

**O PAPEL DA SALIVA DO *LUTZOMYIA INTERMEDIA* NO  
DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA PELA  
INFECÇÃO POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*.**

**Autor: Augusto Marcelino Pedreira de Carvalho**

A saliva dos flebotomíneos possui uma variedade de agentes farmacológicos tais como anticoagulantes, vasodilatadores além de moléculas imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Diferente de outras interações parasito/vetor, a imunização de camundongos com a saliva de *Lutzomyia intermedia*, o principal vetor da *Leishmania braziliensis* no Brasil, exacerba a infecção por *Leishmania*. Em adição, pacientes com úlcera ativa apresentam altos títulos de anticorpos anti-saliva de *Lu. intermedia* quando comparados com indivíduos com a forma subclínica da infecção por *L. braziliensis*, sugerindo que a exposição à saliva desse flebótomo influencia o desfecho da infecção por *L. braziliensis*. Na primeira parte do presente estudo, caracterizamos a resposta imune contra as proteínas da saliva de *Lu. intermedia*, em residentes de área de transmissão de *L. braziliensis*. Participaram desse estudo 264 moradores de Corte de Pedra, Bahia, nos quais foi avaliada a resposta imune (humoral e celular) contra a saliva de *Lu. intermedia*. Anticorpos (IgG) anti-saliva foram encontrados em 150 (56.8%) indivíduos. Além disso, houve uma predominância das subclasses IgG1 e IgG4 no soro. Indivíduos com sorologia anti-saliva positiva apresentaram concentrações mais elevadas de IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  quando comparados aos controles, enquanto as concentrações de TNF foram similares nos dois grupos. Em adição, indivíduos com sorologia positiva também apresentaram concentrações mais elevadas de CXCL9 e CCL2. Adicionalmente, a principal fonte de IL-10 foi determinada como sendo as células T CD4<sup>+</sup>, incluindo suas subpopulações CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup>, e a neutralização de IL-10 em culturas *in vitro* foi capaz de reverter o aumento da carga parasitária em macrófagos, induzida pela saliva. Na segunda parte do trabalho, identificamos qual(is) proteína(s) presentes na saliva de *Lu. intermedia* poderia(m) agir como marcador de exposição, em residente em área endêmica. Para isso, nós produzimos as proteínas mais abundantes sob a forma recombinante e avaliamos a soroconversão de moradores de área endêmica. Encontramos uma forte correlação entre a presença de anticorpos contra a proteína LinB-13 e o IgG total anti-saliva. Avaliando uma coorte formada por contatos familiares de pacientes com doença ativa, confirmamos que a LinB-13 atua como marcador de exposição a saliva do *Lu. intermedia*. Além disso, mostramos uma dissociação entre a resposta humoral para LinB-13 e a presença de DTH para *Leishmania*. Por fim, mostramos que a presença de anticorpos anti-LinB-13 age como um fator de risco para o desenvolvimento da LC, confirmando nossos resultados anteriores. Concluímos que a exposição à saliva do *Lu. intermedia* modula a resposta imune de indivíduos expostos, facilitando a sobrevivência do parasita *in vitro* e aumentando o risco de desenvolver doença.

**ROLE OF LUTZOMYIA INTERMEDIA SALIVA ON CUTANEOUS  
LEISHMANIASIS DEVELOPMENT CAUSED BY *LEISHMANIA  
BRAZILIENSIS* INFECTION**

