

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 Aires¹

Maria Fernanda Chociay²

Margarida M. P. Nascimento³

José Fernando de C. Figueiredo⁴

Ana Maria F. Roselino⁵

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, conseqüentemente, 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*, pblebotomy 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 pblebotomy 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 pblebotomies. 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 Infecciosas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil

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

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

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

⁴ Professor Doutor, Divisão de Moléstias Infecciosas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - São Paulo (SP), Brasil

⁵ 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.¹ 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.² 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*.³ Lerner e Shoemaker⁴ 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.^{4,5} 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.⁶

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.^{7,9} 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.¹⁰ 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. intradermoreação 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 preenchem 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 H₂SO₄ 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 homogênea-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 hidrocloreto 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.

Eletroforese 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 taaaaaaaaa ttacaatag aactactaca
   gatgttctga attttttctt
61  gatattcttt ctcaattgga tgtataaaag aggctatttt
   gtgctgattt tgtagtcag
121 tattctgata aactgcaaaa atgaagcaaa tccttttaat
   ctctttgggtg gtggttcttg
181 ccgtgtttgc cttcagtaag ttcttccttt aggcctttcc
   ttctcaaaac ttaaagtaat
241 ttaatgaaat attctttaa taatctccat tttctgttag
   acgttgctga gggctgtgat
301 gcaacatgcc aatttcgca ggccatagat gactgcca
   ga agcagcgca tcatagcaat
361 gttttgcaga cttctgtaca aacaactgca acattcacat
   caatggatgc ctcccaacta
421 cctggaaata gtgtcttcaa agaagtatg aagcagaaga
   aaaaggaatt tagttcagga
481 aagtaaaga ttgaagaaaa ttgtagccga ggagagaaag
   aaagaaagtc ccataccata
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₋CG[^]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 HhaI ou 10U de Rsa I, que são completados com água em volume final de 10µL, a 37°C, overnight.

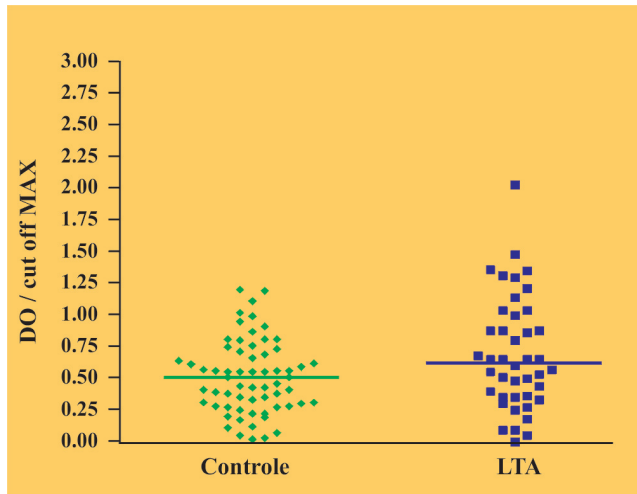
Análise estatística

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 LTA
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

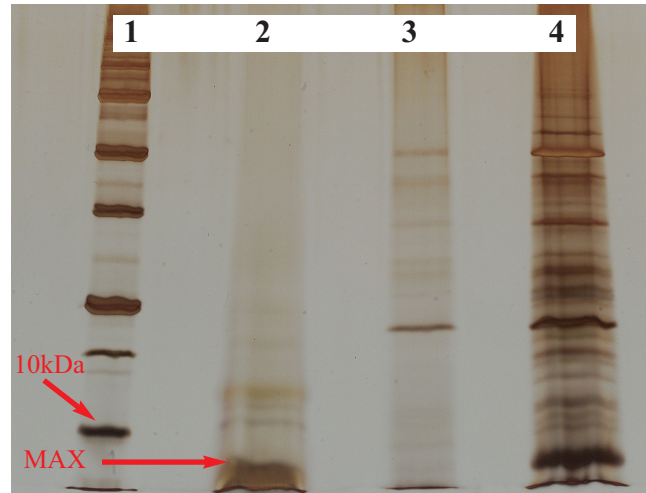


FIGURA 2: Gel de acrilamida 12,5% mostrando eletroforese de proteínas. Colunas: 1. PM de 10kDa; 2. MAX (seta). As frações acima da seta representam dímeros do MAX. 3. Frações protéicas de *L. neivai*. 4. Frações protéicas de *L. longipalpis*. As frações de ambos os vetores comparam-se à fração do MAX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

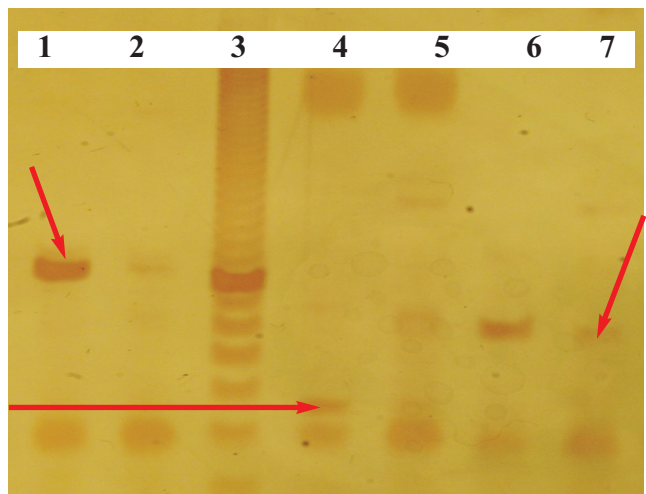


FIGURA 3: Gel de acrilamida 10% mostrando produtos de PCR amplificados para MAX (à esquerda do marcador de PM) e após digestão enzimática (à direita do marcador de PM). Colunas: 1: PCR para MAX de *L. longipalpis* (seta: 106bp); 2: PCR para MAX de *L. neivai* (106bp); 3. PM de 10bp; 4-5: Produto da PCR 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.¹¹ 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.^{12,13} Lima e Titus¹⁴ 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.¹⁰ 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- γ e NO (óxido nítrico) em quantidades significativas. Portanto, respostas humoral e celular foram estimuladas em camundongos vacinados.

Rogers e Titus⁸ 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- γ e de IL-12p40 pelas células mononucleares periféricas e de TNF- α 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 flebotomos, 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.¹¹

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.¹⁵

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 flebotomos. Moradores de áreas endêmicas de LTA, mediante a exposição natural à picada de flebotomos, 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 flebotomos¹⁶ ou injeção de MAX, não necessariamente confere imunidade ao parasito ou previne a progressão da doença.¹⁰ 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 flebotomos. 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, Keaney 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 *Plebotomus 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