundongos BALB/c com *Le. braziliensis* na presença ou ausência de lisado de glândula salivar de *Lu. whitmani*. Constataram que, na presença da saliva, as lesões cutâneas tinham maiores dimensões. No

entanto, sua evolução não alterou, com regressão espontânea e gradual, mas de forma mais lenta se comparada aos controles sem a inoculação da saliva. Na saliva de *Lu. longipalpis*, a molécula Max, com propriedades vasodilatadoras e imunomodulatórias, é tida como responsável por esses eventos. Entretanto, nenhum fator foi identificado, ainda, na saliva de *Lu. whitmani*.

## **2. OBJETIVOS**

---

Diante das evidências de imunomodulação promovidas pelo peptídeo Max, atuando na evolução da infecção, e do seu emprego em vacina experimental para leishmaniose, associados à sua expressão limitada exclusivamente a *Lu. longipalpis*, vetor do calazar, teve-se por objetivos:

- 1) detectar anticorpos anti-Max em amostras de soro de pacientes com LTA e de controles;
- 2) verificar a expressão protéica e genética de Max em *Lu. neivai*, vetor da LTA na região estudada.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1. Casuística

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Processo HCRP no. 5886/2002), deu-se início ao levantamento dos prontuários dos pacientes com diagnóstico confirmado de LTA, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), no período de 1999 a junho de 2004. A casuística de pacientes com o diagnóstico de LTA foi composta obedecendo-se, além do critério de nº 1, no mínimo um dos seguintes critérios de inclusão:

1. Diagnóstico clínico-epidemiológico compatível com LTA. Para aqueles pacientes com a forma cutânea, pela relevância da espécie do flebótomo implicada na LTA, considerou-se somente os provenientes da região nordeste do estado de São Paulo.
2. Intradermorreação de Montenegro (IRM) positiva. Para tal foram utilizados os antígenos produzidos pelo Instituto Adolfo Lutz (suspensão ultrassonicada de *Leishmania* em salina fluoretada e fenicada) e pelo laboratório Reagentes Biológicos Pimenta Abreu (antígeno de culturas puras de *Leishmania (V.) braziliensis*) de acordo com sua disponibilidade no Ambulatório de Dermatologia.
3. Exame histopatológico de amostra de pele ou de mucosa com descrição de infiltrado linfocitário granulomatoso com predomínio de plasmócitos, incluída a presença de parasitos sugestivos do gênero *Leishmania*.
4. Reação sorológica de imunofluorescência indireta (RIFI) para LTA positiva. Os testes sorológicos foram realizados segundo especificações do kit adquirido da Fiocruz.
5. PCR (*polymerase chain reaction*) positiva para pesquisa de leishmania em amostras de pele ou de mucosa, além da identificação da espécie por seqüenciamento de DNA ou por PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*).

Não havendo critério de exclusão para a composição da casuística, foram selecionados 41 pacientes que melhor preenchiam os critérios de inclusão para o diagnóstico de LTA supracitados.

### **3.2. Grupo controle**

O grupo controle foi composto por 63 doadores saudáveis do Banco de Sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

**Tabela 1.** Dados demográficos e clínico-laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LTA, atendidos no HC-FMRP-USP, de 1999 a junho de 2004

AMOSTRA	IDADE (anos)	SEXO	PROCEDENCIA	ZONA	PROFISSAO	TEMPO DE EVOLUÇÃO (meses)	FORMA CLÍNICA	IRM	PRESENÇA DO PARASITO	RIFI	SEQ	PCR-RFLP
89	56	M	Franca	U	Jardineiro	3	CUT	POS	AUSENTE	1/160	-	<i>Le. braz</i>
90	13	M	Pontal	U	Estudante	12	CUT	NEG	AUSENTE	NEG	<i>Le. braz</i>	<i>Le. braz</i>
99	54	M	Nuporanga	U	Lixeiro	7	CUT	NEG	AUSENTE	1/80	<i>Le. braz</i>	<i>Le. braz</i>
111	17	M	Ituverava	U	Feirante	8	CUT	NEG	AUSENTE	NEG	<i>Le. amaz</i>	<i>L. spp</i>
123	44	F	Sta Rosa	U	Do lar	2	CUT	POS	AUSENTE	1/40	-	NEG
127	54	M	Taquaritinga	U	Aposentado	3	CUT	NEG	PRESENTE	1/40	<i>Le. braz</i>	<i>Le. braz</i>
129	32	M	Ribeirão Preto	U	Mecânico	4	MUC	Sem dados	PRESENTE	1/320	-	-
135	52	M	Serrana	U	Inativo	4	CUT	Sem dados	PRESENTE	1/80	-	<i>Le. braz</i>
136	40	M	Ribeirão Preto	U	Serviços gerais	3	CUT	NEG	AUSENTE	1/80	-	<i>Le. braz</i>
138	46	M	Guariba	U	Tratorista	4	CUT	POS	PRESENTE	1/80	-	<i>Le. braz</i>
139	58	M	Ribeirão Preto	U	Professor	5	CUT	NEG	PRESENTE	1/40	-	<i>Le. braz</i>
140	37	M	Ribeirão Preto	U	Pedreiro	2	CUT	POS	AUSENTE	NEG	<i>Le. braz</i>	<i>L. spp</i>
147	52	M	Tambaú	U	Fomeiro	72	MUC	POS	AUSENTE	NEG	-	-
158	40	M	Ribeirão Preto	U	Auxiliar de Enfermagem	1	CUT	POS	AUSENTE	NEG	<i>Le. braz</i>	<i>Le. Braz</i>
159	51	F	Rincão	U	Aposentado	3	CUT	NEG	AUSENTE	NEG	<i>Le. braz</i>	<i>Le. Braz</i>
160	64	M	Ribeirão Preto	U	Operário	4	CUT	NEG	AUSENTE	1/320	-	NEG
165	58	M	Guariba	U	Agricultor	7	CUT	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
166	53	F	Ituverava	U	Lavrador	2	CUT	POS	AUSENTE	1/80	-	<i>L. spp</i>
167	34	M	Santa Rosa do Viterbo	U	Lavrador	18	CUT	NEG	AUSENTE	1/80	-	NEG
178	64	M	Serrana	U	Motorista	3	CUT	POS	PRESENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
213	45	F	Ribeirão Preto	U	Cabeleireiro	4	CUT	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
2/242	3	F	Pontal	U	Menor	6	CUT	NEG	AUSENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
4/249	65	M	São Sebastião do.Paraíso	R	Lavrador	240	MUC	NEG	PRESENTE	1/80	-	<i>Le. Braz</i>
5/246	58	M	Estado da Bahia São Sebastião	U	Lavrador	240	MUC	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>L. spp</i>
6/235	56	M	do.Paraíso	U	Lavrador	24	MUC	NEG	AUSENTE	1/40	-	-
7/227	51	M	Jardinópolis	U	Lavrador	72	MUC	POS	PRESENTE	1/40	-	-



9/221	50	M	Jaboticabal	U	Lavrador	6	CUT	POS	AUSENTE	1/40	-	<i>L. spp</i>
10/248	29	M	Ribeirão Preto	U	Pedreiro	9	CUT	POS	PRESENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
12/252	32	M	Ribeirão Preto	U	Pedreiro	300	MUC	POS	PRESENTE	1/80	-	<i>Le. Braz</i>
14/230	22	M	Sertãozinho	U	Marceneiro	12	MUC	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>L. spp</i>
17/256	62	M	Luiz Antonio	U	Aposentado	60	MUC	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>L. spp</i>
19/262	53	F	Delfinópolis	U	Do lar	10	CUT	POS	AUSENTE	1/40	-	-
20/261	27	M	Luiz Antonio	U	Pedreiro	31	CUT	POS	AUSENTE	1/80	-	-
21/263	36	M	Cajuru	U	Lavrador	18	CUT	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>L. spp</i>
29/272	44	M	Descalvado	U	Comerciante	4	CUT	POS	AUSENTE	1/40	-	<i>Le. Braz</i>
31/232	33	M	Delfinópolis	U	Lavrador	4	CUT	POS	AUSENTE	NEG	-	<i>Le. Braz</i>
32/195	9	F	Ribeirão Preto	U	Menor	5	CUT	POS	PRESENTE	NEG	-	<i>L. spp</i>
35	63	M	Serrana	R	Lavrador	2	CUT	Sem dado	PRESENTE	1/40	-	-
38/277	39	F	Porto Ferreira	U	Do lar	12	CUT	POS	AUSENTE	1/40	-	<i>Le. Braz</i>
40/287	37	M	Descalvado	U	Motorista	4	CUT	Sem dado	PRESENTE	1/320	-	<i>Le. Braz</i>
41/291	34	M	Estado de Goiás	R	Lavrador	36	MUC	POS	AUSENTE	1/40	-	<i>Le. Braz</i>

IRM: intradermoreação de Montenegro; RIFI: reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose; SEQ: sequenciamento de DNA; PCR-RFLP: *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorfism*; M: masculino; F: feminino; U: urbana; R: rural; CUT: cutânea; MUC: mucosa; POS: positiva; NEG: negativa; -: não realizado; *Le. braz*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Le. amaz*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

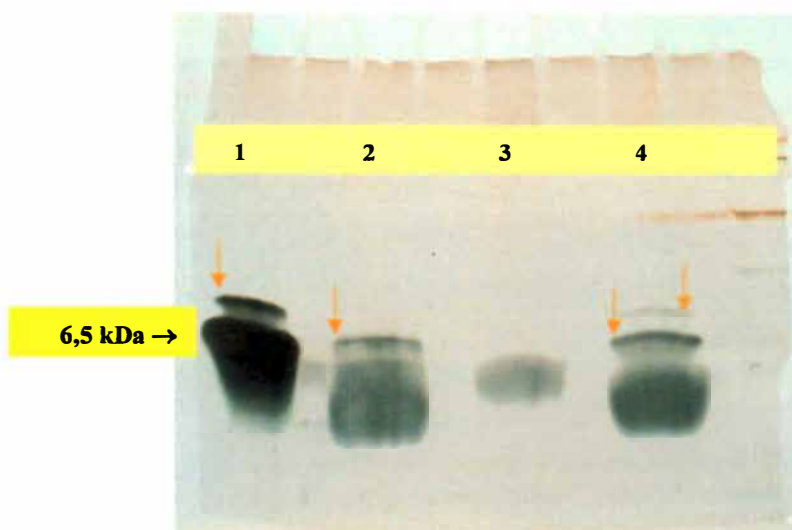
### 3.3. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-Max

A técnica de ensaio imunoenzimático não competitivo indireto (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-Max foi padronizada no Laboratório de Sorologia, HC-FMRP-USP. O peptídeo recombinante produzido em *Escherichia coli*, Max, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ethan A. Lerner, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Realizou-se a sensibilização da placa de microtitulação (Dynatech Immulon<sup>TM</sup> 2) de 96 poços com 50µL de Max diluídos em TCB (tampão carbonato-bicarbonato), perfazendo a concentração entre 120 e 125µg/mL de Max por poço, seguida de incubação por 48 horas, a 4<sup>o</sup>C. Descartou-se o excesso da solução remanescente nos poços e, a seguir, lavou-se a placa com 300µL de PBS-T20 (salina tamponada com fosfato-Tween 20) por 3 vezes, com intervalos de 1 minuto, e o fluido restante foi desprezado por inversão da placa sobre papel absorvente. Adicionou-se 100µL da amostra de soro diluída (1/50) em PBS-TM (salina tamponada contendo 5% de leite desnatado). Após período de incubação (2 horas, 37°C) e lavagem, foram adicionados aos poços 50µL do conjugado anticorpo-enzima (anti-IgG humana específica para cadeia γ-peroxidase – Sigma) diluído em PBS-T20 contendo 50% de soro bovino fetal. Seguiu-se novo período de incubação (2 horas, 37°C) e lavagem. Adicionaram-se 100µL do substrato (o-fenilenodiamina di-hidrocloro – OPD – Sigma) aos poços e aguardou-se o desenvolvimento de cor, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, e a leitura processada em 492nm em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS).

Os experimentos foram feitos em momentos diferentes e com três lotes distintos da proteína Max. Teve-se o cuidado de se verificar a integridade da proteína destes lotes realizando-se eletroforese com concentrações semelhantes da proteína de cada lote (Figura

7). Como padrão, utilizou-se a proteína aprotina, de conhecido Peso Molecular de 6,5kDa, gentilmente cedida pelo Prof. Lewis Joel Greene, FMRP-USP.



**Figura 7. Gel de acrilamida 15% mostrando eletroforese da proteína Max (aproximadamente 7kDa) dos três diferentes lotes.** 1. Peso Molecular - proteína aprotina de 6,5kDa; 2. Max lote 143 $\mu$ g/mL (0,572 $\mu$ g/ $\mu$ L); 3. Max lote 323 $\mu$ g/mL (0,646 $\mu$ g/ $\mu$ L); 4. Max lote 1,2mg/mL (0,600 $\mu$ g/ $\mu$ L). As frações apontadas pelas setas representam dímeros da proteína.

Para o experimento ELISA, realizaram-se curvas de titulação para cada lote de Max recebido. O *cut off* foi determinado a partir dos títulos de ELISA obtidos para o grupo controle. Este foi calculado com a média desses títulos somada a dois desvios padrões. Em dois experimentos (vide anexo), realizou-se ainda a CIE (contraimuno eletroforese) contra Max com os soros do grupo controle, conforme descrito a seguir, e para o cálculo do *cut off* nestes respectivos experimentos, considerou-se somente aqueles controles que apresentaram CIE negativa. Não houve necessidade de realização de CIE dos demais soros

do grupo controle, pois se comparando os títulos de ELISA do grupo controle CIE(-) e CIE(+) não houve significância estatística.

Agruparam-se todos os dados correspondentes aos títulos obtidos pela leitura em espectrofotômetro (D.O.: densidade óptica) nos diferentes experimentos em um único grupo, realizando-se o seguinte cálculo:

$$\text{D.O. final} = \frac{\text{D.O. do soro em estudo}}{\text{cut off do experimento}}$$

### 3.4. Contraimuno eletroforese (CIE) para pesquisa de anticorpos anti-Max

Em gel de agarose 1%, aplicou-se 8µL do antígeno Max conforme a concentração do lote recebido (328µg/mL no experimento com soros do grupo controle e 1,2mg/mL em experimentos com soros de coelhos sadios) nos poços correspondentes ao pólo negativo da cuba de eletroforese (Bio-Rad) e 15µL dos soros (1:1) nos poços do pólo positivo. Após imersão do gel em tampão barbital-sódico, aplicou-se corrente elétrica 30mA por 1 hora. A seguir, para a leitura, corou-se o gel com azul brilhante – Coomassie Blue (Laboratório Sigma).

### 3.5. Extração de RNA, DNA e de proteínas.

A extração de RNA, de DNA e de proteínas foi realizada pelo método Trizol. As amostras foram extraídas de exemplares de *Lu. longipalpis* (controle positivo), criados em insetário e cedidos gentilmente pela Dra. Alda Falcão, FioCruz-BH, e de 30 espécimes de

*Lu. neivai*, flebótomos coletados em campo e identificados pelo Dr. Cláudio Casanova, SUCEN-Mogi Guaçu. Os espécimes de flebótomos foram conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para a extração, utilizaram-se dez segmentos cefálicos de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* separados do corpo com pinça estéril. Inicialmente, fez-se a homogeneização com 1mL de trizol para cada 50-100mg de tecido, até a dissolução completa. A seguir, incubou-se a amostra por 5 minutos, em temperatura ambiente, com 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio para cada mL de trizol utilizado, homogeneizando-se vigorosamente por 15 segundos. Após 10 minutos, em temperatura ambiente, centrifugou-se a amostra a 12.000g por 14 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Transferiu-se a fase aquosa para outro eppendorf estéril, deixando-o para os passos seguintes. Adicionaram-se 500 $\mu\text{L}$  de isopropanol, deixando-se em temperatura ambiente por 10 minutos e, após, centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , com precipitação e formação de pellet contendo o RNA. Lavou-se o pellet com 1mL de etanol 75%, homogeneizou-se a amostra e centrifugou-se a 7.000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Desprezou-se o sobrenadante, secou-se o pellet, seguido por ressuspensão com 100 $\mu\text{L}$  de água DEPC (dietilpirocarbonato) e, após incubação a  $55^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, obteve-se a solução contendo o RNA.

Depois da remoção total da fase aquosa do tubo inicial, adicionaram-se 300 $\mu\text{L}$  de etanol e centrifugou-se a 2.000g por 5 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Removeu-se cuidadosamente e estocou-se em tubo limpo a nova fase aquosa (fase incolor, branca e vermelha) para posterior extração de proteínas. Deixou-se somente o pellet contendo o DNA, lavando-o com 1mL de citrato de sódio 0,1M diluído em etanol 10%. A amostra foi mantida em temperatura ambiente, com homogeneização periódica durante 30 minutos, seguida por centrifugação a 2000g por

10 minutos, a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 1,5mL de etanol 75%. Após nova centrifugação a 2.000g por 5 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante, secou-se o pellet por aproximadamente 15 a 30 minutos em capela de fluxo laminar, dissolvendo-o em 100µL de NaOH, 8mM pH= 8,4, obtendo-se o DNA.

A partir da fase líquida do sobrenadante obtido no início da extração de DNA, realizou-se a extração de proteínas. Para isso, adicionou-se isopropanol (1:1), deixando a amostra em temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, lavou-se o pellet três vezes com 2mL da solução de hidrocloreto de guanidina 0,3M diluído em etanol 95%, deixando a amostra por 20 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 7.500g por 5 minutos a 4°C e ressuspendeu-se o pellet em 1,5mL de etanol absoluto. A amostra foi homogeneizada em vortex e colocada, novamente, por 20 minutos em temperatura ambiente, homogeneizando-se periodicamente. Centrifugou-se a 7.500g por 5 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante e secou-se o pellet na capela por aproximadamente 15 a 30 minutos. Este foi dissolvido em 100µL de SDS (sulfato duodecil de sódio) 1%, colocado a 50°C por 3 minutos e transferido o sobrenadante para um tubo limpo.

A quantificação de RNA/DNA e de proteínas extraídas foi realizada em espectrofotômetro de absorção em 260nm e 280nm, respectivamente (Beckman Coulter DU 640).

### 3.6. Eletroforese de proteínas

As amostras, Max (0,33µg/µL), proteína extraída de *Lu. longipalpis* (0,02µg/µL) e de *Lu. neivai* (0,01µg/µL), foram submetidas à eletroforese vertical (Bio Rad) em gel de

acrilamida 12,5% após fervura por 3 minutos a 100°C e tratamento com mercaptoetanol. Utilizou-se o tampão Tris/glicina, preparado no laboratório, e corrente elétrica 100V/30mA por 1 hora e 20 minutos. O gel foi corado pelo método da prata (aperfeiçoado Blum et al, 1987) e fotografado.

### **3.7. Immunoblotting**

Os antígenos foram transferidos eletroforéticamente do gel de acrilamida para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o Mini Trans-Blot. Colocou-se a membrana dentro de uma solução bloqueadora, num ângulo de 45°, em agitação, por 1 hora, em temperatura ambiente. Retirou-se a solução bloqueadora e adicionou-se TTBS (tampão Tris buffer salina), lavando-a por 10 minutos, em temperatura ambiente, com leve agitação. Depois de retirada do banho com TTBS, adicionou-se a solução com anticorpo primário (soro de coelho imunizado 1:20) à membrana, incubando-a por 2 horas, em leve agitação. Removeu-se o anticorpo primário com duas lavagens com TCBS (Tween Citrato buffer salina) por 5 minutos e em temperatura ambiente. Desprezou-se o TCBS e adicionou-se o anticorpo secundário (Proteína G conjugada com peroxidase – BioRad 170-6467), incubando-se por 2 horas, com leve agitação, em temperatura ambiente. A lavagem final foi realizada com remoção da solução do conjugado e lavando-se a membrana, por 2 vezes, com solução TTBS, por 5 minutos e leve agitação em temperatura ambiente. Lavou-se a membrana, ainda, em TBS por 5 minutos, em temperatura ambiente, com leve agitação para remover o Tween-20 residual da superfície da membrana. Procedeu-se à revelação, com adição de 600µL do reagente B em 100mL do tampão de cor em temperatura ambiente, e esta solução final a 20mL do reagente de cor A, sendo utilizada imediatamente. Imergiu-se a membrana

nessa solução reveladora até surgimento de cor, evitando períodos superiores a 45 minutos. Em seguida, lavou-se a membrana em água destilada por 10 minutos com leve agitação e fotografou-se.

### **3.8. Dot blot**

Dois  $\mu\text{L}$  das amostras de proteína extraída de *Lu. longipalpis* (0,0945  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e de *Lu. neivai* (0,1092  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foram aplicadas em membrana da nitrocelulose (BioRad 162.0145) e posteriormente bloqueados com uma solução composta por leite desnatado 5% e buffer Tris-tween 20 0,1%. Incubou-se a membrana previamente sensibilizada com soros de coelho imune (descrito a seguir) e coelho não-imune (1/10, 1/25 e 1/50 em buffer Tris-tween), com soros do grupo controle e com soros do grupo LTA (1:25), overnight, a 4°C. Após várias lavagens em buffer Tris-tween, incubou-se com proteína G (BioRad) por 2 horas e utilizou-se solução reveladora (BioRad) para visualização.