Sand fly saliva contains a variety of pharmacologic agents, such as anticoagulants, vasodilators, immunomodulatory and anti-inflammatory molecules. Differently from others parasite/vectors interactions, prior immunization with the *Lu. intermedia* saliva, the main vector of *Leishmania braziliensis* in Brazil, enhancement Leishmania infection. In addition, patients with active ulcers displayed higher levels of anti-*Lu. intermedia* saliva antibodies when compared with individuals with sub-clinical *L. braziliensis* infection, suggesting that exposure to sand flies saliva influences the outcome of *L. braziliensis* infection. In the first part of the present study we characterize the immune response against *Lu. intermedia* salivary proteins in residents of *L. braziliensis* transmission area. Participants in the present study included 264 individuals living in Corte de Pedra, Bahia, and were evaluated regarding humoral and cellular immune response to *Lu. intermedia* saliva. IgG Anti-*Lu. intermedia* saliva antibodies were found in 150 (56.8%) subjects and a positive serology was associated with home arrival after 16 pm ( $p=0.01$ ). Moreover, there was a predominance of IgG1 and IgG4 Immunoglobulin subclass in sera. Individuals with positive serology to *Lu. intermedia* saliva displayed higher concentrations of IL-10, IL-13 and IFN- $\gamma$  compared to controls whereas TNF levels were similar in both groups. In addition, subjects with positive serology to *Lu. intermedia* saliva also displayed high levels CXCL9 and CCL2 than controls. Furthermore, the main sources of IL-10-secreting cells were CD4+, including CD25+ and Foxp3+ subsets and the neutralization of IL-10 in vitro was able to reverse the increased parasite load in macrophages induced by saliva. In the second part of the study, we identified the salivary proteins that act as vector exposure makers in residents from an endemic area. For this, we produced the most abundant proteins and evaluated the seroconversion in residents from a CL endemic area. We found a strong correlation among antibodies against LinB-13 and IgG to total saliva. By evaluating a cohort of households contacts of patients with active disease, we confirmed that LinB-13 is a marker of exposure to *Lu. intermedia*. Moreover, we showed a dissociation between humoral response to LinB-13 and DTH to *Leishmania*. Finally, the presence of antibodies anti-LinB-13 is a risk factor for cutaneous leishmaniasis (CL) development, confirming our previous results that showed an increased risk of CL development after natural exposure to *Lu. intermedia* saliva. The exposure to *Lu. intermedia* saliva modulates an immune response of exposed subjects, facilitating parasite survival in vitro, and increasing the risk of developing disease.

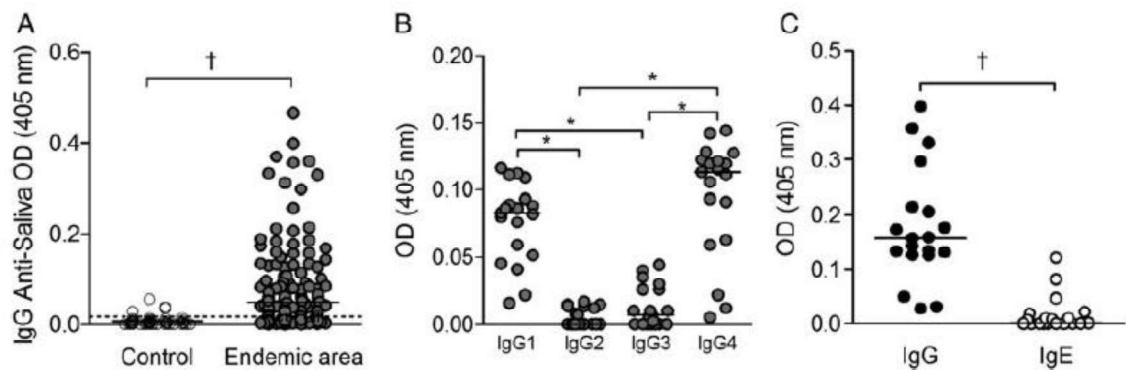


Figura 1. Resposta imune humoral à saliva do *Lutzomyia intermedia* em área endêmica de leishmaniose cutânea (LC). A, IgG total em residentes de área não endêmica (n = 46) (círculos brancos) e área endêmica de LC (n = 264) (círculos cinza). B, subclasses de IgG em um subconjunto de residentes da área endêmica (n = 19) representados em A e que foram soropositivos para saliva *Lu. intermedia*. C, Comparação dos níveis de IgG e IgE no mesmo subconjunto. Círculos representam valores individuais; linhas horizontais, valores das medianas da densidade óptica (DO); linha pontilhada em A, ponto de corte. \* P <0,05; † P <0,001.

