

Universidade Federal de Minas Gerais

Proteção contra a infecção por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* por imunização de
camundongos (BALB/c) com proteínas ribossomais de
Leishmania sp.

Miguel Angel Chávez Fumagalli

Orientador: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Co-orientador: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Belo Horizonte

Junho de 2012

Miguel Angel Chávez Fumagalli

Proteção contra a infecção por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* por imunização de
camundongos (BALB/c) com proteínas ribossomais de
Leishmania sp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da
Faculdade de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do título de
doutor em Medicina Molecular.

Belo Horizonte

2012

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão da Literatura	15
2.1. Aspectos gerais	15
2.2. A etiologia e o ciclo biológico do parasita	15
2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses	17
2.4. O diagnóstico, tratamento e controle da doença	18
2.5. Imunologia das leishmanioses.....	19
2.6. Resposta imune na infecção com <i>L. amazonensis</i>	20
2.7. Desenvolvimento de vacinas.....	21
2.8. Proteínas Ribossomais de <i>Leishmania</i> (LRPs)	22
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. Materiais e Métodos	27
4.1. Animais de experimentação	27
4.2. Parasitas.....	27
4.3. Preparação do extrato protéico solúvel de <i>Leishmania</i>	27
4.4. Purificação das LRPs de <i>L. infantum</i> (LiRPs) e LRPs de <i>L. amazonensis</i> (LaRPs).....	28
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
4.6. Esquema das imunizações	29
4.7. Infecção desafio	30

4.8.	Cultivo celular	30
4.9.	Dosagem de citocinas	31
4.10.	Dosagem de Óxido Nítrico	31
4.11.	ELISA para detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a	31
4.12.	Carga parasitária	32
4.13.	Análise estatística	32
5.	Resultados	33
5.1.	Resposta Imune Celular Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs Associadas à Saponina	33
5.2.	Resposta Humoral Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs Associadas à Saponina	35
5.3.	Avaliação da Proteção Conferida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs associadas a Saponina Após a Infecção Desafio com <i>L. amazonensis</i>	37
5.4.	Resposta Imune Celular Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. amazonensis</i>	41
5.5.	Resposta Humoral Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. amazonensis</i>	45
5.6.	Análise por eletroforese em gel de policrilamida das LRPs de <i>L. infantum</i> (LiRPs) e <i>L. amazonensis</i> (LaRPs)	47
5.7.	Avaliação da Proteção Conferida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LaRPs associadas a Saponina Após a Infecção Desafio com <i>L. amazonensis</i>	48
5.8.	Resposta Imune Celular Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações com LaRPs/saponina e a Infecção Desafio com <i>L. amazonensis</i>	51
6.	Discussão	54
7.	Conclusões.....	62
8.	Perspectivas.....	63
9.	Referências bibliográficas.....	64

10. Anexos.....	64
10.1. Certificado da aprovacao do projeto intitulado “<i>Proteinas ribossomais de Leishmania (LRPs) empregada no diagnostico laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina e no desenvolvimento de vacinas</i>” pelo comite de etica em expermientacao animal (CETEA/UFMG).	83
10.2. Artigo publicado na revista <i>Microbes and Infection</i> em 2010, intitulado “<i>Vaccination with the Leishmania infantum ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis challenge</i>”.	83

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i>	16
Figura 2: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina.....	34
Figura 3: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina.....	35
Figura 4: Análise da produção de IgG total, IgG1 e IgG2a pelos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina.....	36
Figura 5: Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas dos camundongos imunizados e desafiados camundongos imunizados e após a infecção desafio com <i>L. amazonensis</i> . O tamanho médio das lesões foi determinado por cerca de 10 semanas após o desafio.....	38
Figura 6: Avaliação da carga parasitária na pata infectada e baço dos camundongos imunizados e desafiados com <i>L. amazonensis</i>	39
Figura 7: Avaliação da produção de nitrito pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados com <i>L. amazonensis</i>	40
Figura 8: Análise da produção de IFN- γ , na presença de anticorpos anti-CD4 ⁺ , anti-CD8 ⁺ e anti-IL-12, pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....	43
Figura 9: Análise da produção de IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....	44
Figura 10: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....	45
Figura 11: Análise da produção IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LRPs pelos camundongos imunizados e desafiados.....	46

Figura 12: Fotodocumentação de Gel SDS-PAGE 10%, corado pelo Coomassie Brilliant Blue.....47

Figura 13: Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas dos camundongos imunizados e desafiados camundongos imunizados e após a infecção desafio com *L. amazonensis*.....49

Figura 14: Avaliação da carga parasitária na pata infectada e baço dos camundongos imunizados e desafiados com *L. amazonensis*..50