Além do *dot blot*, realizou-se CIE contra o antígeno Max com soros de coelhos imunizado, não imunizado e, ao acaso, foram recrutados mais 8 coelhos sadios mantidos em biotério para o experimento. A técnica já foi previamente descrita no item 3.4.

### **3.9. Imunização de coelho contra a proteína Max**

O coelho imune, acima citado, foi imunizado contra Max, pois se necessitava de um controle sabidamente positivo. Resumidamente, a técnica de imunização consistiu em: fez-se 4 alíquotas de 0,1mL de Max [150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] diluídos em 2mL de soro fisiológico. A seguir, fez-se emulsão de uma dessas alíquotas (0,5mL) com 0,5mL de adjuvante de Freund, que foi injetada nas coxas do coelho (dia 1). Nove dias após, outra dose foi injetada



na musculatura do membro anterior próximo à axila (dia 10). No dia 20, a 3ª alíquota, adicionada ao adjuvante de Freund (1,0mL), foi distribuída em quatro pontos, nas cinturas dianteira e traseira. No dia 30, procedeu-se à nova injeção como *booster*.

### 3.10. PCR (polymerase chain reaction) para pesquisa do gene Max em *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai*

Para a verificação da expressão gênica do Max em amostras de DNA extraídas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai*, utilizou-se a PCR com *primers* específicos para Max (Invitrogen) que resultam em produtos de 106bp (Figura 8).

*sense*: 5' GCCATAGATGACTGCCAGAAGC 3'

*no sense*: 5' TTCCAGGTAGTTGGGAGGTATCC 3'

A PCR foi realizada com volume final de 25µL contendo buffer 10x 2,5µL, dntp 2mMol 5µL, água estéril 10,3µL, *primer sense* (100pmol) 1µL, *primer antisense* (100pmol) 1µL, e Taq DNA polimerase 0,2µL. A esta mistura foram adicionados 5µL do DNA extraído da amostra a ser amplificada (0,28µg/µL). Utilizou-se um tubo “branco” com água ao invés de DNA para controle negativo.

As amostras foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems 9700), obedecendo-se o seguinte ciclo de aproximadamente 2 horas e 30 minutos:

- 93°C por 30 seg,
- 94°C por 3 min e 30 seg, 52°C por 1 min, 72°C por 1min – 35 ciclos
- 72°C por 10 min, e a seguir por 4°C.

```

1  aatcaattgc taaaaaaaa ttacaaatag aactactaca gatgttctga atttttctt
61 gatattcttt ctcaattgga tgtataaaag aggctatfff gtgctgattf tgtagtcag
121 tattctgata aactgcaaaa atgaagcaaa tcttttaat ctctttggtg gtggttcttg
181 cegtgtttgc cttcagtaag ttcttcttt aggctttcc ttctcaaac ttaaagtaat
241 ttaatgaaat attctttaa taatcctcat ttctttag acgttgctga gggctgtgat
301 gcaacatgcc aatttcgcaa ggccatagat gactgccaga agcaggctg ca tcatagcaat
361 gttttcaga cttctgt aca aacaactgca acattcacat caatggatac ctcccaacta
421 cctggaaata gtgtctcaa agaattgatg aagcagaaga aaaaggaatt tagttcagga
481 aagtaaaaga ttgaagaaaa tttagccga ggagagaaag aaagaaagtc ccataccata
541 tttgtttgt taattgtaac gaattttccg aaaaaataaa atattatgca ctcaattta

```

**Figura 8. Gene do Maxadilan** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=159451>).

Em amarelo, os *primers* utilizados na PCR, cujo produto final corresponde à sequência de 106pb. Os destaques em vermelho e azul mostram os sítios de restrição das enzimas *Hha I* e *Rsa I*, respectivamente.

Para a identificação das bandas de DNA, foram aplicados 4 $\mu$ L da amostra amplificada adicionando-se 5 $\mu$ L de corante (*Loading buffer*) em gel de acrilamida 10% não desnaturante, que foi submetido à eletroforese vertical (Bio-Rad) com tampão TBE 1X, a 150 V por 2 horas. Estas correram juntamente com o marcador de peso molecular (PM) de 10bp. Os géis foram revelados pela prata e dispostos em placas de vidro para secagem e formam fotografados.

### 3.11. Restrição do DNA por PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism)

A partir da seqüência de nucleotídeos amplificada de 106bp, utilizaram-se as enzimas de restrição *Hha I* (Biolabs R0139S) e *Rsa I* (Biolabs R0167S). *Hha I* age sobre o sítio de restrição G↑CG↓C, gerando duas seqüências: aproximadamente 25 e 80bp. Já a *Rsa I* atua no sítio GT↓AC resultando em duas seqüências de aproximadamente 55bp. A Figura 8 mostra a seqüência amplificada de 106bp, os *primers* utilizados e o sítio de restrição das enzimas *Hha I* e *Rsa I* (Biolabs 1675).

Utilizou-se 1,0µg de DNA do produto da PCR, 1,0µL do buffer e 5U da enzima de restrição *Hha I* ou 10U de *Rsa I*, que são completados com água em volume final de 10µL, e submetidos à temperatura de 37°C, *overnight*. Para a visualização das bandas, aplicaram-se 5µL do material digerido adicionados a 5µL de corante (*Loading buffer*) em gel de acrilamida 10% não desnaturante, submetendo-se à eletroforese vertical com tampão TBE, a 150V por 2 horas. Estas correram juntamente com 2µL do marcador de peso molecular (PM) de 10bp. Os géis foram revelados pela prata e dispostos em placas de vidro para secagem e, posteriormente, fotografados.

### 3.12. Seqüenciamento dos produtos da PCR

Realizou-se nova PCR com o *primer sense* ou *anti sense* e com os nucleotídeos marcados segundo o kit sugerido do fabricante e suas normas (DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator, Applied Biosystems). Para este seqüenciamento, além dos *primers* já utilizados, foi desenhado um novo *primer sense*, cujo produto final amplificado é maior (248bp), favorecendo o seu seqüenciamento (Figura 9).

```

1 aatcaattgc taaaaaaaaa ttacaaatag aactactaca gatgttctga atttttctt
61 gatattcttt ctcaattgga tgtataaaag aggctatfff gtgctgattf tgtagtcag
121 tattctgata aactgcaaaa atgaagcaaa tcctttaat ctctttggtg gtggttcttg
181 cctgtttgc ctccagtaag ttctccttt aggctttcc ttctcaaaac ttaaagtaat
241 ttaatgaaat attctttaa taatctccat tttctttag acgttgctga gggctgtgat
301 gcaacatgcc aatttcgca ggccatagat gactgccaga agcaggcgca tcatagcaat
361 gttttgcaga ctctgtaca aacaactgca acattcacat caatggatac ctcccaacta
421 cctggaaata gtgtcttcaa agaatgtatg aagcagaaga aaaaggaatt tagttcagga
481 aagtaaaaga ttgaagaaaa tttagccga ggagagaaag aaagaaagtc ccataccata
541 tttgtttgt taattgtaac gaatttccg aaaaaataaa atattatgca ctcaattta

```

**Figura 9. Gene do Max** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=159451>). Em amarelo, os *primers* utilizados na PCR, cujo produto final corresponde à seqüência de 106pb. Em azul, o “novo” *primer sense*, cujo produto final apresenta 246bp.

As amostras de DNA resultantes da PCR, juntamente com o DNA controle positivo cedido pelo fabricante do seqüenciador (pgem), foram colocadas no seqüenciador automático de DNA [ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem)] e a leitura resultante analisada *a posteriori*.

### 3.13. RT-PCR

Utilizaram-se 12uL de RNA extraído pelo método Trizol, e adicionaram-se 8uL de Mix [0,7uL de inibidor de RNase, 4uL de buffer 5x TR (transcriptase reversa), 1uL de dntp, 10mMol, 0,6uL de Transcriptase Reverse (Invitrogen) e 1,7uL de água estéril]. Misturou-se tudo, deixando-se à temperatura de 42°C por 90 minutos e, posteriormente, congelou-se a -20°C. Procedeu-se à PCR, utilizando-se para o cDNA o mesmo protocolo do item 3.10.

### 3.14. Análise estatística

Para a análise dos títulos de anticorpos anti-Max, uma vez que os dados obedeceram à curva de normalidade, utilizou-se o teste t de *student* quando se comparou dois grupos. Para comparação de três grupos ou mais, utilizou-se a Análise de Variância. Para a análise dos grupos dois a dois, foi feito o teste de Tukey.

## **4. RESULTADOS**

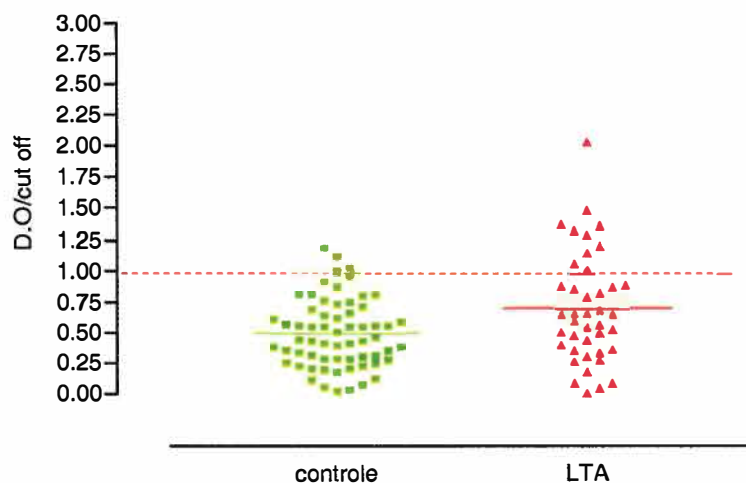
---

Os resultados dos títulos de anticorpos séricos anti-Max são apresentados segundo o experimento realizado [ELISA e CIE (contraimuno eletroforese)]. A descrição dos resultados de cada experimento compreende o grupo de pacientes com LTA e o grupo controle.

#### **4.1. Títulos de anticorpos séricos anti-Max pelo método ELISA**

Os soros do grupo controle não reagentes para Max, quando empregada a CIE (contraimuno eletroforese), foram titulados por ELISA, e seus títulos foram considerados para a determinação do *cut off* do experimento ELISA (vide item 4.2).

Comparando-se os anticorpos anti-Max, detectados pelo método ELISA, em soros de pacientes com LTA (títulos variando entre 0,020 e 2,040; média: 0,708; desvio padrão: 0,450 D.O./*cut off*) e em controles (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./*cut off*), estes foram significativamente maiores no grupo LTA ( $p=0,0043$ ) (Figura 10).



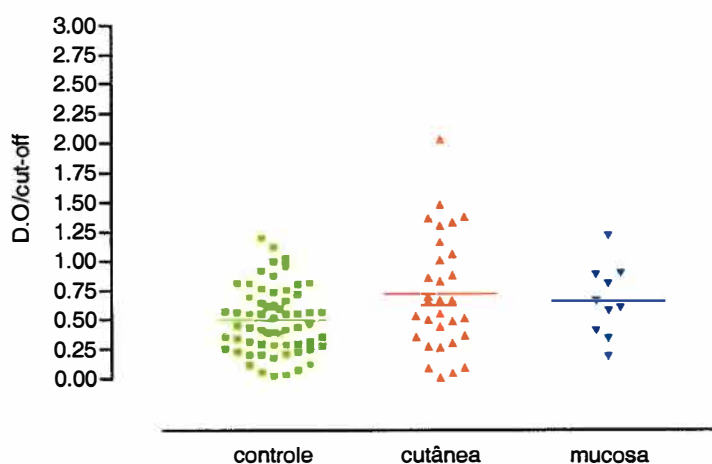
**Figura 10. Títulos de anticorpos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos soros de pacientes com LTA e no grupo controle.** D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492nm; *cut off*: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores; linha pontilhada: valor da D.O. = *cut off*. Os títulos no grupo LTA são maiores que no grupo controle (teste t de *student*:  $p=0,0043$ ).

Para melhor interpretação dos resultados de títulos de anticorpos anti-Max, dividiu-se o grupo de pacientes com LTA segundo a forma clínica (cutânea ou mucosa), a resposta à IRM (positiva ou negativa), o resultado da RIFI (positiva ou negativa), o encontro de parasitos no exame histopatológico de pele ou mucosa (presente ou ausente) e o tempo de evolução da doença (0 a 4 meses, 4 a 8 meses e maior de 8 meses). Todos estes dados encontram-se na tabela 1 em Material e Métodos.



#### 4.1.1. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo a forma clínica

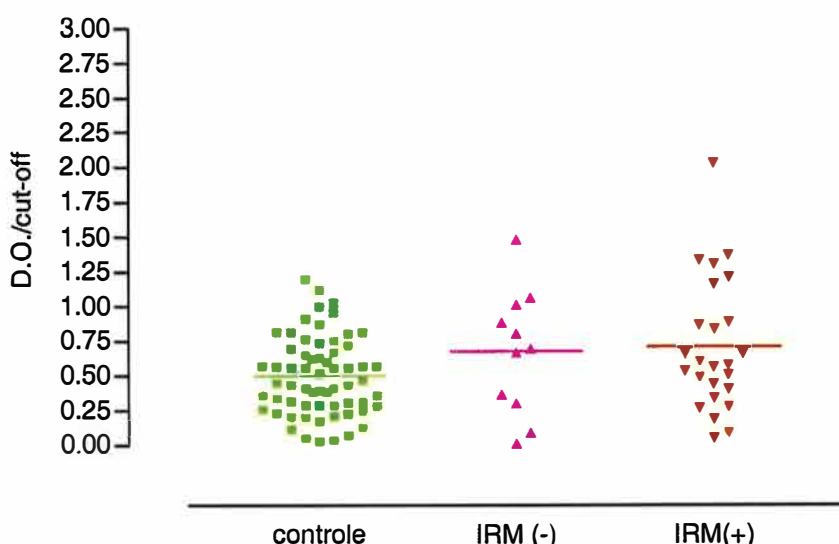
A comparação dos títulos de anticorpos anti-Max detectados no grupo controle (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./cut off), no grupo LTA forma cutânea (títulos variando entre 0,020 e 2,040; média: 0,724; desvio padrão: 0,491 D.O./cut off) e LTA forma mucosa (títulos variando entre 0,190 e 1,220; média: 0,661; desvio padrão: 0,306 D.O./cut off) foi significativa (teste análise de variância:  $p=0,016$ ). Comparando-se os grupos 2 a 2, os títulos do grupo LTA forma cutânea resultaram maiores do que os do grupo controle ( $p<0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11. Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA forma cutânea e LTA forma mucosa. D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492 nm; cut off: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores. Na comparação entre os grupos, houve significância entre os grupos controle e LTA forma cutânea (teste de Tukey:  $p<0,05$ ).**

#### 4.1.2. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo a resposta à IRM

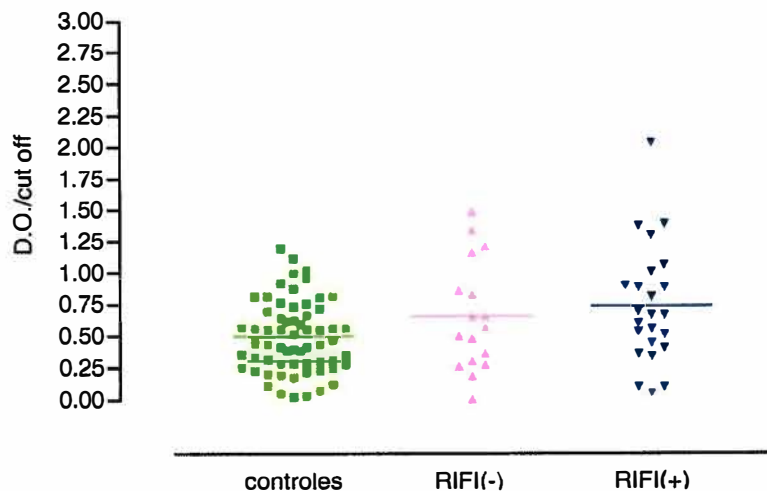
A comparação dos títulos de anticorpos anti-Max, detectados pelo método ELISA, no grupo controle (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./cut off), no grupo LTA com IRM (-) (títulos variando entre 0,020 e 1,490; média: 0,677; desvio padrão: 0,446 D.O./cut off) e LTA com IRM (+) (títulos variando entre 0,060 e 2,040; média: 0,712; desvio padrão: 0,476 D.O./cut off) foi significativa (teste análise de variância:  $p=0,0302$ ). Na comparação dos grupos 2 a 2, os títulos de anti-Max no grupo LTA com IRM (+) foram maiores do que nos controles ( $p<0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com IRM negativa (-) e LTA com IRM positiva (+). D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492 nm; cut off: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores. Na comparação entre os grupos, houve significância comparando-se grupos controle e LTA com IRM (+) (teste de Tukey:  $p<0,05$ ).

#### 4.1.3. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo o resultado da RIFI

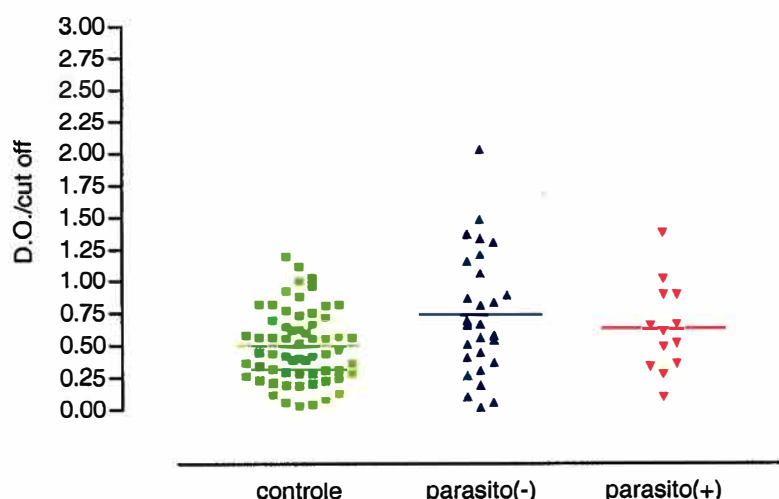
Quando comparados os grupos controle (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./cut off), LTA com RIFI (-) (títulos variando entre 0,020 e 1,490; média: 0,663; desvio padrão: 0,433 D.O./cut off) e LTA com RIFI (+) (títulos variando entre 0,060 e 2,040; média: 0,741; desvio padrão: 0,468 D.O./cut off), os títulos de anticorpos anti-Max entre os grupos foram significantes (teste análise variância:  $p=0,0137$ ). Na comparação dos grupos 2 a 2, os títulos de anti-Max do grupo LTA com RIFI positiva foram maiores do que no grupo controle ( $p<0,05$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com RIFI negativa (-) e LTA com RIFI positiva (+). D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492 nm; *cut off*: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores. Na comparação entre os grupos, pelo teste de Tukey, houve significância entre os grupos controle e LTA com RIFI (+) ( $p<0,05$ ).

#### 4.1.4. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo o encontro de parasitos no exame histopatológico de pele ou mucosa

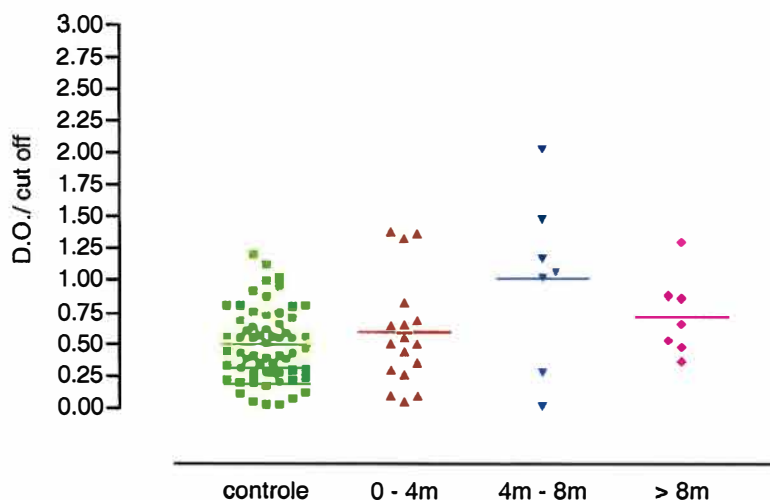
A comparação dos títulos de anti-Max entre os grupos controle (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./cut off), LTA com parasito ausente (títulos variando entre 0,020 e 2,040; média: 0,744; desvio padrão: 0,491 D.O./cut off) e LTA com parasito presente (títulos variando entre 0,100 e 1,390; média: 0,633; desvio padrão: 0,349 D.O./cut off) foi significativa (teste análise de variância:  $p=0,0016$ ). Comparando-se os grupos 2 a 2, os títulos de anti-Max foram maiores no grupo LTA com parasito ausente, comparados aos do grupo controle ( $p<0,01$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Títulos de anticorpos séricos anti-Max, pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA com parasito ausente (-) e LTA com parasito presente (+) no histopatológico de pele ou mucosa. D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492 nm; *cut off*: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores. Na comparação entre os grupos, houve significância entre os grupos controle e LTA com parasito (-) (teste de Tukey:  $p<0,01$ ).