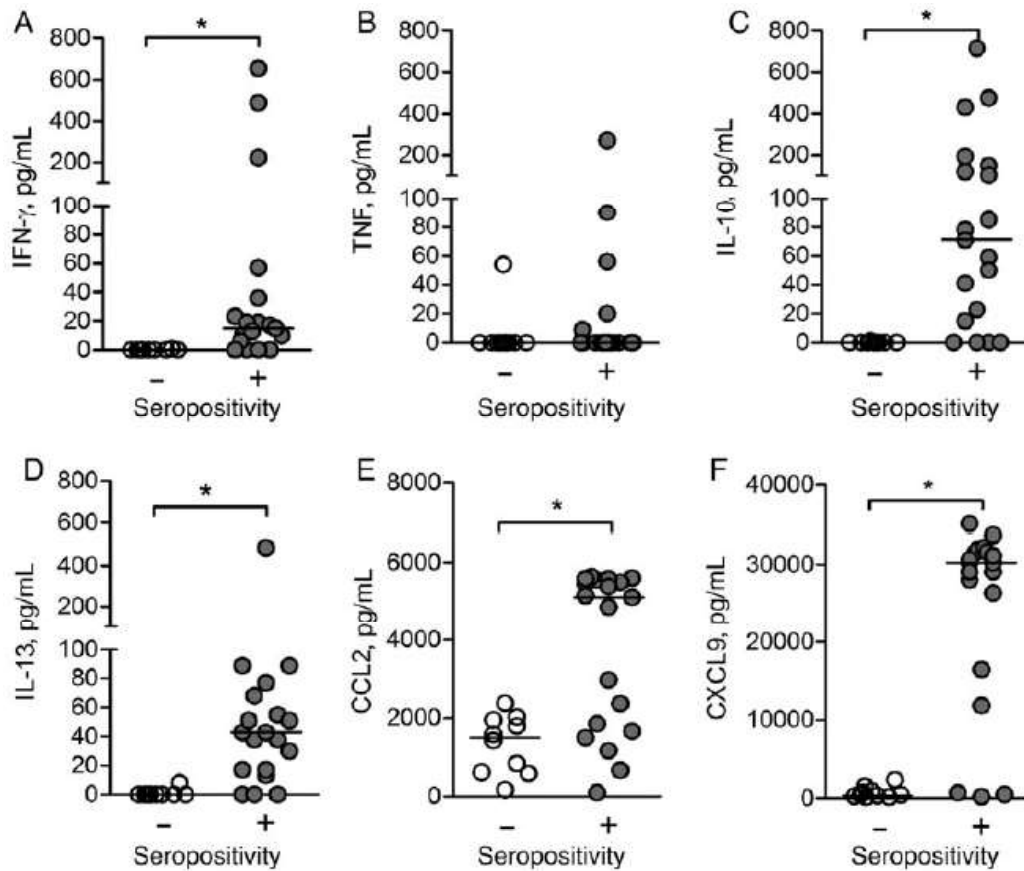


Figura 2. Resposta imune celular à saliva do *Lutzomyia intermedia* em área endêmica de leishmaniose tegumentar. Células mononucleares do sangue periférico de um grupo de residentes soronegativos (n = 10) (círculos brancos) ou soropositivos (n = 19) (círculos cinza) para saliva do vetor foram reestimuladas com saliva do *Lu. intermedia* (equivalente a 1,5 par) por 72 horas. Níveis de citocinas de interferon (IFN)  $\gamma$  (A), fator de necrose tumoral (TNF) (B), interleucina 10 (IL-10) (C), interleucina 13 (IL-13) (D), CCL2 (E) e CXCL9 (F) foi determinado por ensaio imunoenzimático. Linhas horizontais indicam níveis das medianas. \* P < 0,05