#### 4.1.5. Títulos dos anticorpos anti-Max em soros de pacientes com LTA segundo o tempo de evolução clínica da LTA forma cutânea

Para comparação dos títulos de anticorpos anti-Max entre os grupos controle e LTA segundo tempo de evolução da doença, consideraram-se somente os dados dos pacientes com a forma cutânea, pois nesta forma clínica é possível precisar o seu tempo de evolução, diferentemente da forma mucosa. Os intervalos de tempo estabelecidos foram de 0 a 4 meses (período em que a IRM pode ser negativa), de 4 a 8 meses (período de doença ativa) e maior que 8 meses (período que alguns pacientes evoluem com regressão espontânea). Comparando-se o grupo controle (títulos variando entre 0,030 e 1,200; média: 0,500; desvio padrão: 0,280 D.O./cut off), o grupo LTA com tempo de evolução 0 a 4 meses (títulos variando entre 0,060 e 1,390; média: 0,601; desvio padrão: 0,428 D.O./cut off), LTA com tempo de evolução 4 a 8 meses (títulos variando entre 0,200 e 2,040; média: 1,013; desvio padrão: 0,687 D.O./cut off) e LTA com tempo de evolução maior que 8 meses (títulos variando entre 0,370 e 1,310; média: 0,734; desvio padrão: 0,318 D.O./cut off), houve significância (teste análise de variância:  $p=0,0016$ ). Na comparação entre grupos 2 a 2, os títulos de anti-Max dos grupos LTA 4 a 8 meses foram significativamente maiores do que os do grupo controle ( $p<0,01$ ) (Figura 15).



**Figura 15. Títulos de anticorpos séricos anti-Max, detectados pelo método ELISA, nos grupos controle, LTA 0-4 meses, LTA 4-8 meses e LTA maior que 8 meses.** O tempo corresponde à evolução clínica da forma cutânea da LTA. D.O.: densidade óptica de cada amostra com leitura em espectrofotômetro 492 nm; *cut off*: média da D.O. das amostras do grupo controle somada a dois desvios padrões; linha horizontal: média dos valores. Na comparação entre os grupos, houve significância entre os grupos controle e LTA 4-8 meses (teste de Tukey:  $p < 0,01$ ).

## 4.2. Títulos de anticorpos séricos anti-Max pelo método da CIE (contraimuno eletroforese)

### 4.2.1. Anticorpos anti-Max por CIE com amostras de soro do grupo controle

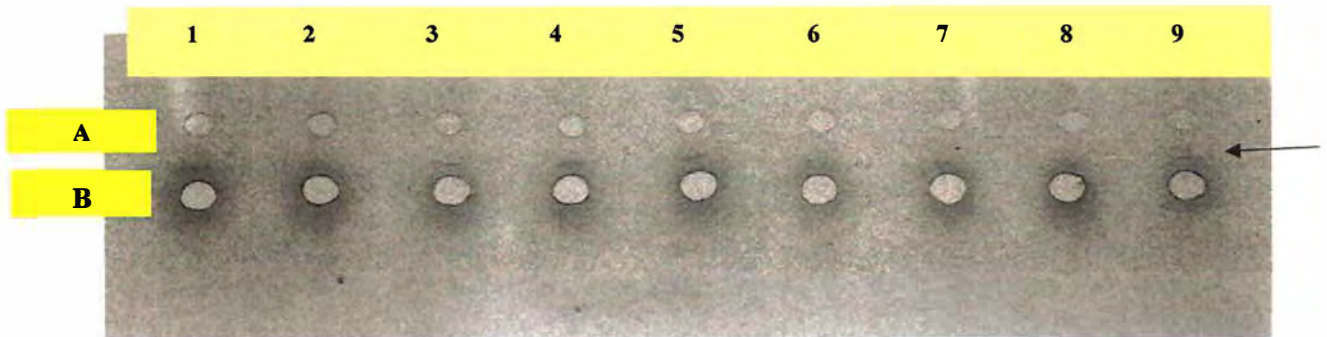
Realizou-se a pesquisa de anticorpos anti-Max por CIE em 27 soros do grupo controle (Figura 16). O objetivo foi detectar, por outra técnica sorológica, a presença ou não de anticorpos anti-Max e, assim, determinar o *cut off* do experimento de ELISA, já que se considerou para seu cálculo somente aqueles controles com CIE não reagente (NR). Os soros, cujos resultados da CIE foram reagentes (40,7%), também foram titulados, com títulos variando de 1/1 a 1/32 (Tabela 2). Comparando-se os títulos de ELISA do grupo

controle CIE(-) e CIE(+) não houve significância estatística. Desta forma, não houve necessidade de realização de CIE dos demais soros do grupo controle.

**Tabela 2.** Títulos de anticorpos séricos anti-Max, pela técnica da CIE, no grupo controle.

<b>No. do soro do grupo controle</b>	<b>Título de anti-Max pela CIE</b>	<b>No. do soro do grupo controle</b>	<b>Título de anti-Max pela CIE</b>
2104	1/4		
2126	NR	6899	NR
6799	1/1	6903	1/32
6807	NR	7042	NR
6813	NR	7043	NR
6915	NR	7054	1/4
6821	NR	7066	1/1
6826	1/16	7067	1/4
6827	1/2	7068	1/16
6837	NR	7076	1/8
6844	NR	7095	NR
6853	NR	7106	NR
6861	NR	7114	1/8
6886	NR	7218	NR

NR: não reagente



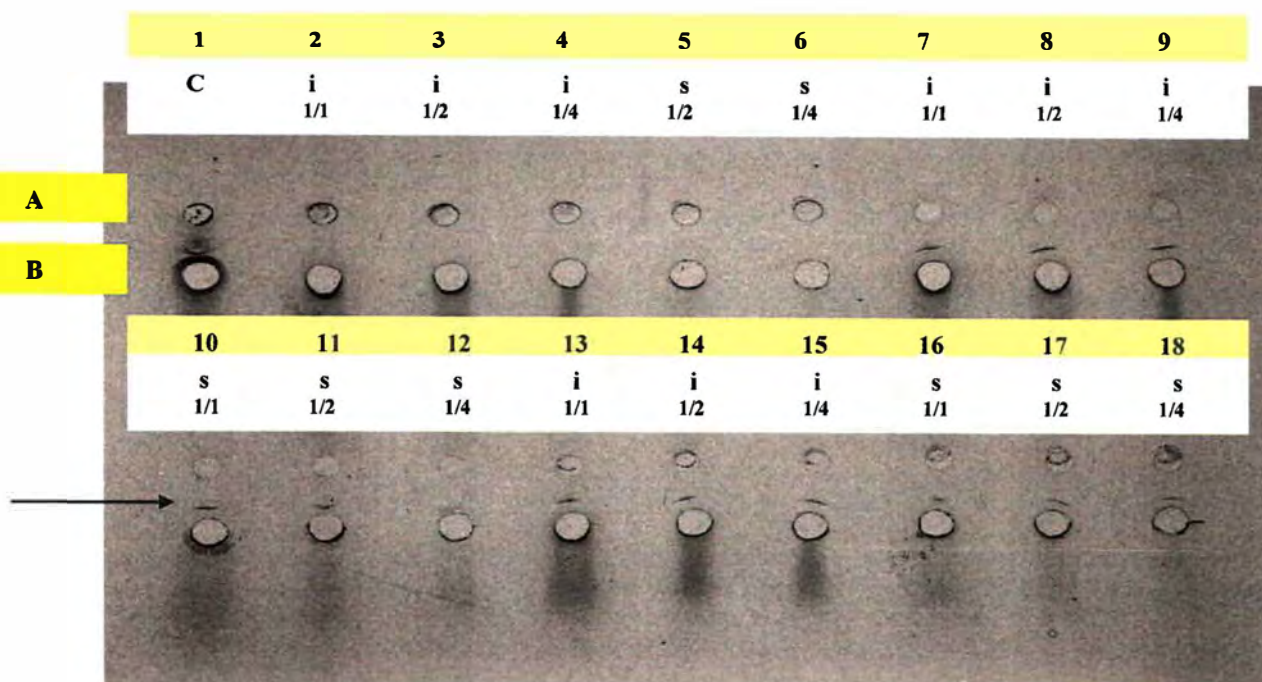
**Figura 16. Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros do grupo controle.** O poço A corresponde ao antígeno Max (328 $\mu$ g/ml). O poço B, aos soros do grupo controle 1:1. Quando, no soro humano há presença de anti-Max, ao se passar a corrente elétrica, na migração do anticorpo e do antígeno, há formação de uma linha de precipitação (seta). Os soros que reagiram contra Max foram: 1; 3-5; e 9. Os soros do grupo controle, cujo resultado da CIE foi não reagente, foram titulados por ELISA, e considerados para a determinação do *cut off* do experimento ELISA (item 4.1).

#### 4.2.2. Anticorpos anti-Max por CIE em soros de coelhos

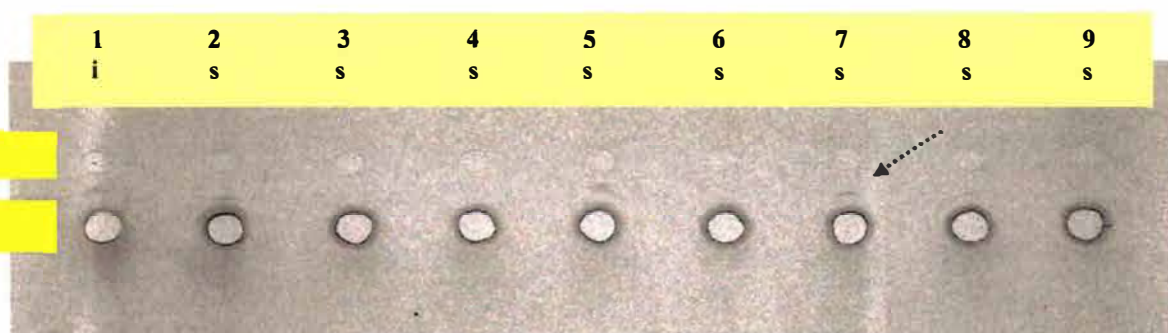
Tornou-se necessária a imunização de um coelho contra Max para a obtenção de soro específico reagente contra Max, que serviu como controle positivo nos experimentos de CIE e de *immunoblotting* (IB).

A pesquisa de anticorpos anti-Max por CIE, utilizando-se soros de coelho imunizado contra Max e não imunizado sadio, mantido em biotério, foi positiva, para ambos, em diluições até 1/4 (Figura 17). Diante dos resultados positivos encontrados para o soro do coelho não imunizado sadio, foram escolhidos, ao acaso, amostras de mais oito coelhos sadios, mantidos em biotério, para outro experimento de CIE. Destes, quatro animais apresentaram resultados da CIE reagentes (Figura 18).





**Figura 17. Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros de coelho imunizado (i) e não imunizado sadio (s).** O antígeno Max ( $8\mu\text{L}$ ) foi utilizado em concentrações distintas (poço A), segundo o lote de Max: (2 – 6) Max  $328\mu\text{g/mL}$ ; (7 – 12) Max  $143\mu\text{g/mL}$  e (13 – 18) Max  $1,2\text{mg/mL}$ . Os soros ( $15\mu\text{L}$ ) foram colocados no poço B, em diluições crescentes até  $1/4$ . Quando, no soro há presença de anticorpos anti-Max, ao se passar a corrente elétrica, na migração do anticorpo e do antígeno, há formação de uma linha de precipitação (seta). No poço 1, foi colocado antígeno de *Paracoccidioides braziliensis* (A) e soro humano (1:1) sabidamente positivo para este antígeno (B), utilizado como controle positivo da reação. Os soros que reagiram contra Max foram: 7 a 18.



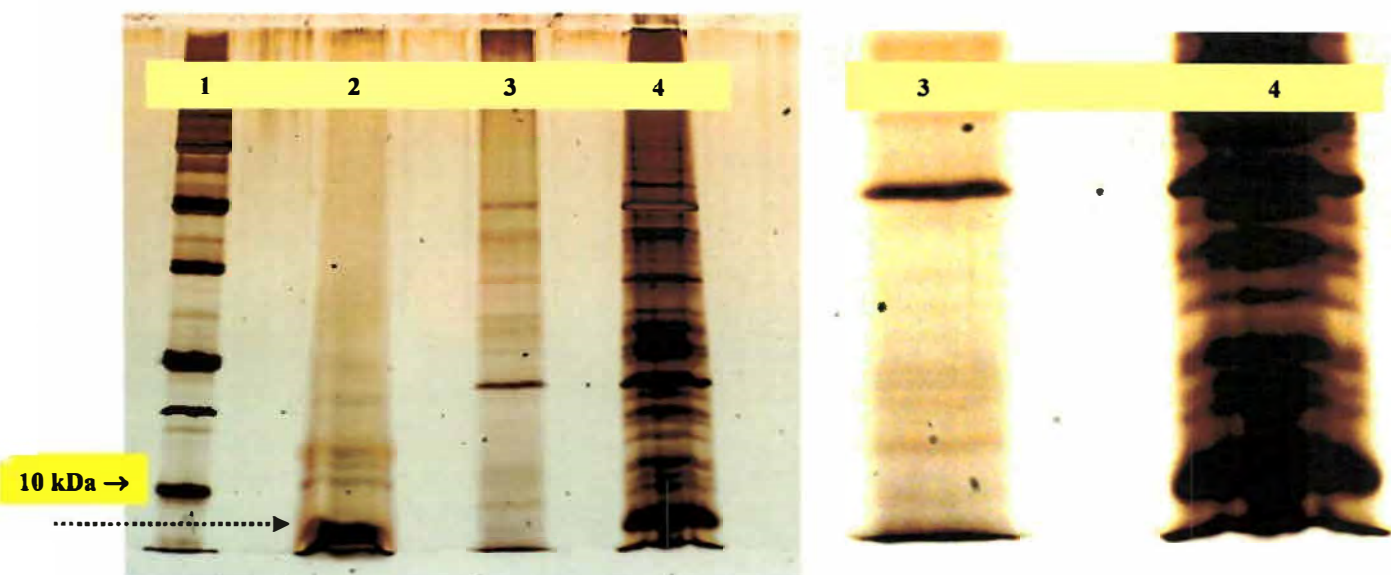
**Figura 18. Placa de agarose 1% de CIE para pesquisa de anticorpos anti-Max com soros de coelho imunizado (i) e não imunizados sadios (s).** O poço A corresponde ao antígeno Max (8 $\mu$ L; 1,2mg/mL). O poço B, ao soro do coelho 1:1 (15 $\mu$ L). Quando, no soro do coelho há presença de anti-Max, ao se passar a corrente elétrica, na migração do anticorpo e do antígeno, há formação de uma linha de precipitação (seta). O poço 1 corresponde ao soro de coelho imunizado (i), os demais, de 2 a 9, aos soros de coelhos sadios (s). Os soros que reagiram contra Max foram: 1-2; 5; 7-8.

Os resultados dos experimentos seguintes referem-se à expressão protéica e gênica de Max no vetor da LTA na região de estudo. No nordeste do Estado de São Paulo, o vetor identificado corresponde a *Lutzomyia neivai*. Como as expressões do gene e da proteína Max foram descritos somente em *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral ou calazar, amostras de proteína e de DNA deste vetor foram utilizadas como controle positivo para as expressões citadas.

### **4.3. Expressão protéica de Max em *Lu. neivai* por eletroforese de proteínas e *immunoblotting***

#### **4.3.1. Eletroforese de proteínas**

Após a extração protéica de amostras de *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis*, as frações de proteínas foram identificadas em gel de acrilamida (Figura 19). Várias frações protéicas foram observadas para as amostras de *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis*. Entre elas, as frações de ambos os vetores, com aproximadamente 7kDa, comparam-se à fração do Max.

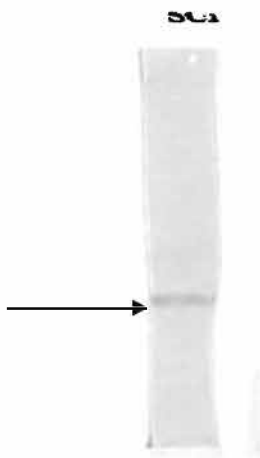


**Figura 19.** Gel de acrilamida 12,5% mostrando eletroforese de proteínas de amostras de *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis* comparadas à proteína Max (aproximadamente 7kDa). 1. PM 10kDa; 2. Max (0,33µg/µL) (seta). As frações acima da seta representam dímeros de Max. 3. Frações protéicas de *Lu. neivai* (0,01µg/µL). 4. Frações protéicas de *Lu. longipalpis* (0,02µg/µL). As frações protéicas de ambos os vetores, correspondentes a 7kDa, comparam-se à fração de Max (seta). Ao lado, detalhe das frações protéicas de *Lu. neivai* (3) e *Lu. longipalpis* (4), correspondentes a 7kDa, equivalentes à proteína Max (linha sob as frações).

#### 4.3.2. Immunoblotting (IB)

Uma vez identificada fração protéica, por eletroforese de proteínas, em amostra de *Lu. neivai*, correspondente às frações de *Lu. longipalpis* e da proteína Max de aproximadamente 7kDa, procedeu-se à confirmação de que seria de fato uma proteína símile ao Max, utilizando-se a técnica de IB.

Inicialmente fez-se IB com a proteína Max e soro de coelho imunizado contra Max, a fim de se confirmar a resposta imune específica do coelho contra a proteína Max (Figura 20). O soro do coelho imunizado contra Max serviu como controle positivo das reações descritas a seguir.

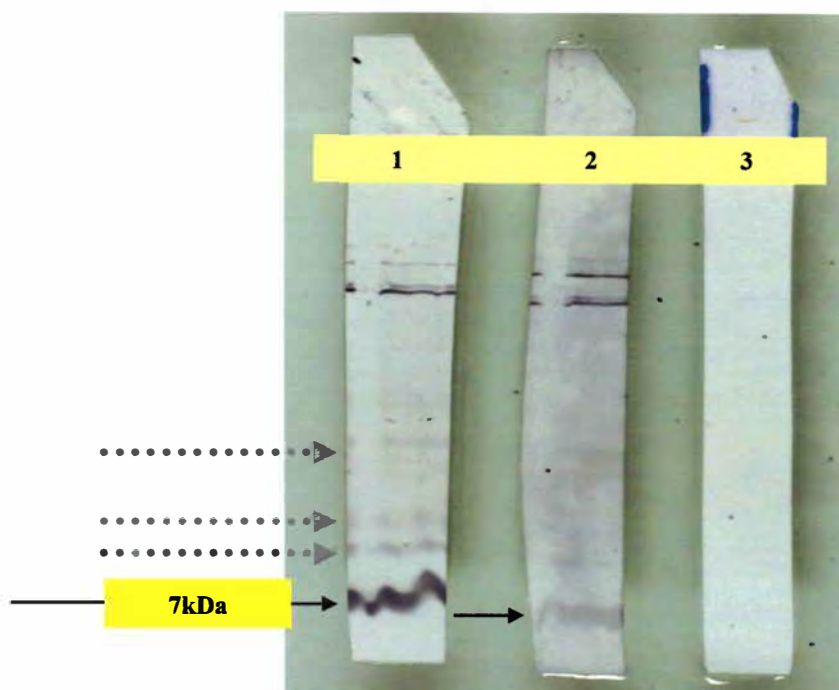


**Figura 20. Immunoblotting da proteína Max.** A membrana de nitrocelulose contendo Max, após a transferência da proteína do gel de acrilamida, foi incubada com soro de coelho imunizado contra Max (1:20) confirmando a sensibilização do coelho contra a proteína Max.

Uma vez confirmada a sensibilização específica do coelho imunizado contra a proteína Max, procedeu-se ao experimento de IB com amostras de proteínas extraídas de *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis*.

Após a transferência de proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai* e sua incubação com soro de coelho imunizado contra Max, observou-se a ligação de anticorpos anti-Max em fração protéica correspondente à proteína Max para ambos os vetores (Figura 21). Isso não foi verificado quando da incubação com soro de coelho não imunizado. Esse

experimento comprovou que a fração protéica de *Lu. neivai*, de aproximadamente 7kDa, corresponde à proteína Max descrita em *Lu. longipalpis*.



**Figura 21.** Immunoblotting com amostras de proteína extraída dos vetores *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai* e soro de coelho sensibilizado contra Max. 1: amostra de proteína extraída de *Lu. longipalpis* (0,04 $\mu$ g/mL) e 2. amostra de proteína extraída de *Lu. neivai* (0,04 $\mu$ g/mL) incubadas com soro de coelho contendo anticorpos anti-Max na diluição 1/20; 3: amostra de proteína de *Lu. longipalpis* (0,04 $\mu$ g/mL) incubada com soro de coelho sadio não imunizado na diluição 1/20. Anticorpos específicos anti-Max reagiram contra a proteína Max, correspondente a aproximadamente 7kDa (seta), contida na amostra protéica de ambos os vetores (1 e 2), assim como, em menor intensidade, com frações de maior peso molecular (seta pontilhada). Observar a menor intensidade de ligação do soro imunizado de coelho à fração correspondente à proteína Max em amostra de *Lu. neivai*.