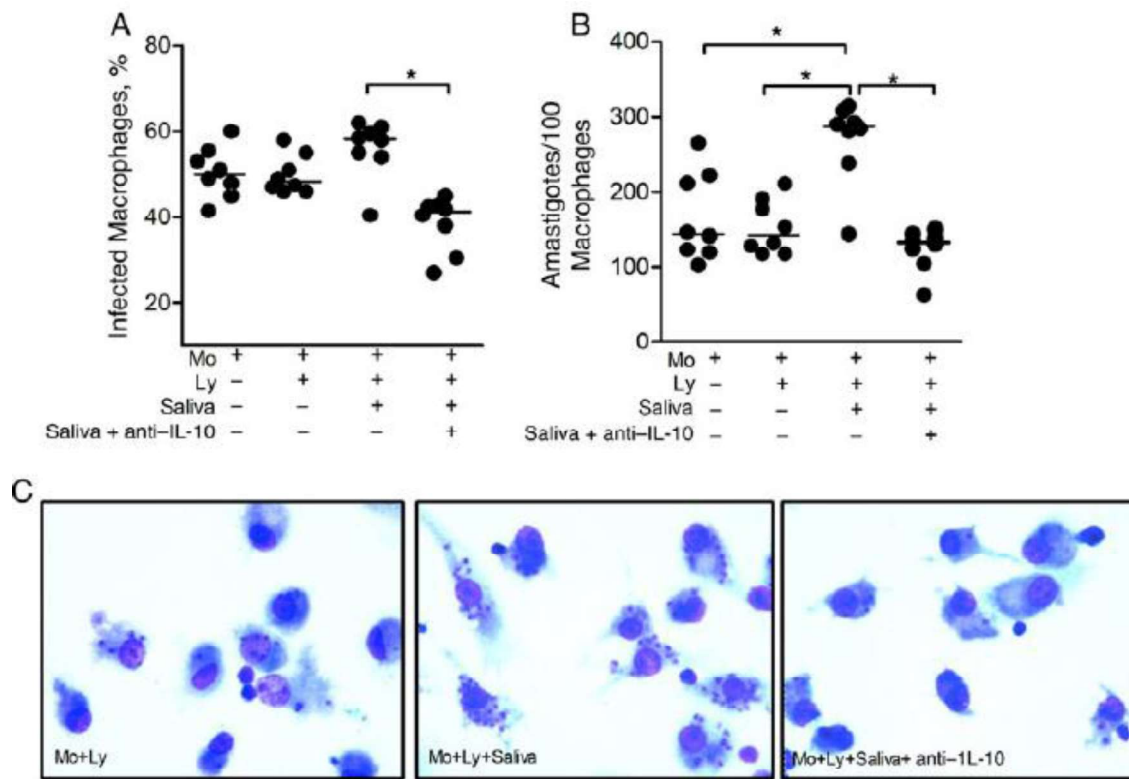


Figura 3. Taxa de infecção de macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis* após co-cultura com linfócitos autólogos e saliva do *Lutzomyia intermedia*. Macrófagos (Mo) de 8 indivíduos soropositivos à saliva *Lu. intermedia* foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis*. As células foram co-cultivadas apenas com linfócitos autólogos (Ly), com Ly e a saliva do *Lu. intermedia*, ou com Ly mais saliva e anti-interleucina 10 (IL-10). Após 72 horas, as lamínulas de vidro foram coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas por microscopia de luz para a porcentagem de macrófagos infectados (A) e para o número de amastigotas por 100 macrófagos (B). C, fotomicrografias representativas de culturas mostradas em A e B. Ampliação  $\times 40$ . Círculos representam valores individuais; linhas horizontais, as medianas. \*  $P < 0,05$ .

Name	Accession Number	Weight (kDa)	Comment
LinB-8	KA660054	14.06	SP15 family member
LinB-13	KA660053	28.4	Antigen 5-related
LinB-14	KA660066	17.65	C-type lectin
LinB-15	KA660065	16.38	C-type lectin
LinB-17	KA660055	33.5	Similar to Factor Xa inhibitor
LinB-21	KA660057	44	Yellow related-protein
LinB-26	KA660060	22.9	30-kDa Phlebotomine
LinB-28	KA660061	13.8	SP15 family member
LinB-37	KA660070	15.41	ML domain salivary peptide
LinB-38	KA660071	12.34	10-kDa family member
LinB-44	KA660075	10.53	10-kDa family member

Tabela 1. Painel das proteínas salivares recombinantes do *Lu. intermedia*.