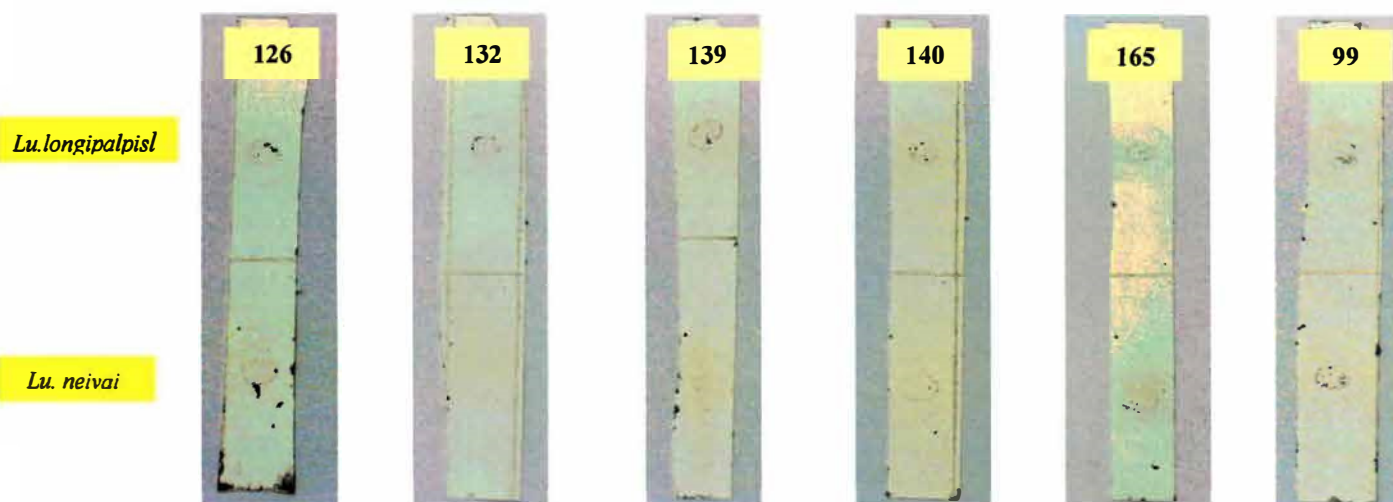
A seguir, são apresentados os resultados de *dot blot*, quando se procurou demonstrar que soros dos pacientes com LTA e controles, assim como de coelhos, reagiam especificamente contra amostras de proteínas de *Lu. neivai* e *Lu. longipalpis*. Esses resultados inferiram que esses soros reagiram contra proteína Max de *Lu. longipalpis* e Max símile de *Lu. neivai*.

#### **4.4. Dot blot com proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai***

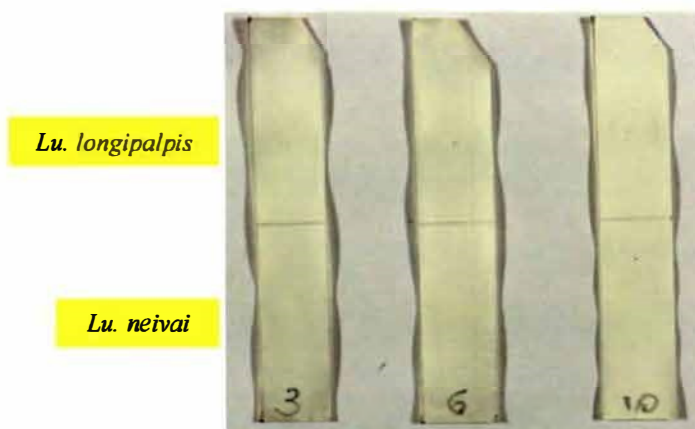
##### **4.4.1. Dot blot com soros de pacientes com LTA e controles**

Para este experimento, utilizaram-se os soros de pacientes do grupo LTA que apresentaram os maiores títulos de anticorpos anti-Max no experimento ELISA e controles com CIE (-).

A pesquisa de anticorpos por *dot blot* contra proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai* em soros de pacientes com LTA mostrou reatividade contra antígenos de *Lu. longipalpis* para todos os seis soros estudados (126, 132, 139, 140, 165 e 99). Contra antígenos de *Lu. neivai*, houve positividade em cinco dos seis soros testados (126, 139, 140, 165 e 99) (Figura 22). Para os soros do grupo controle, constatou-se reatividade somente contra antígenos de *Lu. longipalpis* (Figura 23).



**Figura 22.** Dot Blot com amostras de proteínas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* e soros de pacientes com LTA. Fitas sensibilizadas com 2 $\mu$ L da proteína extraída de *Lu. longipalpis* (0,0945 $\mu$ g/ $\mu$ L) e de *Lu. neivai* (0,1092 $\mu$ g/ $\mu$ L) foram incubadas com soros de pacientes do grupo LTA (1/25). A reação mostrou-se positiva contra antígenos de *Lu. longipalpis* em todos os soros estudados (pontilhado azul). Contra antígenos de *Lu. neivai*, houve positividade nos soros 126, 139, 140, 165 e 99.

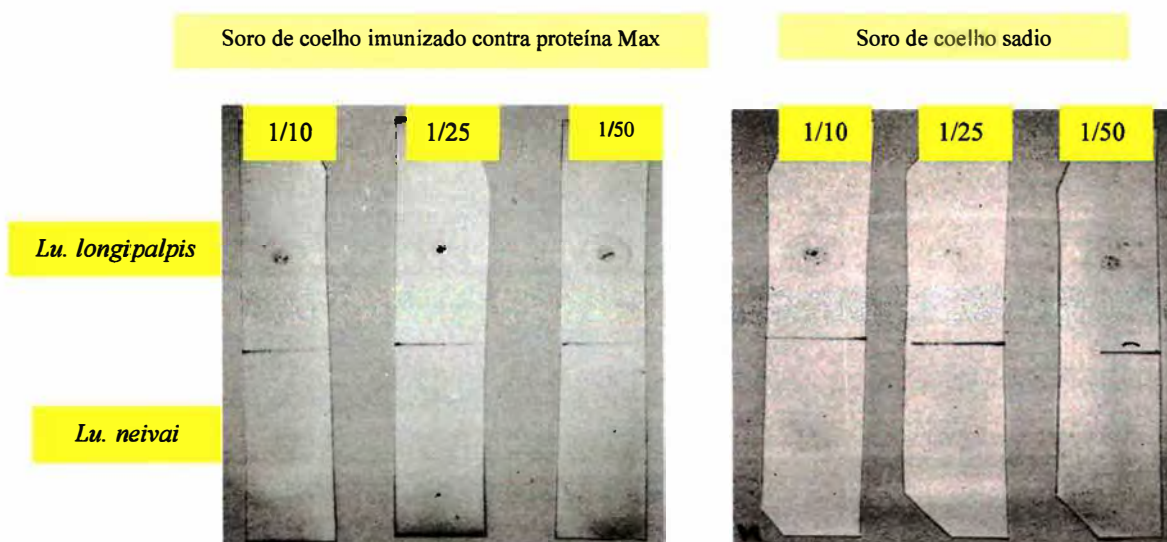


**Figura 23.** Dot Blot com amostras de proteínas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* e soros de controles. Fitas sensibilizadas com 2 $\mu$ L de proteína extraída de *Lu. longipalpis* (0,0945 $\mu$ g/ $\mu$ L) e de *Lu. neivai* (0,1092  $\mu$ g/ $\mu$ L) foram incubadas com soros do grupo controle (1/25). A reação mostrou-se positiva contra antígenos de *Lu. longipalpis* para todos os soros estudados.



#### **4.4.2. Dot blott com soros de coelhos**

A pesquisa de anticorpos por *dot blott* contra proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* foi realizada com soro de coelho imunizado contra Max. Esta se mostrou positiva contra proteínas de *Lu. longipalpis* nas diluições 1/10, 1/25 e 1/50. Para proteínas de *Lu. neivai*, não houve reatividade (Figura 24). Já o coelho sadio não imunizado apresentou anticorpos contra proteínas de *Lu. longipalpis* nas diluições 1/10, 1/25 e 1/50, enquanto para proteínas de *Lu. neivai*, observou-se reação fraca na diluição 1/10 (Figura 24).



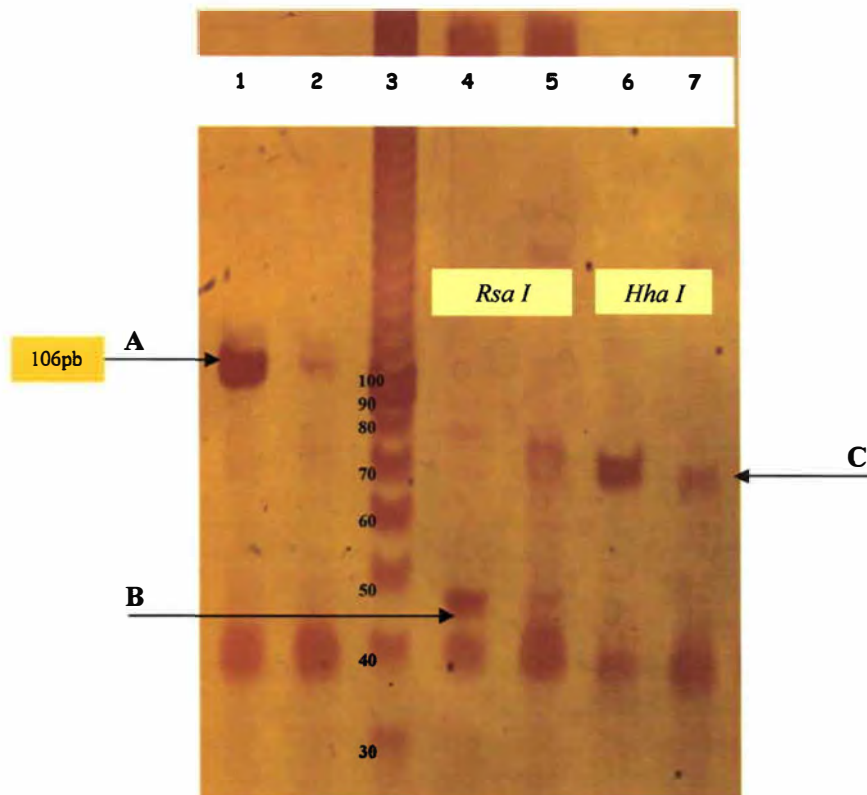
**Figura 24. Dot Blott com amostras de proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* e soro de coelho.** Fitas sensibilizadas com 2 $\mu$ L de amostras de proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* (0,0945 $\mu$ g/ $\mu$ L) e de *Lu. neivai* (0,1092 $\mu$ g/ $\mu$ L) foram incubadas com soro de coelho imunizado contra Max e soro de coelho sadio não imunizado, nas diluições 1/10, 1/25 e 1/50. Houve reatividade para antígenos de *Lu. longipalpis* com soro de coelho imunizado e não-imunizado, nas diferentes diluições. Para antígenos de *Lu. neivai*, houve fraca reatividade do soro de coelho não imunizado, na diluição 1/10.

Completando os resultados, serão apresentados os experimentos que comprovaram a expressão do gene símile ao Max em amostra de DNA extraída de *Lu. neivai* por PCR-RFLP (*polymerase chain reaction – restriction fragment lenght polymorphism*), RT-PCR (*reverse transcription - PCR*) e seqüenciamento de DNA.

#### **4.5. Expressão gênica de Max em *Lu. neivai***

##### **4.5.1. PCR e restrição do fragmento de DNA**

Utilizando-se par de *primers* específico para seqüência do gene Max, observou-se amplificação de fragmento de DNA de 106bp na PCR com amostra de *Lu. longipalpis* (controle positivo) e de *Lu. neivai*, correspondendo ao esperado para fragmento de Max (Figuras 25 e 26). A confirmação foi feita por restrição enzimática (PCR-RFLP). No ensaio em que foi utilizada a enzima *Rsa I*, observou-se a digestão do fragmento de 106bp e o surgimento de dois novos fragmentos de aproximadamente 55bp. No ensaio com a enzima *Hha I*, observou-se também a digestão do fragmento de 106bp em dois menores: de aproximadamente 25 e 80bp. O fragmento de *Lu. longipalpis* foi completamente digerido com *Rsa I*, enquanto o de *Lu. neivai* não o foi. Já com a enzima *Hha I*, os fragmentos de ambos os vetores foram digeridos completamente (Figura 25). A expressão da digestão do fragmento de DNA amplificado de *Lu. neivai* foi mais fraca do que para *Lu. longipalpis*, mesmo após repetição de três experimentos. Embora expresso em *Lu. neivai*, estes resultados mostram provável polimorfismo do gene Max de *Lu. neivai*.

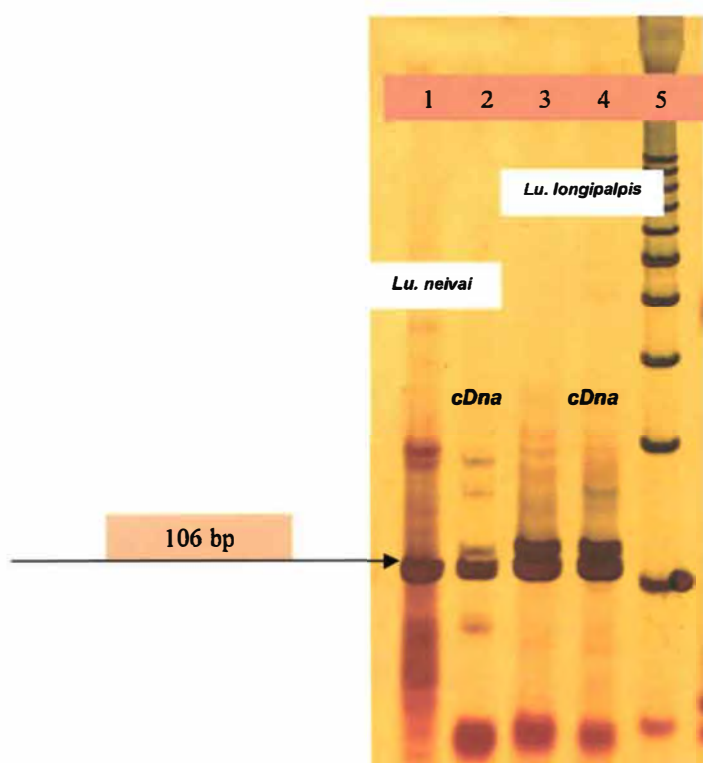


**Figura 25.** Gel de acrilamida 10% mostrando produtos de PCR amplificados para o gene Max (à esquerda do marcador de PM) e após a digestão enzimática (à direita do marcador de PM). 1: PCR para Max de amostra de *Lu. longipalpis* (seta A). 2: PCR para Max de *Lu. neivai* (106bp). 3: PM de 10bp. 4-5: Produto da PCR de amostras de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai*, respectivamente, digerido com a enzima *Rsa I* (seta B). 6-7: Produto da PCR de amostras de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai*, respectivamente, digerido com a enzima *Hha I* (seta C). Observar que a enzima *RSA I* digere o fragmento de *Lu. neivai* em dois sítios de restrição, conferindo-lhe polimorfismo em relação a *Lu. longipalpis*.

#### 4.5.2. RT-PCR

Com a intenção de se conferir a expressão protéica do gene Max símile em *Lu. neivai*, optou-se por fazer o experimento com amostra de  $m$ RNA.

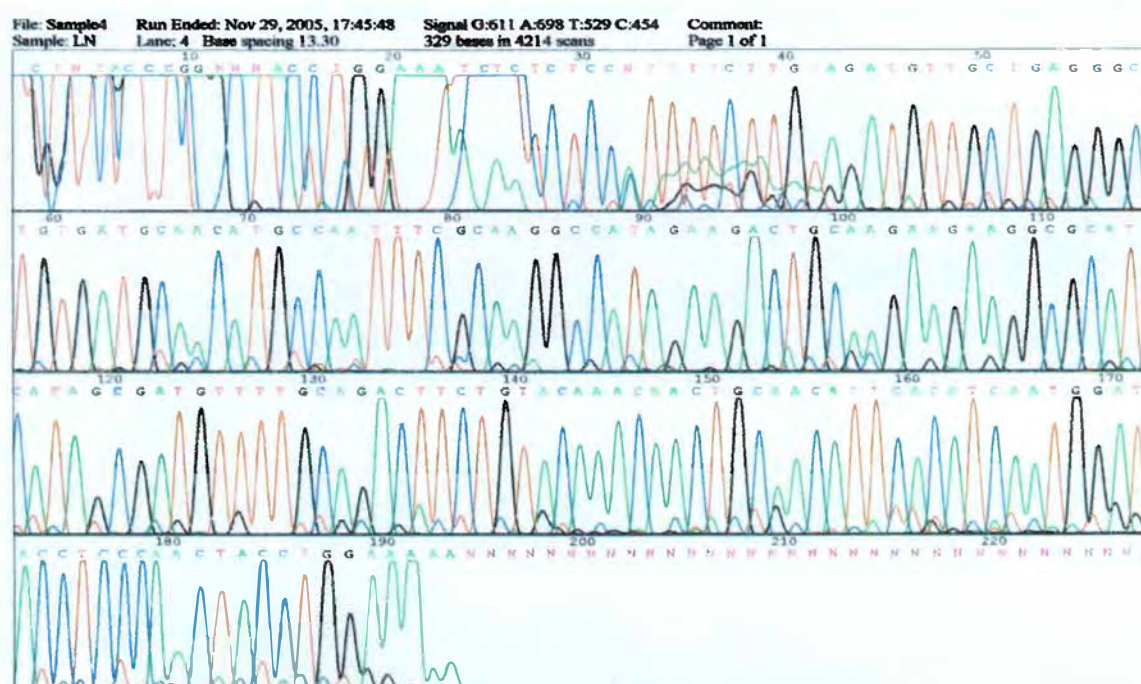
Desta forma, observou-se amplificação, por RT-PCR, de fragmento de 106bp para amostra de *Lu. longipalpis* (controle positivo), correspondendo ao esperado para fragmento de Max, e para *Lu. neivai* (Figura 26).



**Figura 26.** Gel de acrilamida 10% mostrando resultado da PCR e RT-PCR com par de *primers* específicos para seqüência do gene Max, utilizando-se amostras de DNA e RNA (cDNA) de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai*. Colunas 1: PCR de material de DNA extraído de *Lu. neivai*; 2: RT-PCR de amostra de *Lu. neivai*; 3. PCR de amostra de DNA extraída de *Lu. longipalpis*; 4. RT-PCR de amostra de *Lu. longipalpis*; 5: PM de 100 bp.

### 4.5.3. Seqüenciamento dos produtos da PCR

Para o seqüenciamento do DNA de *Lu. neivai* (Figura 27), optou-se por desenhar outro par de *primers*, cujo produto da PCR corresponde a 248 bp. Foram realizados 6 experimentos com sense e anti-sense para melhor padronização. Salienta-se que o seqüenciamento do produto do DNA de *Lu. longipalpis* resultou melhor quando utilizado o anti-sense. Para *Lu. neivai*, o primer sense resultou melhor seqüenciamento.



**Figura 27: Seqüenciamento do produto de 248 bp obtido pela PCR para Max de DNA extraído de *Lu. neivai*.**

A análise da seqüência de 248 bp mostrou a correspondência de 66,5% (165/248) entre os nucleotídeos lidos pelo seqüenciador e o gene do Max descrito exclusivamente em *Lu. longipalpis* (Figura 28).

---

```

1 aatcaattgc taaaaaaaaa ttacaaatag aactactaca gatgttctga atttttctt
61 gatattcttt ctcaattgga tgtataaaag aggctatfff gtgctgattt tgtagtcag
121 tattctgata aactgcaaaa atgaagcaaa tccttttaat ctctttgggtg gtggttcttg
181 ccgtgtttgc ctccagtaag ttcttcttt aggctttcc ttctcaaac ttaaagtaat
241 ttaatgaaat attctttaa taatctccat ttctttgtag acgttgctga gggctgtgat
301 gcaacatgcc aatttcgcaa ggccatagat gactgccaga agcaggecgca tcatagcaat
361 gttttgcaga cttctgtaca aacaactgca acattcacat caatggalac ctcccaacta
421 cctggaaata gtgtcttcaa agaatgtatg aagcagaaga aaaaggaatt tagttcagga
481 aagtaaaaga ttgaagaaaa ttgtagccga ggagagaaag aaagaaagtc ccataccata
541 ttttgtttgt taattgtaac gaatttccc aaaaaataaa atattatgca ctcaattta

```

---

**Figura 28:** Gene do Maxadilan descrito para *Lu. longipalpis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=159451>). Em azul, os *primers* utilizados na PCR, cujo produto final corresponde à seqüência de 248 bp. Os destaques em vermelho mostram a correspondência do seqüenciamento do produto da PCR obtido de amostra de DNA de *Lu. neivai* com o gene MAX descrito para *Lu. longipalpis*, quando se utilizou o primer sense para o seqüenciamento.

## **5. DISCUSSÃO**

---

Nos últimos anos, o número de casos de leishmaniose tegumentar americana vem aumentando em todo país, incluindo a região nordeste do Estado de São Paulo. Chama a atenção que, além do surgimento de casos autóctones, pôde-se verificar a mudança no padrão epidemiológico da doença, sendo importante a contaminação domiciliar e peridomiciliar na manutenção desse quadro. Para tanto, o papel do vetor é fundamental, promovendo o transporte dos parasitos para tão próximo de seus hospedeiros (MEDEIROS; ROSELINO, 1999; TOLEZANO, 1994).