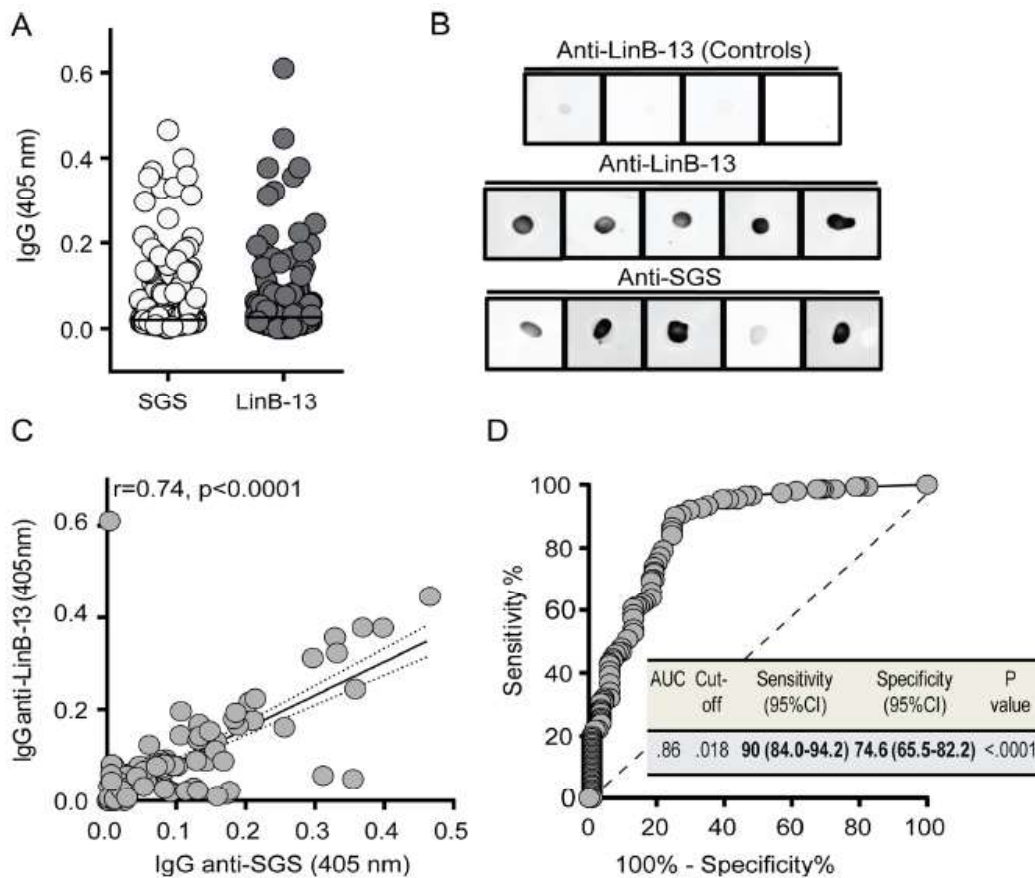


Figura 4. Validação da LinB-13 como um marcador de exposição ao vetor em uma área de transmissão de *L. braziliensis*. A, Resposta de IgG total contra a saliva do *Lu. intermedia* (SGS) e LinB-13 foi avaliada por ELISA em contatos domiciliares (n = 264) de pacientes com LC. Linhas pretas representam o valor das medianas da DO para cada antígeno. B, Análise de Dot blot contra o SGS do *Lu. intermedia* e LinB-13 usando amostras de soro de indivíduos com sorologia positiva para saliva e para LinB-13 (n = 5) e de controles com sorologia negativa (n = 4). C, Correlação de Spearman entre IgG anti-SGS do *Lu. intermedia* e IgG anti-LinB-13 nos mesmos indivíduos representados em (A). D, Curva ROC de anticorpos anti-LinB-13 predizendo a positividade para o SGS do *Lu. intermedia*.