A relação parasito-vetor-hospedeiro nas leishmanioses tem sido motivo de intensa pesquisa nos últimos anos. Estudos mostram que os vetores não se limitam a carreadores dos parasitos, tendo participação ativa na promoção e estabelecimento da doença, mediada por sua saliva (THEODOS et al., 1991, TITUS; RIBEIRO, 1988). O inóculo efetivo contém dois importantes componentes: a saliva do vetor e o gel secretado pelo promastigota. Este gel foi recentemente descrito e constitui-se por proteofosfoglican filamentoso, contendo a maioria das formas metacíclicas e, da mesma forma que a saliva, exacerba a infecção pelo parasito (ROGERS et al., 2004).

A demonstração de que a proteína Max pode substituir a saliva total de *Lu. longipalpis* em todas as suas propriedades (MORRIS et al., 2001), e que esta apresenta atividade imunomodulatória favorecendo a evolução da LTA (MORRIS et al., 2001; ROGERS; TITUS, 2003), possibilitou a atual pesquisa em busca da sororreatividade a um antígeno salivar específico em população de área endêmica de LTA.

Até os dias atuais, não se encontrou em literatura consultada a pesquisa de anticorpos anti-Max no soro de pacientes com LTA. A detecção de títulos de anticorpos anti-Max em controles e em pacientes com LTA, sendo estes com doença ativa, sugere



exposição à picada de artrópodes hematófagos que expressem a proteína Max em sua saliva. Na literatura, a expressão de Max foi descrita somente em *Lu. longipalpis*. Andrade et al. (2005), apresentaram extensa revisão sobre a função e composição da saliva de diversos artrópodes hematófagos e, inclusive, dentre os outros vetores da leishmaniose já estudados, o gênero *Phlebotomus* não expressa Max. Mais recentemente, houve relato de detecção de anticorpos anti-saliva de *Lu. intermedia* por ELISA, vetor natural da LTA em várias regiões do país, em pacientes com LTA (BATISTA et al., 2004).

A constatação de que habitantes de áreas endêmicas sejam mais resistentes à leishmaniose, comparados àqueles advindos de áreas não endêmicas para a doença, pode ser justificada por sua exposição natural à picada de flebotomos. Experimentalmente, tanto a exposição de animais a picadas de flebotomos não infectados (SILVA et al., 2005; THIAKAKI et al., 2005), quanto a injeção de lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* em camundongos (LIMA; TITUS, 1996; TITUS; RIBEIRO, 1988) conferiram proteção parcial destes animais à leishmaniose. No entanto, embora seja possível que essa exposição promova redução da gravidade da doença, parece não trazer proteção total, visto que a incidência da doença em áreas endêmicas permanece alta. Nossos resultados confirmam isso, pois o grupo de pacientes com LTA apresenta títulos de anticorpos anti-Max significativamente maiores comparados aos do grupo controle, e evoluíram com a manifestação da doença, incluindo a forma mucosa.

Castro-Sousa et al. (2001) verificaram que a capacidade do Max e do lisado de glândulas salivares de *Lu. longipalpis* na promoção da infecção por *Leishmania* em camundongos pode ser pequena e inconsistente. Não observaram diferenças no tamanho das lesões entre os grupos tratados com salina (controle) ou Max ou lisado de glândula

salivar, e embora o número de parasitos no local de injeção e baço fosse maior no grupo tratado com Max, não houve diferença estatística. Sugerem que vacinas baseadas em antígenos salivares podem não ter a mesma eficácia nas diferentes regiões endêmicas.

Quando da divisão dos pacientes segundo a forma clínica apresentada no momento do diagnóstico, observa-se que aqueles com a forma cutânea apresentaram maiores títulos de anticorpos anti-Max quando comparados aos controles e àqueles com a forma mucosa. Na comparação entre os grupos, houve significância entre os grupos controle e LTA forma cutânea. Se estes títulos maiores de anti-Max nos indivíduos com a forma cutânea podem promover proteção, isto poderá ser concluído somente após um estudo prospectivo, com seguimento desses pacientes e coletas periódicas de sangue para dosagens de anti-Max, correlacionando com sua evolução ou não para a forma mucosa. Outra possibilidade para esses títulos maiores em LTA forma cutânea é que, nesta forma, a exposição à picada é mais recente e, por isso, títulos maiores de anticorpos anti-Max puderam ser constatados, guardando semelhança ao que é descrito como *booster* em vacinação.

Em relação à imunologia da LTA forma cutânea, as investigações baseiam-se no perfil de citocinas produzidas por linfócitos T, subtipos  $CD_4^+$  e  $CD_8^+$ , no local da lesão, com especial interesse no interferon gama ( $INF-\gamma$  /  $Th_1$ ) e interleucina 4 ( $IL-4$  /  $Th_2$ ). Sabe-se que esse padrão de citocinas tem papel crucial na determinação de resistência ( $CD_4^+$   $Th_1$ ) ou susceptibilidade ( $CD_4^+$   $Th_2$ ) à leishmaniose (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). O equilíbrio das respostas  $Th_1/Th_2$  promove a cura espontânea das lesões em alguns pacientes. Em muitos casos, no entanto, algum tipo de tratamento é necessário para a regressão total da doença. Em geral, os pacientes com LTA forma cutânea apresentam imunidade mediada por células eficiente, com predomínio da resposta imune  $CD_4^+$   $Th_1$  (PIRMEZ et al., 1993;

SILVEIRA et al., 2004). Experimentalmente, isto pôde ser constatado quando submeteram camundongos CBA à vacinação prévia com Max, e a dosagem de anticorpos anti-Max no soro, através do ELISA, detectou altos títulos. Observaram que estes animais, depois de infectados por *Le. major*, apresentaram lesões menores, com crescimento parasitário reduzido e que cicatrizavam 50 dias após a infecção. Além disso, células de linfonodos regionais, extraídas dos animais tratados, quando estimuladas *in vitro* com Max, produziram INF- $\gamma$  e NO (óxido nítrico) em quantidades significativas, justificando o reconhecimento da sensibilização prévia à proteína Max (MORRIS et al., 2001). Mais recentemente, há relatos sobre o papel de linfócitos T reguladores na etiopatogenia da LTA (BELKAID, 2003), sugerindo-se que essas células migram para o sítio de infecção da *Leishmania* em humanos e, possivelmente, contribuem para o controle local da função das células T efectoras (CAMPANELLI et al., 2006).

Quando se avaliou os títulos de anticorpos anti-Max nos pacientes com LTA, segundo a resposta à IRM no momento do diagnóstico, observaram-se maiores títulos tanto naqueles com IRM (-) quanto com IRM (+), se comparados aos controles. No entanto, na comparação entre os grupos, houve significância entre os grupos controle e LTA com IRM (+). Observação semelhante foi relatada por Gomes et al. (2002), que mostram que crianças de área endêmica para leishmaniose visceral, que apresentaram desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade tardia contra *Le. chagasi*, também tiveram aumento dos títulos de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis*, evidenciados por ELISA e *Western blot*. Especulam que a neutralização dos componentes salivares, por resposta humoral ou celular, promova resposta imune mediada por células eficiente contra *Le. chagasi*, com possibilidade de desenvolvimento de resposta Th1 contra o parasito.

A divisão do grupo de pacientes com LTA, segundo o resultado da RIFI, evidenciou que tanto aqueles com sorologia negativa quanto positiva apresentam títulos de anti-Max maiores que os do grupo controle, sendo estatisticamente significante a comparação entre grupos controle e RIFI (+). Crianças de área endêmica para leishmaniose visceral, que apresentaram viragem sorológica anti-*Le. chagasi* pelo método de ELISA, também tiveram aumento dos títulos de anticorpos, subclasse IgG<sub>4</sub>, anti-saliva de *Lu. longipalpis* (GOMES et al., 2002).

Desenvolvimento de alergia contra saliva de insetos é freqüentemente observado em populações expostas a eles (ARLIAN, 2002). A presença de resposta de hipersensibilidade imediata no sítio da picada do flebótomo pode criar microambiente inóspito, podendo até dificultar a sobrevivência do parasito no local de sua inoculação (GOMES et al., 2002). Os nossos resultados mostram correspondência entre títulos de anticorpos anti-Max e anti-leishmania (RIFI), podendo estar relacionados à resposta humoral para ambas as proteínas. Se esta resposta protege contra a evolução da LTA, somente uma avaliação prospectiva confirmará esta hipótese.

A influência de anticorpos produzidos contra extratos de *Lu. longipalpis* e contra componentes da sua saliva em relação aos aspectos biológicos dos flebótomos já foi avaliada. Vilela et al. (2006) mostraram que fêmeas de *Lu. longipalpis*, alimentadas em coelhos imunes contra extratos de tubo digestivo de *Lu. longipalpis* e em coelhos submetidos a repetidas picadas, apresentaram decréscimo de sua fecundidade e aumento da mortalidade. Em outro trabalho, verificaram que anticorpos anti-Max, detectados em camundongos previamente sensibilizados por esta proteína, reduzem a propriedade vasodilatadora do Max secretado pela saliva do flebótomo no momento da picada,

ocasionando menor sucção de sangue e diminuição significativa da produção de ovos por *Lu. longipalpis* (MILLERON et al., 2004).

A constatação de que pacientes com ausência de parasitos ao exame histopatológico apresentam títulos de anti-Max maiores e estatisticamente significantes aos encontrados em controles, nos remete às mesmas considerações já feitas sobre anti-Max estimulando resposta Th1, ideal para o controle da evolução da doença, como também criando ambiente local desfavorável para sobrevivência do parasito.

O tempo de evolução da doença correlaciona-se com o aumento dos títulos de anticorpos anti-Max até 8 meses de evolução da LTA, havendo significância somente na comparação entre os grupos controle e de pacientes com LTA com tempo de evolução entre 4-8 meses. Esta constatação mais uma vez reforça a hipótese de ativação predominante de resposta Th1, uma vez que se espera resposta negativa à IRM até 4 meses de evolução da LTA.

A realização da CIE foi importante para a identificação de anticorpos anti-Max por outro método, reafirmando os resultados obtidos pela técnica de ELISA. Além disto, os experimentos de ELISA com soros dos doentes foram realizados em momentos distintos e com antígenos de lotes diferentes, sendo que para cada lote, realizou-se uma curva padrão de resposta. Para reunir todos os resultados em um único grupo, a CIE realizada em soros do grupo controle foi fundamental para o cálculo do *cut off* do experimento, pois se considerou, para seu cálculo, somente aqueles controles que apresentaram CIE (-). Como não houve diferença estatística no grupo controle com CIE (+) e CIE (-), não se realizou CIE para os soros controles do último experimento.

A positividade da CIE, quando se testou soro de coelho imunizado contra Max, era prevista e almejada. No entanto, o resultado positivo da CIE com soros de coelhos sadios do biotério (5/8) alertou para a possível exposição à picada de flebótomos em área endêmica para LTA. Milleron et al. (2004a) demonstraram a presença de anticorpos anti-Max em soro de camundongos (4/4) sensibilizados por picadas de *Lu. longipalpis*, assim como em porcos (6/9) e humanos (8/40) habitantes de áreas endêmicas para *Lu. longipalpis* na Nicarágua. Encontraram correlação positiva entre os níveis séricos de anticorpos anti-Max e anticorpos anti-glândula salivar. A técnica *Western blot* confirmou a especificidade dos anticorpos anti-Max e anti-glândula salivar. Quando se testou soro de porcos provenientes dos Estados Unidos, área não endêmica, estes não reagiram contra os dois antígenos pesquisados. Em relação aos nossos resultados, outra hipótese para o achado de anticorpos anti-Max titulados em soros de animais residentes em biotério seria que outros insetos poderiam expressar proteína símile ao Max, ainda não descrita na literatura.

Quanto aos títulos de anti-Max em soros humanos, demonstrados por Milleron et al. (2004), pelo método ELISA, quando se utilizou proteína Max sintética na concentração de 5µg/mL, estes são comparáveis aos títulos por nós encontrados, embora tenhamos utilizado a proteína Max recombinante, na concentração de 120 a 125 µg/mL. Poderia se questionar se essas proteínas apresentam antigenicidade semelhante. Para tal, experimentos com as mesmas amostras de soro teriam que ser realizados. A concentração da proteína Max, considerada ótima para nossos experimentos, foi obtida após padronização da curva padrão de resposta para cada experimento.

Sabe-se que indivíduos (BARRAL et al., 2000; GOMES, et al., 2002) e cães (Bahia et al., 2006) expostos a *Le. chagasi*, por infecção natural, reconhecem antígenos de

glândula salivar dos vetores flebótomos, especificamente de *Lu. longipalpis*. Em área endêmica para LV, detectou-se também anticorpos anti-glândula salivar de *Lu. longipalpis*, por ELISA, em soros humanos e de cães assintomáticos. O teste *Western blot* confirmou a presença desses anticorpos, que se ligaram preferencialmente à fração protéica salivar de 44kDa. Paralelamente, verificaram-se altos títulos de anticorpos anti-glândula salivar de *Lu. longipalpis* em raposas selvagens, sendo que estas não apresentavam anticorpos anti-*Le. chagasi*, apesar do encontro de parasitos em medula óssea de três animais (3/11). Quando testados estes soros contra glândulas salivares de *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia*, constataram-se títulos de anticorpos contra estes flebótomos (GOMES et al., 2006). Apesar dos títulos baixos encontrados para ambos e dirigidos contra proteínas de um vetor (*Lu. intermedia*) que não está presente na área em estudo, uma explicação possível seria reação a antígenos comuns entre os flebótomos.

Nos experimentos ora apresentados, pelo método *dot blot*, pôde-se verificar reação imune em soros humanos e de coelhos contra antígenos protéicos extraídos de *Lu. longipalpis* e, adicionalmente, constatou-se resposta contra antígenos de *Lu. neivai*, vetor natural da LTA na região nordeste do Estado de São Paulo.

Também foi realizado *dot blot* contra proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai* com soros de coelho imunizado contra Max e coelhos residentes no biotério. Esses mesmos soros já haviam sido testados pelo método de CIE contra Max. De forma não esperada, amostras de soros do coelho imunizado e de um coelho do biotério reagiram contra a proteína extraída de *Lu. longipalpis*, mas não de *Lu. neivai*. Trata-se de experimento único, devendo ser adicionadas outras amostras ou revista a concentração da

proteína empregada, embora tenha sido utilizada a mesma concentração para soros humanos com resultados positivos.

A eletroforese de proteínas de amostras de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai* mostra várias frações protéicas, algumas semelhantes e outras distintas. Como são amostras extraídas do segmento cefálico e não exclusivamente da glândula salivar do flebótomo, não podemos atribuí-las somente a proteínas salivares. Não se encontrou em literatura consultada padrão eletroforético de proteínas extraídas de forma semelhante à extração ora apresentada. Oportunamente, registra-se que a extração de proteínas do segmento cefálico, técnica menos trabalhosa e mais rápida do que a obtenção da glândula salivar do vetor, propiciou resultados confiáveis.

Estudo para detecção de anticorpos contra vetores do Velho Mundo, realizado por Rohousova et al. (2005), mostrou que 40% dos soros coletados de indivíduos saudáveis moradores em área endêmica para *Le. tropica* apresentavam altos títulos de anticorpos IgG anti-saliva de *Ph. sergenti* e *Ph. papatasi*, duas espécies de flebótomos mais abundantes nesta área. Sabe-se que *Ph. sergenti* é o vetor de *Le. tropica*, enquanto *Ph. papatasi* é refratário a este parasito. Indivíduos com doença ativa por *Le. tropica* apresentavam altos títulos de anticorpos anti-*Ph. sergenti*, quando comparados aos indivíduos saudáveis desta mesma região. Em relação aos títulos anti-*Ph. papatasi*, estes foram iguais em ambos os grupos. Comparando os resultados relatados nesse trabalho aos nossos dados, altos títulos de anticorpos anti-*Ph. sergenti* e anti-Max em área endêmica podem refletir maior exposição a picadas de flebótomos e, portanto, maior probabilidade de transmissão de *Le. tropica* e *Le. braziliensis*, respectivamente. Estes dados se mostram úteis para a caracterização epidemiológica de áreas endêmicas, podendo-se monitorar a exposição de



---

humanos, animais domésticos e outros hospedeiros a picadas de flebótomos, assim como identificar as espécies implicadas. Portanto, em áreas endêmicas, a resposta imunológica do hospedeiro à picada de flebótomos pode ser utilizada como fator de risco para a transmissão da leishmaniose.

A reatividade imunológica contra extratos salivares é complexa, pois cada antígeno no homogeneizado pode promover diferentes respostas em indivíduos distintos, dependendo da frequência e intensidade da exposição. Moradores de áreas endêmicas para LV, no Brasil, e LTA, na Turquia, apresentaram altos títulos de IgG anti-saliva (GOMES et al., 2002, ROHOUSOVA et al., 2005). No estudo realizado por Gomes et al (2002), a banda protéica, de peso molecular correspondente ao Max, foi reconhecida por somente dois soros testados (2/13), sugerindo que a proteína Max poderia não induzir resposta humoral em humanos. O principal antígeno na saliva de *Lu. longipalpis*, verificada neste estudo, foi de 45 kDa. Nossos resultados demonstrados pela titulação de anticorpos anti-Max, empregando-se ELISA, se contrapõem à sugestão citada pelos autores. Já na eletroforese de proteínas salivares de *Ph. papatasi*, que sabidamente não expressa Max, soros de pacientes com LTA e moradores saudáveis da região endêmica reagiram fortemente contra proteína de 30 kDa (ROHOUSOVA et al., 2005).

É importante salientar que todos os experimentos citados na literatura têm sido conduzidos com diferentes espécies de leishmania, incluindo aquela responsável pela forma cutânea (LIMA; TITUS, 1996; NORSWORTHY et al., 2004), e a proteína salivar Max, que até o momento foi descrita exclusivamente em *Lu. longipalpis*, vetor do calazar. No Velho Mundo, onde se encontra somente o gênero *Phlebotomus*, hospedeiros picados por flebótomos ou animais expostos experimentalmente a proteínas salivares produzem

anticorpos que reconhecem antígenos salivares espécie-específicos (ROHOUSOVA et al., 2005; VOLF; ROHOUSOVA, 2001). Thiakaki et al. (2005) relataram que a imunidade protetora mediada pela glândula salivar, seja por exposição natural ou inoculação de lisado, também é espécie-específica, já que a pré-exposição de camundongos ao lisado de glândulas salivares de outras duas espécies de flebótomos estudadas (*Ph. papatasi* e *Ph. sergenti*) foi ineficaz para a proteção do animal contra a infecção por leishmania (*Le. amazonensis*). Apesar da combinação utilizada por estes autores (*Lu. longipalpis* - *Le. amazonensis*) não ser a natural, é também citada em muitos estudos. A investigação da reatividade contra antígenos salivares recombinantes, que possam substituir toda a saliva e sejam comuns aos vários flebótomos, promoveria o melhor entendimento da relação parasito-vetor-hospedeiro na leishmaniose e, conseqüentemente, a busca de mecanismos de atuação para o controle da LTA.

O uso de componentes parasitários e não parasitários para indução de resposta imune específica contra parasitos, corroborando para a proteção contra a infecção, representa uma perspectiva na busca de vacinas para doenças em que os patógenos são transmitidos por vetores (COLER et al., 2005). A identificação de um componente específico na glândula salivar com atividade imunomodulatória, como, por exemplo, a proteína Max, é fundamental para o entendimento da interação vetor-hospedeiro. Reed, em 2001, citava que se este componente fosse conservado entre as múltiplas espécies de flebótomos, ter-se-ia a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger contra múltiplas espécies de *Leishmania* através da imunização com uma única proteína do vetor. Diante dos resultados aqui apresentados, a constatação da presença de anticorpos anti-Max no soro de pacientes com LTA, chamando a atenção para a presença de anti-Max

também em controles e coelhos de biotério, somado ao fato de não termos o relato de capturas sistemáticas de *Lu. longipalpis* em nossa área de estudo, tornou-se imprescindível a pesquisa da expressão de Max em *Lu. neivai*, vetor responsável pela transmissão da LTA na região do estudo. Portanto, de forma inédita, constataram-se a expressão gênica e protéica de Max em *Lu. neivai*. Ressalta-se a homologia da seqüência obtida de 248bp correspondente ao gene Max em *Lu. neivai*. Quando comparada à seqüência do gene Max de *Lu. longipalpis*, descrita no GenBank, constatou-se a similaridade de 66,5%. Resta seqüenciar todo o gene para se estabelecer similaridades e polimorfismos do gene Max em ambos os vetores. Quanto às proteínas extraídas de *Lu. longipalpis* e *Lu. neivai*, obteve-se bandas cujo peso molecular é idêntico ao Max para ambos os vetores, com reconhecimento pelos anticorpos anti-Max de coelho imunizado.

O estudo dos vetores em doenças infecciosas vem ganhando destaque, principalmente devido à busca de vacinas eficazes para essas doenças. Os flebótomos não são meros “transportadores” dos parasitos. Sua saliva consiste em um alvo em potencial para vacinação contra leishmaniose (TITUS; RIBEIRO, 1988). Essa matéria foi motivo de editoriais de revistas de grande impacto em 2001 (ENSERINK, 2001; REITHINGER, 2001; TAYLOR-ROBINSON, 2001).

O desenvolvimento de vacina contra leishmaniose esbarra na diversidade antigênica do parasito e na resposta imune inerente e específica do hospedeiro. As proteínas salivares diferem em sua capacidade em mediar a resposta imune do hospedeiro, podendo induzir resposta humoral ou celular ou ambas (OLIVEIRA et al, 2006). Belkaid et al. (1998) e Kamhawi et al. (2000) observaram que a exposição prévia a picadas de flebótomos não infectados promovia níveis de imunidade contra *Le. major* maiores que qualquer injeção de

parasito e adjuvante. Mostrou-se que esta imunidade decorre da hipersensibilidade tardia do hospedeiro contra a saliva do vetor (BELKAID et al., 2000). Valenzuela et al. (2001) isolaram uma proteína de 15 kDa (SP-15) da saliva de *Ph. papatasi* e mostraram que, quando utilizada como vacina, protegeu camundongos infectados por *Le. major* e glândula salivar. A vacina induziu respostas humoral e celular. No entanto, atribuiu-se a proteção induzida à resposta imune do tipo celular, pois camundongos deficientes em linfócitos B vacinados com SP-15 controlaram a infecção com sucesso. Imunização similar e bem sucedida contra *Le. major* já havia sido obtida com vacinação com Max (MORRIS et al., 2001). Dados mais recentes mostram que vacinas com cDNA que expressam proteínas da glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*, indutoras de forte resposta humoral, não protegem hamsters da infecção por *Le. chagasi*. Ao contrário, imunização com cDNA que expressam proteínas indutoras de resposta celular promovem proteção por mais de 6 meses (BRODSKYN et al, 2005).

Os principais obstáculos para este tipo de vacina se devem às diferenças na composição protéica da saliva entre as espécies, e às variações antigênicas destas proteínas, assim como para os antígenos parasitários. Estudos com a proteína SP-15 indicam que ela não apresenta polimorfismo significativo entre as espécies estudadas, sugerindo seu uso como vacina (ELNAIEM et al., 2005). Ao contrário, várias pesquisas com Max indicam que esta proteína apresenta polimorfismos genéticos e, conseqüentemente, de aminoácidos, inclusive nos sítios antigênicos, em subespécies de *Lu. longipalpis* (LANZARO et al., 1999; MILLERON et al.; 2004a/b; WARBURG et al., 1994). Dos 61 aminoácidos que constituem a proteína Max, já foram relatadas variações naturais em 21 resíduos. Estes variantes apresentam sua atividade vasodilatadora preservada e têm estrutura secundária

similar (LANZARO et al., 1999). Posteriormente, atribuiu-se a especificidade antigênica ao fragmento C-terminal dos peptídeos variantes (MILLERON et al.; 2004a). Sabe-se que a porção central da cadeia  $\beta$  está envolvida na ativação do receptor e em estudo de análise funcional de mutações do Maxadilan, identificaram-se os resíduos da cadeia  $\beta$  responsáveis por esta ativação (REDDY et al., 2006). Nossos dados mostram a expressão de uma proteína Max símile em *Lu. neivai* e, assim como o já descrito para *Lu. longipalpis*, esta provavelmente também apresenta polimorfismos se comparada à proteína Max de *Lu. longipalpis*. Estes altos níveis de variações podem interferir na implementação de uma vacina efetiva contra leishmaniose baseada na proteína Max, sugerindo-se uma possível adaptação do vetor contra a resposta imune do hospedeiro (MILLERON et al., 2004a).

Uma vacina eficaz para leishmaniose será aquela que previne o desenvolvimento da doença. A redução do processo de infecção, como aquela obtida pela exposição prévia à picada de flebótomos (KAMHAWI, 2000) ou injeção de Max, não necessariamente confere imunidade contra o parasito ou previne a progressão da doença (MORRIS, 2001). Deve-se levar em conta o binômio - vetor e patógeno - como uma unidade integrada no processo infecto-parasitário para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz (ROGERS et al., 2004).

Concluindo, a presença de anticorpos anti-Max na população de área endêmica não preveniu a evolução da LTA, inclusive estando presentes na forma mucosa. É importante ressaltar a constatação inédita da expressão do gene símile e da proteína em *Lu. neivai*. Na busca de vacinas baseadas em antígenos de vetores, a proteína Max, expressa em vetor do calazar e da LTA, se torna um candidato em potencial, embora não de forma isolada, pois pode representar antígeno comum aos vários vetores da leishmaniose. Quanto à promissora

vacina com a proteína SP-15, experimentos conduzidos com soros humanos devem ser aguardados.

Finalizando, a nossa pretensão, em um futuro próximo, consiste: (1) na realização de ELISA e Immunoblotting, utilizando proteínas salivares extraídas de *Lu. longipalpis* e de *Lu. neivai*, incubadas com soros de pacientes com LTA, por ocasião do diagnóstico da LTA e um ano após o tratamento, comparando-se grupos de moradores de área endêmica com IRM (+) e (-), e controles de banco de sangue; e (2) no seqüenciamento do gene e da proteína Max símile em *Lu. neivai*.

## **7. CONCLUSÕES**

---

1. Pacientes com LTA, residentes na região nordeste do Estado de São Paulo, apresentam anticorpos séricos anti-Max, cujos títulos são significativamente maiores do que os do grupo controle.
2. O grupo controle, composto por indivíduos da mesma região do estudo, apresentando anticorpos séricos anti-Max, confirma a exposição natural à picada de flebótomo.
3. A pesquisa de Max em amostras de *Lu. neivai*, vetor da LTA na região do estudo, confirmou a expressão protéica e gênica de uma proteína Max símile.
4. Títulos de anticorpos anti-Max mais elevados no grupo de pacientes com LTA, com lesões cutâneas e em mucosa em atividade, sugerem que a exposição prévia e natural à picada do vetor *Lu. neivai* e, conseqüentemente, à proteína Max símile, não estaria conferindo proteção imunológica contra a LTA.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AGA, E.; KATSCHINSKI, D.M.; ZANDBERGEN, G.V.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptoses of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.169, n.2, p.898-905, Jul. 2002.

AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GRIMALDI FILHO, G.; MOMEN, H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, n.1, p.143, Jan./Mar. 1987.

ANDRADE, B.B.; TEIXEIRA, C.R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.77, n.4, p.665-693, Dec. 2005.

ANDRADE FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B.; FALCÃO, A.L. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.8, p.1059-1065, Dec. 2003.

APARICIO, C.; BITENCOURT, M.D. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Saúde Pública São Paulo**, v.38, n.4, p.511-516, Ago. 2004.

ARLIAN, L.G. Arthropod allergens and human health. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v.47, p.395-433, 2002.

BAHIA, D.; GONTIJO, N.F.; LEÓN, I.R.; PERALES, J.; PEREIRA, M.H.; OLIVEIRA, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitol. Res.**, Berlin, Epub ahead of print, Oct. 2006.

BAPTISTA, R.L.; CAMERA, P.O.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; VILELA, M.L.; COSTA, S.M., RANGEL, E.; PIRMEZ, C. *Lutzomyia intermedia* anti-saliva antibodies in patients living in endemic areas of American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. In: ASTMH, 53th Annual Meeting, 2004, Miami, Florida, 2004.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J.M.C. Human immune response to sand fly salivary gland

antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.62, n.6, p.740-745, Jun. 2000.

BECHELLI, L.M.; PIMENTA, W.P.; MENEZES, E.F.; TANAKA, A.M.U. Leishmaniose tegumentar americana autóctone na região de Ribeirão Preto (SP). **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v.59, n.1, p.130, Jul. 1961.

BELKAID Y. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in leishmaniasis infection. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v.3, n.6, p.2-11, 2003.

BELKAID, Y.; KAMHAWI,S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBENTRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, New York, v.188, n.10, p.1941-1953, Nov. 16, 1998.

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI,S.; ROWTON, E.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M.C. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.97, n.12, p.6704-6709, Jun. 6, 2000.

BEZERRA, H.S.S.; TEIXEIRA, M.J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.3, p.349-351, Apr. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2000.

BOZZA, M.; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; SATOSKAR, A.R.; BROMBACHER, F.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. **Eur. J. Immunol.** Weinheim, v.28, n.10, p.3120-3127, Oct. 1998.

BRITO, M.; CASANOVA, C.; MASCARINI, L.M.; WANDERLEY, D.M.V.; CORRÊA, F.M.A. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, p.431-437, Set./Out., 2002.

BRODSKYN, C.I.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; SILVA, C.; TEIXEIRA, M.J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; VALENZUELA, J. Immunization with cDNA from *Lutzomyia longipalpis* salivary protein glands protects

hamsters from infection by *Leishmania chagasi*. In: Abstract book of World Congresso on Leishmaniosis Worldleish3, Palermo, Italy, p.121, Apr. 2005.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C.; ANTUNES, J.L.F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 35, n.4, p.299-306, Jul./Ago. 2002.

CAMPANELLI, A.P.; ROSELINO, A.M.; CAVASSANI, K.A.; PEREIRA, M.S.; MORTARA, R.A.; BRODSKYN, C.I.; GONCALVES, H.S.; BELKAID, Y.; BARRAL-NETTO M.; BARRAL, A.; SILVA, J.S. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 193, n.9, p.1313-1322, Mar. 17 2006.

CASANOVA, C.; COSTA, A.I.P.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural área in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.7, p.719-724, Nov. 2005.

CASTRO-SOUSA, F.; PARANHOS-SILVA, M.; SHERLOCK, I.; PAIXAO, M.S.; PONTES-DE-CARVALHO L.C.; DOS-SANTOS, W.L.C. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.7, p.997-999, Oct. 2001.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.G.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.96, n.26, p.15155-15160, Dec. 21 1999.

CHULAY, J.D.; OSTER, C.N.; MCGREEVY, P.B.; HENDRICKS, L.D.; KREUTZER, R.D. American cutaneous leishmaniasis: presentation and problems of patient management. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.21, n.4, p.165-172, Out./Dez. 1998.

COLER, N.R; REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, Oxford, v.21, n.5, p.244-249, May 2005.

COSTA, D.J.; FAVALI, C.; CLARÊNCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; MIRANDA, J.C.; TITUS, R.G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect Immun.**, Bethesda, v.72, n.3, p.1298-1305, Mar. 2004.

COSTA, J.; DURAND, R.; DENIAU, M.; RIVOLLET, D.; IZRI, M.; HOUIN, R.; VIDAUD, M.; BRETAGNE, S. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.7, p.1831-1833, Jul. 1996.

COSTA, J.M.L.; CUNHA, A.K.; GAMA, M.E.A.; SALDANHA, A.C.R. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil: revisão. **An. Bras. Dermat.**, Rio de Janeiro, v.73, n.6, p.565-576, Nov./Dez. 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, v.27, n.5, p.305-318, Sep. 2004.

ELNAIEM, D.-E.A.; MENESES, C.; SLOTMAN, M.; LANZARO, G.C. Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine



candidate against *Leishmania major*. **Insect. Mol. Biol.**, Oxford, v.14, n.2, p.145-150, Apr. 2005.

ENSERINK, M. Sand fly saliva may be key to new vaccine. Editorial. **Science**, v.293, n.10, p.1028, aug. 2001.

FERREIRA, A.L.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; FALQUETO, A. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniosis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.8, p.1061-1067, Nov. 2001.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M.A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J.C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E.M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.32, n.5, p.497-503, Set./Out. 1999.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D.B.G.; FERREIRA, O.A. Nota sobre um foco de leishmaniose tegumentar na região nordeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública.**, São Paulo, v.6, n.1, p.103-105, mar. 1972a.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.55, n.2, p.81-16, Abr/Mai/Jun 1980.

GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.22, n.7, p.319-331, Jul. 2000.

GOMES, R.B.; BRODSKYN, C.; de OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.186, n.10, p.1530-1534, Nov. 15, 2002.

GOMES, R.B.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, V.C.; RUAS, J.; SILVA, M.B.; CRUZ, M.S.P.; BARRAL, A.; COSTA, C.H.N. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, in press, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n.1, p.71-80, Jan./Fev. 2003.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v.34, n.2, Pt. 1, p.257-272, Feb. 1996.

GRIMALDI JR., G. Leishmaniose tegumentar: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 77, n.2, p.195-215, Abr./Jun. 1982.

GUILPIN, V.O.; SWARDSON-OLIVER, C.; NOSBISCH, L.; TITUS, R.G. Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. **Parasite Immunol.** Oxford, v.24, n.8, p.437-446, Aug. 2002.

JACKSON, T.S.; LERNER, E.; WEISBROD, R.M.; TAJIMA, M.; LOSCALZO, J.; KEANEY JR, J.F. Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. **Am. J. Physiol.** Washington, v.271, n.3 Pt 2, p.H924-H930, Sep. 1996.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, Oxford, v.22, n.9, p.439-445, Sep. 2006.

KAMHAWI.S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, Washington, v.290, n.5495, p.1351-1354, Nov 17, 2000.

KATZ, O.; WAITUMBI, J.N.; ZER, R.; WARBURG,A. Adenosine, AMP and protein phosphatase activity in sandfly saliva. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v.62, n.1, p.145-150, Jan, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cicle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, Paris, v.65, p.37-42, 1990. Supl.I.

LANZARO, G.C.; LOPES, A.H.; RIBEIRO, J.M.; SHOEMAKER, C.B.; WARBURG, A.; SOARES, M.; TITUS, R.G. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Insect. Mol. Biol.** Oxford, v.8, n.2, p.267-275, May 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**. London, v. 273, p.595-600, Jun 1978. Parasitology Supplement.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; SOUSA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.3, p.435-443, Jul./Set. 1994.

LEONARDO, F.S.; REBELO, J.M. *Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p.282-284, Mai./Jun. 2004.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.C.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.266, n.17, p.11234-11236, Jun. 1991.

LERNER, E.A.; SHOEMAKER, C.B. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.267, n.2, p.1062-1066, Jan. 1992.

LIMA, H.C; TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect Immun.**, Bethesda, v.64, n.12, p.5442-5445, Dec. 1996.

MARCONDES, C.B. A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, p.457-462, 1996.

MARCONDES CB, DAY JR, READY PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu neivai* and *Lu whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.91, n.6, p.725-726, Nov/Dec. 1997.

MARCONDES, C.B.; LOZOVEI, A.L.; VILELA, J.H. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) complex (Diptera, Psychodidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 31, n.1, p.51-58, Jan./Fev. 1998.

MARCONDES CB, LOZOVEI AL, GALATI EAB, TANIGUCHI HH. The usefulness of Bergmann's rule to the distinction of members of *Lutzomyia intermedia* species complex (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, p.363-364, 1998.

MARCONDES CB, BORGES PSS. Distinction of males of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex by ratios between dimensions and

by an Artificial Neural Network (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.685-688, 2000.

MARSDEN, P.D. *Leishmania (Viannia) braziliensis (Lvb)*: Diagnostic and therapeutic aspects. In: BRANDAO-FILHO, S.P. (Ed.). **Research and control of leishmaniasis in Brazil**. Proceeding of a National Workshop. Recife: Fiocruz/CpqAM, 1994, p.263-265.

MARTINS, L.M.; REBELO, J.M.M.; SANTOS, M.C.F.V.; COSTA, J.M.L.; FERREIRA, L.A. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.735-743, Mai./Jun. 2004.

MARSELLA, R; GOPEGUI, R.R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. **Int. J. Dermatol.**, v.37, n.11, p.801-814, 1998.

MAYO, R.C.; CASANOVA, C.; MASCARINI, L.M.; PIGNATTI, M.G.; RANGEL, O.; GALATI, E.A.B.; WANDERLEY, D.M.V.; CORRÊA, F.M.A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 31, n.4, p.339-345, Jul./Ago. 1998.

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.161, n.10, p.5571-5577, Nov. 15 1998.

MEDEIROS, A.C.R. **Leishmaniose Tegumentar Americana: casuística e implantação de PCR para diagnóstico, HC-FMRP-USP, 1978-1998.** 1999. 174p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S; ROSELINO, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and histopathological detection of *leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Sao Paulo, v.35, n.4, p.421-424, Apr. 2002.

MEDEIROS, A.C.R.; ROSELINO A.M.F. Leishmaniose Tegumentar Americana: do histórico aos dia de hoje. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.74, n.4, p.329-336, Abr.1999.

MILLERON, R.S.; MUTEBI, J.P.; VALLE, S.; MONTOYA, A.; YIN, H.; SOONG, L.; LANZARO, G.C. Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v.70, n.3, p.286-293, Mar. 2004(a).



MILLERON, R.S., RIBEIRO, J.M.C.; ELNAIEME, D.; SOONG, L.; LANZARO, G.C. Negative effect of antibodies against Maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American Visceral Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v.70, n.3, p.286-293, Mar. 2004(b).

MOLYNEUX, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London, Academic Press, 1987. v.1, cap.2, p.121-176.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **J. Immunol.** Baltimore, v.167, n.9, p.5226-5230, Nov. 2001.

MORO, O.; LERNER, E.A. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, n.2, p.966-970, Jan. 1997.

MORO, O.; WAKITA, K.; OHNUMA, M.; DENDA, S.; LERNER, E.A.; TAJIMA, M. Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide Maxadilan yields a pituitary adenylate

cyclase - activating peptide type I receptor – specific antagonist. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, n.33, p.23103-23110, Aug. 1999.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, England, v.366, n.9496, p.1561-1577, Oct 29-Nov 4, 2005.

NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect Immun.** Bethesda, v.72, n.3, p.1240-1247, Mar. 2004.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.933-944, Jul./Ago. 2003.

OLIVEIRA, C.C.G., LACERDA, H.G., MARTINS, D.R.M., BARBOSA, J.D.A., MONTEIRO, G.R., QUEIROZ, J.W., SOUSA, J.M.A., XIMENES, M.F.F.M., JERONIMO, S.M.B. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.90, n.2, p.155-162, Apr. 2004.

OLIVEIRA F.; KAMHAWI S.; SEITZ A.E.; PHAM V.M.; GUIGAL P.M.; FISCHER L.; WARD J.; VALENZUELA JG. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. **Vaccine**. Amsterdam, v. 24, n.3, p.374-390, Jan 2006.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.; SOUZA, C.S.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v.37, n.11, p.846-849, Nov. 1998.

PASSOS, V.M.A.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n.1, p.19-20, Jan./Feb. 1996.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Inf. Dis.**, v.22, n.1, p.1-13, Jan. 1996.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Trypanosomatidae* – Gênero *Leishmania* – *L. braziliensis* e *L. tropica*. In: **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap.7, p.77-118.

PETERSON, A.T., SHAW, L. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.33, n.9, p.919-931, Aug. 2003.

PETERSON, A.T., PEREIRA, R.S., CAMARGO NEVES, V.F. Using epidemiological survey data to infer geographic distributions of leishmaniasis vector species. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 37, p.10-14, Jan./Fev. 2004.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICÃO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.91, n.4, p.1390-1395, Apr. 1993.

QURESHI, A.A.; ASAHIMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R.D.; LERNER, E.A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.54, n.6, p.665-671, Jun. 1996.

REDDY, V.B.; IUGA, A.O.; KOUNGA, K.; LERNER, E.A. Functional analysis of recombinant mutants of maxadilan with a PAC1 receptor-

expressing melanophore cell line. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.281, n.24, p.16197-16201, Jun. 2006.

REED, S.G. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. **J. Exp. Med.**, New York, v.194, p.F7-9, 2001.

REITHINGER, R. Protective saliva: sandfly spit delivers. Editorial. **Trends Parasitol.**, v. 17, n.11, p.513, nov. 2001.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. p. 3-65.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v.32, p.463-78, 1987.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACCELAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.31, n.1, p.143-148, Jan. 1998.

ROGERS, K.A.; TITUS, R.G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunol.** Oxford, v.25, n.3, p.127-134, Mar. 2003.

ROGERS, M.E.; IIG, T.; NIKOLAEV A.V.; FERGUSON, M.A.J.; BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**. v.430, n.22, p.463-467, Jul. 2004.

ROHOUSOVA, I; OZENSOY, S; OZBEL, Y; VOLF, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**. Cambridge, v.130, n.5, p.493-499, May 2005.

ROHOUSOVA, I; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, Praga, v.53, p. 161-171, 2006.

SACKS, D.L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species specific vector competence. **Cell microbiol**. England, v.3, n.4, p.189-196, Apr.2001.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E.A. Leishmaniose e outras dermatoses por protozoários. In: **Dermatologia**. São Paulo, Artes Médicas, 1998. cap. 45, p.565-574.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R., TITUS, R. A Mouse Model of *Leishmania braziliensis braziliensis* Infection Produced by Coinjection with Sand Fly Saliva. **J. Exp. Med.**, New York, v.173, n.1, p.49-54, Jan. 1991.

SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J.C.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.72, n.1, p.94-98, Jan. 2005.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.3, p.239-251, May 2004.

SOARES, M.B.P.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **J. Immunol.** Baltimore, v.15, n.4, p.1811-1816, Feb 15 1998.

SOARES, R.P.P.; TURCO, A.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.75, n.3, p.301-330, Sep. 2003.