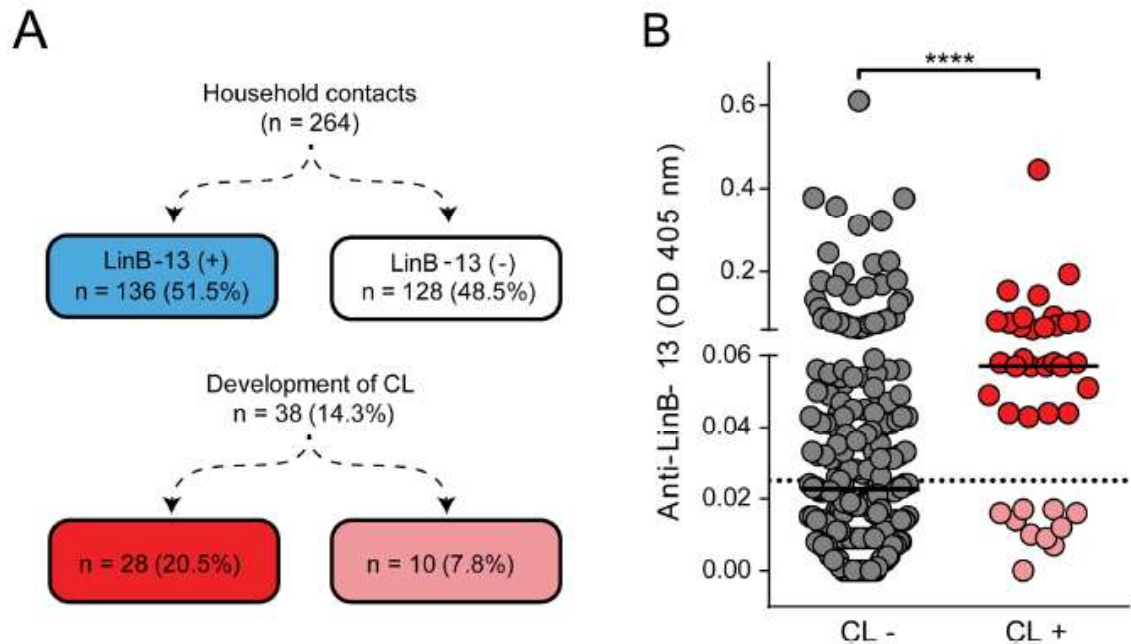


Figura 5. LinB-13 atua como fator de risco para o desenvolvimento de Leishmaniose Tegumentar. A, Fluxograma mostrando o número de contatos domiciliares de pacientes com LC que desenvolveram doença durante o período de 5 anos de acompanhamento, tanto em indivíduos soropositivos e soronegativos para LinB-13. B, Resposta de IgG total contra LinB-13 foi medida por ELISA em residentes de uma área endêmica de LC que desenvolveram leishmaniose (n = 38) ou que não desenvolveram LC (n = 226). Os dados são mostrados individualmente. As linhas pretas representam o valor das medianas da DO e a linha pontilhada representa o ponto de corte. (B). \*\*\*\* P <0,0001.



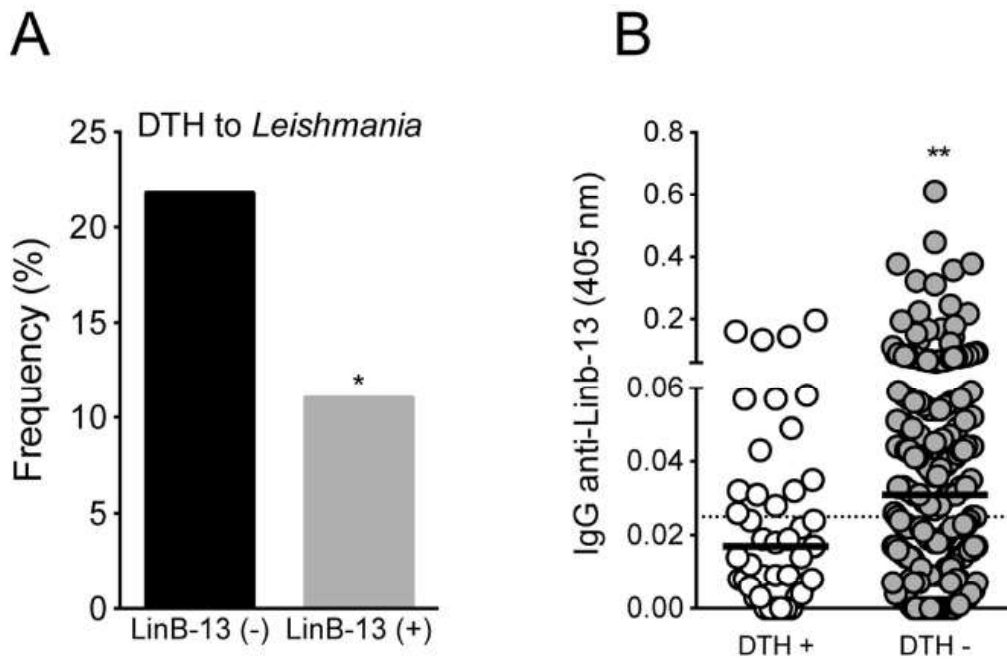


Figura 6. Resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* em indivíduos soropositivos para LinB-13. A, Frequência da reação de DTH em indivíduos com sorologia positiva ou negativa para LinB-13. B, A resposta de IgG total contra LinB-13 foi medida por ELISA em residentes de uma área endêmica de LC que apresentavam reação de DTH positiva (n = 43) ou negativa (n = 221) para *Leishmania*. Os dados são mostrados individualmente. Linhas pretas representam os valores das medianas de DO para cada grupo de indivíduos. \* P <0,05; \*\* P <0,01.