SOUZA, N.A.; ANDRADE-COELHO, C.A.; VILELA, M.L.; PEIXOTO, A.A.; RANGEL, E.F. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia*

*whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Occuring Sympatrically in Area of Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.6, p.759-765, Sep. 2002.

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Taubaté. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, litoral de São Paulo, Brasil, 1993-2003. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.38, n.2, p.331-332, 2004.

TAYLOR-ROBINSON, A. Sensitization to sand fly bite prevents cutaneous leishmaniasis. Editorial. **Trends Parasitol.**, v.9, n.3, p.109, mar. 2001.

TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, Washington, v.239, n.4845, p. 1306-1308, Mar 11. 1988.

TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v.6, n.5, p.157-160, May 1990.



THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.C.; TITUS, R.G. Analysis of Enhancing Effect of Sand Fly Saliva on Leishmania Infection in Mice. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.59, n.5, p.1592-1598, May 1991.

THEODOS, C.M; TITUS, R.G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. **Parasite Immunol.**, Oxford, v.15, n.8, p.481-487, Aug. 1993.

THIAKAKI, M.; ROHOUSOVA, I.; VOLFOVA, V.; VOLF, P.; CHANG, K-P.; SOTERIADOU, K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Microbes Infect.**, Paris, v.7, n.4, p.760-766, Apr. 2005.

TOLEZANO, J.E. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n.3, p.427-434, Jul/Sep. 1994.

TORO, G.R. Leishmaniasis. **Biomédica**, v.31, n.3, p.77-98, 1983.

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M.C. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization

of a protective salivary protein. **J. Exp. Med.**, New York, v.194, n.3, p.331-342, Aug 6, 2001.

VIANNIA, G. Sobre uma espécie de *Leishmania*. **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v. 25, p.411, 1912.

VILELA, M.L.; SOUZA, N.A.; OLIVEIRA, S.M.P.; COSTA-PINTO, D.; CABELLO, P.H.; RANGEL, E.F.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Braz. J. Biol.**, São Paulo, v.66, n.1A, p.175-183, Feb. 2006.

VOLF, P; ROHOUSOVA, I. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. **Parasitology**. Cambridge, v.122, p.37-41, Jan 2001.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.35, n.5, p.926-930, Sep. 1986.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, London, v.345, n.1312, p.223-230, Jul 29, 1994.

**WHO - World Health Organization.** Leishmaniasis: background information - A brief history of the disease. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 12 julho de 2005.

YIN, H.; NORRIS, D.E., LANZARO, G.C. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. **Insect. Mol. Biol.**, Oxford, v.9, n.3, p.309-314, Jun. 2000.

YOSHIDA, L.A.; CORREA, F.M.A.; MARQUES, S.A.; STOLF, H.O.; DILLON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr., G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n.1, p.133-134, Jan./Mar. 1990.

## ANEXOS

**TABELA 1:** Títulos de anticorpos anti-MAX em pacientes com LTA e controles dosados pelo método ELISA (D.O. – densidade óptica) e sua respectiva transformação em D.O./cut off .

<b>PACIENTES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>
<b>135</b>	0,188	1,39	<b>1</b>	0,060	0,44	<b>20</b>	0,102	0,74
<b>129</b>	0,122	0,90	<b>2</b>	0,050	0,36	<b>21</b>	0,005	0,04
<b>127</b>	0,091	0,67	<b>3</b>	0,096	0,70	<b>22</b>	0,061	0,45
<b>123</b>	0,008	0,06	<b>4</b>	0,166	1,21	<b>23</b>	0,079	0,58
<b>111</b>	0,002	0,02	<b>5</b>	0,042	0,31	<b>24</b>	0,035	0,26
<b>99</b>	0,144	1,07	<b>6</b>	0,008	0,06	<b>25</b>	0,057	0,42
<b>90</b>	0,051	0,37	<b>7</b>	0,057	0,42	<b>26</b>	0,040	0,29
<b>89</b>	0,061	0,45	<b>8</b>	0,054	0,39	<b>27</b>	0,085	0,62
<b>165</b>	0,158	1,17	<b>9</b>	0,099	0,72	<b>28</b>	0,104	0,76
<b>160</b>	0,014	0,10	<b>10</b>	0,113	0,82	<b>29</b>	0,029	0,21
<b>159</b>	0,042	0,31	<b>11</b>	0,064	0,47	<b>30</b>	0,086	0,63
<b>158</b>	0,036	0,27	<b>12</b>	0,039	0,28	<b>31</b>	0,004	0,03
<b>147</b>	0,026	0,19	<b>13</b>	0,024	0,18	<b>32</b>	0,032	0,23
<b>140</b>	0,181	1,34	<b>14</b>	0,054	0,39	<b>33</b>	0,060	0,44
<b>139</b>	0,138	1,02	<b>15</b>	0,044	0,32	<b>34</b>	0,049	0,36
<b>138</b>	0,014	0,10	<b>16</b>	0,011	0,08	<b>35</b>	0,018	0,13
<b>136</b>	0,095	0,70	<b>17</b>	0,078	0,57	<b>36</b>	0,141	1,03
<b>167</b>	0,091	0,67	<b>18</b>	0,113	0,82			
<b>166</b>	0,186	1,38	<b>19</b>	0,046	0,34			

Lote do MAX: 1,2 mg/ml  
 Concentração por poço: 120 µg/ml  
 Cut off do experimento: 0,135

**TABELA 2:** Títulos de anticorpos anti-MAX em pacientes com LTA dosados pelo método ELISA (D.O. – densidade óptica) e sua respectiva transformação em D.O./cut off.

<b>PACIENTES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>
<b>2/242</b>	0,127	1,49
<b>4/238</b>	0,076	0,89
<b>5/246</b>	0,056	0,66
<b>6/235</b>	0,069	0,81
<b>7/227</b>	0,052	0,61
<b>9/222</b>	0,173	2,04
<b>10/248</b>	0,042	0,49
<b>12/252</b>	0,029	0,34
<b>14/230</b>	0,049	0,58
<b>17/256</b>	0,104	1,22
<b>19/262</b>	0,046	0,54
<b>20/261</b>	0,076	0,89
<b>21/263</b>	0,074	0,87
<b>29/272</b>	0,048	0,56
<b>31/232</b>	0,043	0,51
<b>32/195</b>	0,024	0,28
<b>35</b>	0,031	0,36
<b>38/277</b>	0,111	1,31
<b>40/287</b>	0,044	0,52
<b>41/291</b>	0,035	0,41
<b>178</b>	0,056	0,66
<b>213</b>	0,071	0,84

Lote do MAX: 500 µg/ml  
 Concentração de MAX por poço: 125 µg/ml  
 Cut off do experimento: 0,085

**TABELA 3:** Títulos de anticorpos anti-MAX em controles dosados pelo método ELISA (D.O. – densidade óptica) e sua respectiva transformação em D.O./cut off e título de CIE.

<b>CONTROLES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>	<b>CIE</b>
<b>2104</b>	0,152	0,57	1/4
<b>2126</b>	0,084	0,32	NR
<b>6915</b>	0,205	0,77	NR
<b>6861</b>	0,173	0,65	NR
<b>6886</b>	0,060	0,23	NR
<b>6899</b>	0,152	0,57	NR
<b>7066</b>	0,177	0,67	1/1
<b>7067</b>	0,215	0,81	1/4
<b>7106</b>	0,150	0,56	NR
<b>7218</b>	0,219	0,82	NR

NR: não reagente.

Lote do MAX: 143 µg/ml  
Concentração de MAX por poço: 71,5 µg/ml  
Cut off do experimento: 0,27

**TABELA 4:** Títulos de anticorpos anti-MAX em controles dosados pelo método ELISA (D.O. – densidade óptica) e sua respectiva transformação em D.O./cut off e título de CIE.

<b>CONTROLES</b>	<b>ELISA (D.O.)</b>	<b>D.O./cut off</b>	<b>CIE</b>
<b>6799</b>	0,050	0,20	1/1
<b>6807</b>	0,140	0,56	NR
<b>6813</b>	0,250	1,00	NR
<b>6821</b>	0,070	0,29	NR
<b>6826</b>	0,280	1,12	1/16
<b>6827</b>	0,100	0,40	1/2
<b>6837</b>	0,030	0,12	NR
<b>6844</b>	0,130	0,25	NR
<b>6853</b>	0,070	0,29	NR
<b>6903</b>	0,220	0,88	1/32
<b>7042</b>	0,140	0,56	NR
<b>7043</b>	0,150	0,6	NR
<b>7054</b>	0,230	0,92	1/4
<b>7068</b>	0,300	1,2	1/16
<b>7076</b>	0,130	0,52	1/8
<b>7095</b>	0,140	0,56	NR
<b>7114</b>	0,240	0,96	1/8

NR: não reagente.

Lote do MAX: 143 µg/ml  
 Concentração de MAX por poço: 71,5 µg/ml  
 Cut off do experimento: 0,25

PP013 - Maxadilan (MAX) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão gênica e protéica de MAX em *Lutzomyia neivai*\*

*Maxadilan (MAX) – Salivary protein of Lutzomyia longipalpis: Detection of antibodies anti-MAX in American tegumentar leishmaniasis (ATL), and genetic and protein expression of MAX in Lutzomyia neivai\**

Juliana Machado Aires<sup>1</sup>

Maria Fernanda Chociay<sup>2</sup>

Margarida M. P. Nascimento<sup>3</sup>

José Fernando de C. Figueiredo<sup>4</sup>

Ana Maria F. Roselino<sup>5</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - A proteína MAX, componente salivar de *Lutzomyia longipalpis*, vetor do calazar ou leishmaniose sistêmica, tem sido empregada como vacina para leishmaniose tegumentar experimental, com funções de vasodilatação e imunomodulação.

OBJETIVOS - Detectar anticorpos séricos antiMAX em pacientes com LTA e verificar a expressão de MAX em *L. neivai*, vetor da LTA na região em estudo.

MÉTODOS - Anticorpos antiMAX foram detectados por Elisa em soro de 42 pacientes com LTA e 63 controles. A extração de proteínas e de DNA de *L. longipalpis* (controle positivo) e de *L. neivai* foi realizada pelo método Trizol e seguida pela detecção de proteínas por eletroforese e pela expressão gênica de MAX por PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) com as enzimas Hha I e Rsa I.

RESULTADOS - Títulos maiores de anticorpos antiMAX foram observados na LTA ( $p=0,0132$ ). A eletroforese de proteínas mostrou frações semelhantes para *L. longipalpis* e *L. neivai*, tendo-se observado para ambos fração protéica de peso molecular similar à proteína MAX. A expressão gênica de MAX em *L. longipalpis* e *L. neivai* foi confirmada por PCR-RFLP.

CONCLUSÕES - A presença de antiMAX nos grupos em estudo tornou imprescindível a pesquisa de MAX no vetor de LTA da região, tendo sido registrada pela primeira vez expressão protéica e gênica de MAX em *L. neivai*. Detecção de antiMAX em controles confirma exposição a picadas de flebotomos. Títulos de anticorpos antiMAX maiores na LTA sugerem exposição prévia e natural à picada e, consequentemente, à proteína MAX, não protegendo da doença e desfavorecendo seu emprego em vacinação. Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana

**Abstract:** BACKGROUND - The protein MAX, salivary component of *Lutzomyia longipalpis*, vector of calazar or systemic leishmaniasis, has been used as vaccine for experimental tegumentar leishmaniasis, which vasodilatory and immunomodulatory functions are described.

OBJECTIVES - Our purpose was to detect antibodies antiMAX in sera samples from patients with ATL and to verify the genetic and protein expression of MAX in *L. neivai*, phlebotomy vector of ATL in the area of study.

METHODS - Antibodies antiMAX were detected by ELISA in sera from 42 patients with ATL and 63 controls. The extraction of proteins and of DNA from *L. longipalpis* (positive control) and *L. neivai* was accomplished by the method Trizol, following for the detection of proteins by electrophoresis, and genetic expression of MAX by PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) with the enzymes Hha I and Rsa I.

RESULTS - Increased titles of antibodies antiMAX were observed in ATL, compared to controls ( $p=0,0132$ ). Electrophoreses of proteins showed similar fractions for *L. longipalpis* and *L. neivai*, and for both a protein fraction with molecular weight similarity to MAX was observed. The genetic expression of MAX in *L. longipalpis* and *L. neivai* was confirmed by PCR-RFLP.

CONCLUSIONS - The description of antibodies antiMAX in ATL patients and controls turned indispensable the research of MAX in the phlebotomy vector of ATL in the area of study. For the first time, it was registered protein and genetic expression of MAX in *L. neivai*. The antiMAX detection in controls confirms the previous exposition to prick of phlebotomies. Increased titles of antibodies antiMAX in ATL patients suggest previous and natural exposition to the bite and, consequently, to the protein MAX, not protecting them of disease and discouraging its employment in vaccination.

Keywords: American tegumentar leishmaniasis

\* Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Dermatologia e Laboratório de Sorologia da Divisão de Moléstias Infeciosas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil

<sup>1</sup> Aluna de Pós-Graduação (Doutorado Direto), bolsista Capes (2002-2004), Programa Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil

<sup>2</sup> Aluna de Pós-Graduação (Doutorado), bolsista Capes, Programa Clínica Médica, Área Investigação Biomédica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil

<sup>3</sup> Biomédica, Laboratório de Sorologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil

<sup>4</sup> Professor Doutor, Divisão de Moléstias Infeciosas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil

<sup>5</sup> Professora-associada, Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil



## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses que afetam a pele, mucosas ou vísceras, resultantes do parasitismo dos macrófagos pelo protozoário do gênero *Leishmania*, inoculado no organismo pela picada de um inseto flebótomo.<sup>1</sup> Na região de Ribeirão Preto, há registro de casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo *Leishmania Viannia braziliensis* e *Leishmania Leishmania amazonensis* as espécies implicadas nas formas cutânea e mucosa.<sup>2</sup> Quanto aos vetores, tem-se a informação verbal que são encontrados nesta região: *Lutzomyia intermedia* - Lutz & Neiva, 1912 (SUCEN, Araraquara) e *Lutzomyia neivai* - Pinto, 1926 (SUCEN, Mogi Guaçu). Até 1996, ambos eram considerados a mesma espécie.

Maxadilan (MAX) é um peptídeo de 7kDa, vasodilatador potente e com propriedades imunomodulatórias, presente na glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*.<sup>3</sup> Lerner e Shoemaker<sup>4</sup> clonaram e produziram MAX recombinante em *Escherichia coli* com as mesmas propriedades da proteína salivar. Sua atividade vasodilatadora é 500 vezes maior que a do CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), até então o mais potente vasodilatador conhecido.<sup>4,5</sup> MAX é um agonista específico dos receptores pituitários tipo 1 do peptídeo ativador da adenil-ciclase (*Pacap –pituitary adenylate cyclase activating peptide*), um peptídeo endógeno encontrado nos mamíferos. Surpreendentemente, o peptídeo salivar não apresenta qualquer seqüência homóloga ao Pacap, apesar de se ligar no mesmo sítio em seu receptor tipo 1 e promover sua ativação.<sup>6</sup>

Várias publicações sobre sua capacidade de imunomodulação surgiram e implicaram-no como fator de promoção da infecção, desviando a resposta Th1 para Th2 e favorecendo a evolução da doença.<sup>7,9</sup> Esses mecanismos (vasodilatação e imunomodulação) promovem campo perfeito para a injeção do parasito em seu hospedeiro, com resposta inflamatória mínima, por picada e salivação do vetor. Isso talvez possa explicar por que os artrópodes são vetores extremamente eficientes na transmissão de várias doenças.

Diante das evidências de imunomodulação promovida pelo MAX, ele tem sido empregado em vacina experimental para leishmaniose.<sup>10</sup> Como sua expressão se limita a *L. longipalpis*, vetor do calazar, teve-se por objetivos: 1) detectar antiMAX em soro de pacientes com LTA e 2) verificar a expressão de MAX em *L. neivai*, vetor da LTA na região estudada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se levantamento dos prontuários de pacientes com diagnóstico confirmado de LTA, atendi-

dos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), no período de 1999 a junho de 2004, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Processo HCRP n. 5.886/2002), tendo como critérios de inclusão no mínimo dois dos seguintes itens:

1. diagnóstico clínico-epidemiológico compatível com LTA;
2. intradermorreação de Montenegro (IRM) positiva;
3. exame histopatológico de amostra de pele ou de mucosa compatível com LTA, incluída a descrição da presença de parasitos sugestivos do gênero *Leishmania*;
4. reação sorológica de imunofluorescência indireta (RIFI) para LTA positiva;
5. PCR para pesquisa de leishmania realizada em amostras de pele ou de mucosa positiva.

Foram selecionados 42 pacientes que melhor preenchiam os critérios supracitados.

O grupo controle deste trabalho foi composto por 63 doadores saudáveis do Banco de Sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

## Elisa para pesquisa de anticorpos antiMaxadilan

A técnica de ensaio imunoenzimático não competitivo indireto (Elisa) para pesquisa de anticorpos antiMAX foi padronizada para este trabalho. O peptídeo recombinante produzido em *Escherichia coli*, MAX, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ethan A. Lerner, da Harvard Medical School, Boston, MA, USA. Resumidamente, realizou-se a sensibilização da placa de microtitulação com 50µl de MAX e adicionaram-se 100µl da amostra de soro diluída (1/50) em PBS-TM (salina tamponada contendo 5% de leite desnatado). Após período de incubação (duas horas, 37°C) e lavagem, foram adicionados 50µl do conjugado anticorpo-enzima (antiIgG humana) seguido de novo período de incubação e lavagem. A seguir, foram adicionados 100µl do substrato (o-fenilenodiamina di-hidrocloreto – OPD-Sigma) e aguardado desenvolvimento de cor, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, e a leitura processada em 492nm (Labsystems Multiskan MS).

## Extração de proteínas e de DNA

A extração de proteínas e de DNA de exemplares de *L. longipalpis* (controle positivo), obtidos de insetário e cedidos gentilmente pela Dra. Alda Falcão, FioCruz-BH, e de *L. neivai*, coletadas em campo e identificadas pelo Dr. Cláudio Casanova, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) - Mogi Guaçu, foi realizada pelo método Trizol. Resumidamente, os tecidos são desintegrados por ultrassom até que se dissolvam por completo, utilizando 1ml de trizol para cada 50-100mg de tecido.

Adicionam-se 200µL de clorofórmio para cada mililitro de trizol utilizado e homogeneiza-se vigorosamente por 15 segundos. A seguir, incuba-se por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifuga-se a 12.000g, por 14 minutos, a 4°C. Transfere-se a fase aquosa, que contém o RNA, para outro *ependorf*. Ao material restante, adicionam-se 300µL de etanol, em temperatura ambiente por dois ou três minutos e centrifuga-se 2.000g, por cinco minutos, 4°C. Remove-se a nova fase aquosa para posterior extração de proteínas, deixando o *pellet* que contém o DNA. Lava-se o *pellet* que ficou no tubo com 1ml de citrato de sódio 0,1M diluído em etanol 10%. Após homogeneização e centrifugação, despreza-se o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* com 1,5ml de etanol 75%. Incuba-se a amostra por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifuga-se (2.000g, cinco minutos, 4°C). Despreza-se o sobrenadante, seca-se o *pellet*, dissolvendo-o em 100µL de NaOH, 8mM, pH=8,4, obtendo-se assim o DNA. Para a extração de proteínas, adiciona-se 1,5ml de isopropanol (1:1) à fase líquida do sobrenadante obtido na extração de DNA. Incuba-se (15 minutos) e centrifuga-se a amostra (12.000g, 10 minutos, 4°C). Despreza-se o sobrenadante e lava-se o *pellet* três vezes com 2ml da solução de hidrócloro de guanidina 0,3M diluído em etanol 95%. Após a última lavagem, ressuspende-se o *pellet* em 1,5ml de etanol absoluto, incuba-se (20 minutos, temperatura ambiente) e centrifuga-se (7.500g, cinco minutos, 4°C). Despreza-se o sobrenadante, seca-se o *pellet*, dissolvendo-o em 100µL de SDS 1%, deixando por três minutos a 50°C, obtendo-se assim a extração de proteínas.

### Eletoforese de proteínas

A eletroforese de proteínas foi feita em gel de acrilamida 12,5%, com as amostras de: MAX (16,66ug), proteína extraída de *L. longipalpis* (1,11ug e 0,56ug) e de *L. neivai* (0,48ug). Após corrida por uma hora e 20 minutos, 100V/30mA, foi corado pelo método da prata.

### Polymerase Chain Reaction (PCR) para pesquisa de Maxadilan em *L. longipalpis* e *L. neivai*

Para a verificação da expressão gênica do MAX em amostras de DNA extraídas de *L. longipalpis* e de *L. neivai*, utilizou-se a PCR com primers (Invitrogen) que resultam em produtos de 106bp (Figura 1).

A PCR foi realizada com volume final de 25µL contendo buffer 10x 2,5µL, dntp 2mMol 5µL, água estéril 10,3µL, primer sense (100pmol) 1µL, primer antisense (100pmol) 1µL e TaqDNA polimerase 0,2µL. A essa mistura foram adicionados 5µL do DNA extraído da amostra a ser amplificada. Utilizou-se um tubo "branco" com água em vez de DNA para controle negativo.

As amostras foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems 9700), obedecendo ao

```

1  aatcaattgc taaaaaaaa ttacaaatag aactactaca
   gatgttctga atttttctt
61  gatattcttt ctcaattgga tgrataaaag aggctatatt
   gtgctgatt tgtagtcag
121 tattctgata aactgcaaaa atgaagcaaa tcctttaat
   ctctttgggt ggtgttcttg
181 ccgtgtttgc cttagtaag ttctctctt aggcctttcc
   ttctaaaac ttaaagtaat
241 ttaatgaaat attctttaa taatctccat tttctgtag
   acgttgctga gggctgtgat
301 gcaacatgcc aatttcgcaa g cagggca tcatagcaat
   cagggca tcatagcaat
361 gttttgcaga ctctgtaca aacaactgca acattcacat
   caat
421 ata gtgtctcaa agaattgat aagcagaaga
   aaaaggaatt tagttcagga
481 aagtaaaaga ttgaagaaa ttgtagccga gagagaaag
   aaagaaagtc ccaatacata
541 tttgtttgt taattgtaac gaattttccg aaaaaataaa
   atattatgca ctcaattta

```

FIGURA 1: Gene do maxadilan

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&al=159451>). Em amarelo, os primers utilizados na PCR, cujo produto final corresponde ao fragmento de 106pb.

Os destaques em vermelho e azul mostram os sítios de restrição das enzimas Hha I e Rsa I, respectivamente

seguinte ciclo:

- 94°C por 3min e 30 seg;
- 93°C por 30 seg, 52°C por 1 min, 72°C por 1min – 35 ciclos
- 72°C por 10min, e a seguir por 4°C até a próxima fase.

Para a identificação das bandas de DNA, foram utilizados 5µL do material amplificado em gel de acrilamida 10% não desnaturante (150V, por duas horas).

### Restrição do fragmento de DNA – RFLP

#### (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A partir da seqüência de nucleotídeos do fragmento amplificado de 106bp, utilizaram-se as enzimas de restrição Hha I e Rsa I. Hha I age [?] sobre o sítio de restrição G<sub>^</sub>CG<sub>^</sub>C, conferindo dois fragmentos: 30 e 80bp. Já a Rsa I atua no sítio GT|AC resultando em dois fragmentos de 50bp (Figura 1).

Resumidamente, utilizaram-se 1,0µg de DNA do produto da PCR, 1,0µL do buffer e 5U da enzima de restrição Hha I ou 10U de Rsa I, que são completados com água em volume final de 10µL, a 37°C, overnight.

### Análise estatística

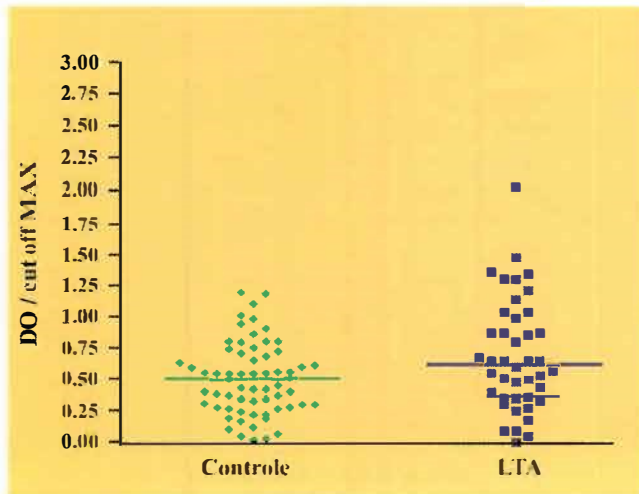
Para a análise dos títulos de anticorpos antiMAX, uma vez que os dados obedeceram à curva de normalidade, utilizou-se o teste *t* de Student.

## RESULTADOS

### Pesquisa de antiMAX em soros de pacientes com ITA

Anticorpos antiMAX, detectados pelo método

**GRÁFICO 1:** Elisa para pesquisa de anticorpos antiMAX em controles e pacientes com LTA. Títulos de antiMAX (DO – densidade óptica / *cut off*) em amostras de pacientes com LTA maiores que os do grupo controle (p=0,0132)



Elisa no soro de pacientes com LTA e controles, foram significativamente maiores no grupo LTA quando comparados aos controles (p=0,0132) (Gráfico 1).

**Expressão protéica de MAX em *L. neivai***

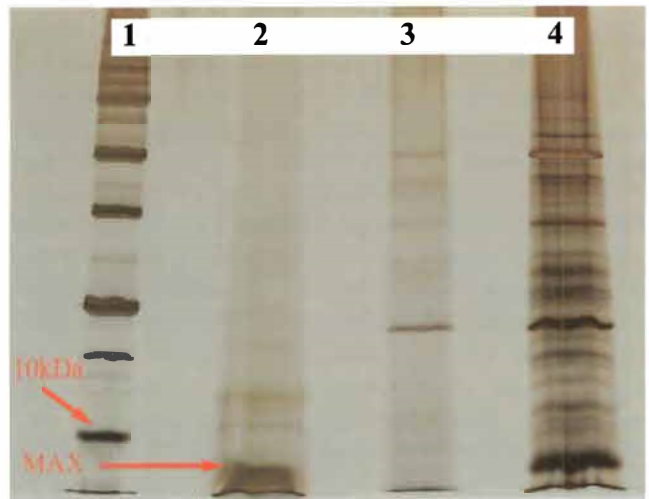
Várias frações protéicas foram observadas no gel de acrilamida para as amostras de *L. neivai* e *L. longipalpis*. Entre elas, frações de pesos moleculares semelhantes de ambos os vetores compararam-se à fração do MAX (Figura 2).

**Expressão gênica de MAX em *L. neivai***

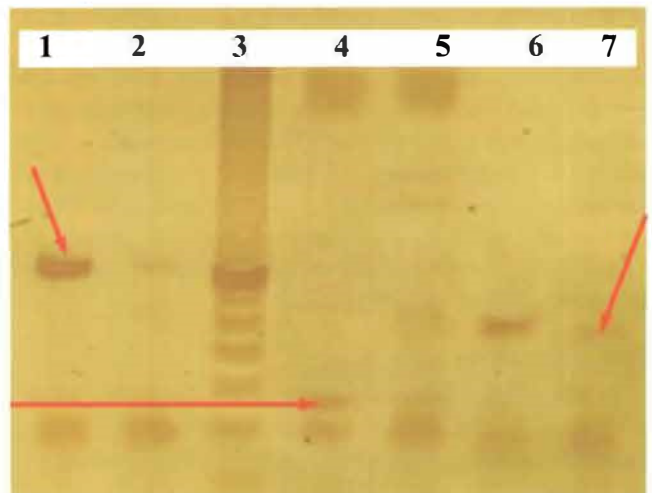
Como indica a figura 3, observou-se amplificação de fragmento de 106bp na PCR de *L. longipalpis* (controle positivo) e de *L. neivai*, correspondendo ao esperado para fragmento de MAX. A confirmação foi feita por meio de PCR-PFLP. No ensaio em que foi utilizada a enzima Hha I, observaram-se a digestão do fragmento de 106bp e o surgimento de dois novos fragmentos: de 30 e 80bp. No ensaio com a enzima Rsa I, observou-se também a digestão do fragmento de 106bp em dois fragmentos de 50bp.

**DISCUSSÃO**

O entendimento da relação parasito/vetor/hospedeiro na leishmaniose é de extrema importância na busca de mecanismos de atuação para o controle da LTA. Resposta imune efetiva é aquela que paralisa a replicação do parasito dentro dos macrófagos e impede a progressão da doença. Isso pode ser obtido pela prévia imunização com parasitos ou antígenos selecionados. No entanto, na LTA, em que se tem um vetor, certamente o flebótomo atua no processo de infecção



**FIGURA 2:** Gel de acrilamida 12,5% mostrando eletroforese de proteínas. Colunas: 1. PM de 10kDa; 2. MAX (seta). As frações acima da seta representam dímeros do MAX. 3. Frações protéicas de *L. neivai*. 4. Frações protéicas de *L. longipalpis*. As frações de ambos os vetores comparam-se à fração do MAX (seta)



**FIGURA 3:** Gel de acrilamida 10% mostrando produtos de PCR amplificados para MAX (à esquerda do marcador de PM) e após digestão enzimática (à direita do marcador de PM). Colunas: 1: PCR para MAX de *L. longipalpis* (seta: 106bp). 2: PCR para MAX de *L. neivai* (106bp). 3. PM de 10bp. 4-5: Produto da PCR digerido com a enzima Rsa I, originando bandas de 55bp (seta), de ambas as amostras, *L. longipalpis* e *L. neivai*, respectivamente. 6-7: Produto da PCR digerido com a enzima Hha I, originando bandas de 80bp (seta) e 30bp, de ambas as amostras, *L. longipalpis* e *L. neivai*, respectivamente.

e promove o estabelecimento da doença.<sup>11</sup> Inicialmente, os experimentos utilizavam extrato de glândulas salivares de flebótomos, e os resultados sempre apontavam para aumento da infectividade da leishmania na presença da saliva.<sup>12,13</sup> Lima e Titus<sup>14</sup> observaram que lisado da glândula salivar de *L. longipalpis* estimu-

la, significativamente, a infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e que esses animais produzem duas a três vezes mais interleucina (IL)-4 se comparados aos animais infectados sem a saliva.

A partir da extração e clonagem de MAX da saliva de *L. longipalpis*, experimentos foram conduzidos para o melhor entendimento do papel do vetor na infecção e modulação da doença. Morris et al.<sup>10</sup> demonstraram que MAX pode substituir a saliva e que a multiplicação parasitária em camundongos CBA infectados com *L. major* e MAX ou *L. major* e glândula salivar é igual. Submeteram grupos à vacinação prévia com MAX e observaram que as lesões cutâneas em animais vacinados foram de três a cinco vezes menores, com crescimento parasitário reduzido, e que cicatrizavam 50 dias após a infecção, enquanto nos grupos tratados somente com adjuvante ou diluente a cicatrização ainda não havia ocorrido após 65 dias. Para investigar os possíveis mecanismos de proteção, promovida pela vacinação, realizaram dosagens de anticorpos antiMAX no soro por meio do Elisa e detectaram altos títulos. Células de linfonodos regionais, extraídas dos animais tratados, foram estimuladas *in vitro* com MAX e produziram INF- $\gamma$  e NO (óxido nítrico) em quantidades significativas. Portanto, respostas humoral e celular foram estimuladas em camundongos vacinados.

Rogers e Titus<sup>8</sup> apresentaram os efeitos do MAX *in vitro*. Células mononucleares periféricas e monócitos foram obtidos de doadores de sangue saudáveis, cultivados em meios de cultura e incubados com MAX. Posteriormente, foram estimulados com *L. major*, e observaram-se redução da secreção de IFN- $\gamma$  e de IL-12p40 pelas células mononucleares periféricas e de TNF- $\alpha$  pelos monócitos, e, contrariamente, detectou-se aumento na produção de IL-6. Os dados sugeriram que os efeitos imunomodulatórios do MAX sobre células humanas têm importante implicação para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose.

O uso de componentes não parasitários para indução de resposta imune específica contra parasitos, diminuindo a infecção, representa nova e promissora perspectiva na busca de vacinas para doenças em que os patógenos são transmitidos por vetores. A identificação de um componente específico na glândula salivar com atividade imunomodulatória, como, por exemplo, o MAX, é fundamental para o entendimento da interação hospedeiro e vetor no nível molecular. Se esse componente é conservado entre as múltiplas espécies de flebótomos, ter-se-á a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger contra múltiplas espécies de *Leishmania* pela imunização com uma única proteína do vetor.<sup>11</sup>

É importante salientar que todos os experimentos têm sido realizados com diferentes espécies de leishmania, incluída a responsável pela forma cutânea, enquanto

a proteína salivar – MAX – só é descrita em vetor do calazar. Mais recentemente, houve relato de anticorpos anti-saliva de *L. intermedia* em pacientes com LTA.<sup>15</sup>

Diante destes resultados – a constatação da presença de antiMAX no soro de pacientes com LTA, chamando a atenção para a presença de antiMAX também em controles – tornou-se imprescindível a pesquisa da expressão de MAX em vetor responsável pela transmissão da LTA na região de estudo. De forma inédita, constatou-se a expressão gênica de MAX em *L. neivai*, vetor responsável pela transmissão da LTA na região, assim como a expressão de fração protéica correspondente ao MAX.

A presença de anticorpos antiMAX em controles confirma a exposição à picada de flebótomos. Moradores de áreas endêmicas de LTA, mediante a exposição natural à picada de flebótomos, são “vacinados” repetidamente. No entanto, embora seja possível que essa exposição promova redução da gravidade da doença, parece não trazer proteção total. Os resultados deste estudo confirmam isso, pois os pacientes com LTA apresentam títulos de antiMAX maiores do que aqueles dos controles e evoluíram com a manifestação da doença, incluindo a forma mucosa.

Uma vacina eficaz para leishmaniose será aquela que previna o desenvolvimento da doença. Uma redução do processo de infecção, como aquela obtida pela exposição prévia à picada de flebótomos<sup>16</sup> ou injeção de MAX, não necessariamente confere imunidade ao parasito ou previne a progressão da doença.<sup>10</sup> Vetor e patógeno devem ser considerados unidade única integrada no processo infeccioso para o desenvolvimento de vacina segura e eficaz.

## CONCLUSÃO

A população controle, apresentando anticorpos antiMAX, confirma a exposição natural a picadas de flebótomos. Diante dos títulos de anticorpos antiMAX maiores na amostra de LTA, com lesões cutâneas e mucosas em atividade, sugere-se que a exposição prévia e natural à proteína MAX não estaria conferindo proteção imunológica contra a leishmaniose tegumentar, desfavorecendo seu emprego em vacinação. □

## AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro: Capes; Faepa (Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência).

## REFERÊNCIAS

1. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. *Leishmaniasis*: new approaches to disease control. *BMJ*. 2003; 326: 377-82.
2. Medeiros ACR. Análise filogenética das espécies de *Leishmania* implicadas na Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2002.
3. Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*. 1991; 266: 11234-6.
4. Lerner EA, Shoemaker CB. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem*. 1992; 272: 33-7.
5. Jackson TS, Lerner E, Weisbrod RM, Tajima M, Loscalzo J, Keane JF Jr. Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *Am J Physiol*. 1996; 271: H924-30.
6. Moro O, Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem*. 1997; 272: 966-70.
7. Soares MB, Titus RG, Shoemaker CB, David JR, Bozza M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol*. 1998; 160: 1811-6.
8. Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasit Immunol*. 2003; 25: 127-34.
9. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasit Immunol*. 2000; 22: 319-31.
10. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol*. 2001; 167: 5226-30.
11. Reed SG. *Leishmaniasis* vaccination: targeting the source of infection. *J Exp Med*. 2001; 194: F7-9.
12. Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania infectivity*. *Science*. 1988; 239: 1306-8.
13. Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immunol*. 1991; 59: 1592-8.
14. Lima HC, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immunol*. 1996; 64: 5442-5.
15. Batista RL, Câmara PO, OliveiraNeto MP, Vilela ML, Costa SM, Pirmez C. *Lutzomyia intermedia* anti-saliva antibodies in patients living in endemic areas of American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. In: ASTMH, 53th Annual Meeting, 2004, Miami, Florida, 2004.
16. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 2000; 290: 1351-4.

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Ana Maria F. Roselino  
 Professora Associada - Faculdade de Medicina  
 de Ribeirão Preto - Divisão de Dermatologia  
 Departamento de Clínica Médica  
 Av. Bandeirantes, 3900  
 14049-900 - Ribeirão Preto - SP  
 Tel: (16)3633-0236 / 2715 - Fax:(16)3633-6695  
 E-mail: amfrosel@fmrp.usp.br



# *American Academy of Dermatology*

930 East Woodfield Road  
Schaumburg, IL 60173-4927

P.O. Box 4014  
Schaumburg, IL 60168-4014

Phone: 847/240-1251

Fax: 847/240-1920

August 15, 2006

Juliana Aires, MD

Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo  
SQSW 302 Bloco A Apto 306  
Brasilia DF 70673-201  
Brazil

Dear Dr. Aires:

It is my pleasure to inform you that you have been selected to receive a scholarship grant under the International Scholarship Program of the 18th World Congress of Dermatology Fund to attend the 65th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology to be held February 2-6, 2007 in Washington, DC at the Washington Convention Center. This means that your poster abstract has been selected for presentation and you will be expected to prepare a poster for presentation. You will receive your poster number and poster guidelines in a few weeks.

#### Scholarship Details

You will be able to register for the meeting and one 1-day course at no charge. Any fees for additional sessions will be your responsibility. You will also receive a meal and rooming allowance of \$1,250 that will be provided by check. Please note that the scholarship program does not include any specific travel expenses; you must make your own travel arrangements.

#### Registration/Housing

You will receive your program material and registration/housing information for the 65th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology in late October. Hotel reservations can be made on your registration form. Please note that a deposit of US\$175 per unit for your hotel room is required.

August 15, 2006

Page 2

Visa Process

You should immediately begin the process of contacting the U.S. embassy in your country to find out the requirements for obtaining a visa to attend the meeting. It could take up to three months to process your visa, so please allow plenty of time for visa processing. Please find attached helpful information sheet, "How to Apply for a Visa". For more information on visas, please use the following link:

<http://www.unitedstatesvisas.gov>.

Scholarship Breakfast

On behalf of the Committee on International Affairs, it is my pleasure to invite you to attend the Committee on International Affairs' Breakfast Meeting at the Annual Meeting. It will be held on Friday, February 2nd from 7:15-8:30 AM; we will let you know the exact location in upcoming correspondence. Your scholarship checks will be distributed at the time of the scholarship breakfast. If you are unable to attend the breakfast, you will be able to pick up your check at the Volunteer Booth in the Resource Center of the Exhibit Hall after 12:00 Noon on Friday, February 2nd. Arrangements will be made with a bank in Washington, DC for cashing these checks.

Abstract Book

We will be preparing a special abstract book for the World Congress poster exhibits for distribution within the Poster Exhibit Hall at the Annual Meeting.

Annual Meeting Gift

We are going to provide all scholarship recipients with a polo shirt with the AAD/Washington DC logo.

Acceptance Form

Please complete the enclosed acceptance form to formally accept this scholarship grant and indicate your shirt size.

If you have any questions, you may contact Ms. Linda Ayers at the address or fax number listed above, or by e-mail at [layers@aad.org](mailto:layers@aad.org). Congratulations on your selection for the scholarship.

Sincerely,

*Roy S. Rogers*

Roy S. Rogers, III, MD  
Chair, World Congress Fund Review Task Force

RSR/jem

CC: Jennifer Miller, Member Services Specialist, AAD  
Linda Ayers, Administrative Assistant, AAD

Enclosure



# American Academy of Dermatology

Physicians Dedicated to Excellence in Dermatology™

**Stephen P. Stone, MD, FAAD**  
President

**Correspondence**  
PO Box 4014  
Schaumburg IL 60166-4014

**Location**  
930 E Woodfield Rd  
Schaumburg IL 60173-4729

**Diane R. Baker, MD, FAAD**  
President-Elect

**David M. Pariser, MD, FAAD**  
Secretary-Treasurer

**William P. Coleman, III, MD, FAAD**  
Vice President

**Mary E. Maloney, MD, FAAD**  
Assistant Secretary-Treasurer

**Phone** (847) 330-0230  
**Fax** (847) 330-0050

**AAD Web Site**  
www.aad.org

**Henry W. Lim, MD, FAAD**  
Vice President-Elect

**Ronald A. Henrichs, CAE**  
Executive Director & CEO

September 14, 2006

Juliana Aires, MD  
Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo  
SQSW 302 A 306  
Brasilia DF 70673-201  
Brazil

Dear Poster Applicant:

Thank you for submitting an application for a poster exhibit at the American Academy of Dermatology 65<sup>th</sup> Annual Meeting, February 2-6, 2007 in Washington, DC. The Poster Exhibit Task Force is pleased to inform you that the following abstract is confirmed for presentation as a poster exhibit:

**Detection of antibodies anti-Max in ATL, and genetic and proteic expression of Max simile.**

**POSTER EXHIBIT NUMBER**

Your poster exhibit number is **P4092**. It will be listed under the category **Infection (Bacterial and Parasitic)** in the program book.

Please refer to the attached Poster Exhibit Guidelines for the location, schedule, and rules and regulations.

**REGISTRATION INFORMATION**

A program book on CD and registration materials will be mailed to you in October. Your appropriate category based upon your abstract submission information will be located on the back of the registration booklet next to your name. *In order to participate in any portion of the meeting or to receive a name badge, you are required to register.*

**Contact Information**

Poster Exhibit Questions – Sara Peterson, 847-240-1493; [speterson@aad.org](mailto:speterson@aad.org)  
Registration Questions – Robin Downey, 847-240-1486; [rdowney@aad.org](mailto:rdowney@aad.org)  
Scholarship Questions – Jennifer Miller, 847-240-1241; [jmiller@aad.org](mailto:jmiller@aad.org)

On behalf of the Task Force, thank you for your participation in the AAD 65th Annual Meeting Poster Exhibit Program.

Sincerely,

Theodore Rosen, MD  
Chairman, Poster Exhibits Task Force

TR/sjp:laa

CC: Jennifer Miller, Staff Liaison, World Congress Education Fund Task Force  
Linda Ayers, Member Services