Figura 15: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....52

Figura 16: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....53

Lista de Abreviaturas

BSA	Soro albumina bovina
CO₂	Dióxido de Carbono
Con A	Concavalina A
DAT	Direct Antigen Test
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gramas
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina-2
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12R	Receptor da interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
KCl	Cloreto de potássio
KDa	kiloDáltons
L	Litro
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
LPG	Lipofosfoglicano
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar

N Normal
nm Nanometro
ng Nano grama
ODN CpG CpG oligodeoxynucleotideos
NaCl Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ Difosfato de sódio
NaHCO₃ Carbonato de sódio
OPD orto-fenilenodiamina
PBS Salina tamponada com fosfato
pH Potencial hidrogeniônico
RIFI Reação de imunofluorescência indireta
RPM Rotação por minuto
SLALA Extrato antigênico solúvel de *L. amazonensis*
Th1 Linfócito T helper tipo 1
Th2 Linfócito T helper tipo 2
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
SDS Dodecil sulfato de sódio
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários intracelulares da espécie *Leishmania* e endêmicas em 88 países no mundo. A aquisição de imunidade duradoura após a cura da infecção causada por *Leishmania major*, induzindo proteção contra a re-infecção pelo parasita, indica a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a doença. Neste trabalho, proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs) foram purificadas das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* e utilizadas como imunógenos vacinais, associadas à saponina, como adjuvante, em camundongos BALB/c para avaliar a eficácia de proteção induzida contra a infecção com *L. amazonensis*. Foi observado que as imunizações com LRPs/saponina foram capazes de induzir uma resposta imune celular do tipo Th1 antes do desafio, que foi primada pela produção de IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF e pela presença de anticorpos do isotipo IgG2a específicos às LRPs. Após a infecção desafio, observou-se uma redução significativa na carga parasitária nas patas infectadas, linfonodos drenantes e no baço dos animais imunizados, quando comparados aos grupos salina e saponina. A proteção contra a infecção foi associada à produção elevada de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF e baixa produção de IL-4 e IL-10; sendo a produção de IFN- γ ocorreu preferencialmente por linfócitos T CD4⁺ e foi amplamente dependente da presença de IL-12. Pode-se concluir que proteínas ribossomais são conservadas entre espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Tegumentar e Visceral, e que as mesmas são capazes de ofertar proteção heteróloga contra a infecção experimental por *Leishmania*; podendo-se constituir em bons candidatos para compor uma vacina pan-*Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, Vacinas, Proteínas Ribossomais de *Leishmania*, Proteção Heteróloga.

ABSTRACT

The leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the *Leishmania* species, and are endemic in 88 countries in the world. The acquisition of long-lasting immunity after cure of leishmaniasis caused by *L. major*, culminating in protecting against re-infection, indicate the possibility of developing a vaccine against the disease. In this study, *Leishmania* ribosomal proteins (LRPs) were purified from *L. infantum* and *L. amazonensis* and used as a vaccinal immunogen associated with the saponin adjuvant in BALB/c, in order to evaluate the efficacy of protection against challenge infection with *L. amazonensis*. It was observed that the immunization using LRPs/saponin was able to induce a Th1 cellular response before challenge, that was primed by high production of IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF and by the presence of specific-LRPs IgG2a antibodies. After challenge, it was observed a significant reduction in the parasite burden in the infected footpad, draining lymph nodes and spleen of the immunized animals, when compared to the saline and saponin groups. The protection was correlated to an IL-12-dependent production of IFN- γ by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In mice challenged with *L. amazonensis*, lower levels of anti-parasite specific antibodies were detected. Thus, it can be concluded that LRPs are conserved between different *Leishmania* species and that LRPs plus saponin fits the requirements to compose a pan-*Leishmania* vaccine.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, Vaccine, *Leishmania* Ribosomal Proteins, Heterologous Protection.

1. Introdução

As leishmanioses são doenças endêmicas em vários países do mundo. Estima-se que cerca de 380 milhões de pessoas encontram-se expostas aos riscos de infecção e que 12 milhões sejam clinicamente afetadas pela doença. Segundo levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1,5 a 2,0 milhões de novos casos ocorrem a cada ano, dos quais cerca de 1,0 a 1,5 milhões correspondam a casos de Leishmaniose Tegumentar e cerca de 500.000 casos de Leishmaniose Visceral (LV) são registrados (Desjeux, 1996; WHO, 2003). Dessa forma, a OMS, caracterizou as leishmanioses como uma das seis principais endemias no mundo (WHO, 2003). Ainda, nosso país é responsável por cerca de 90% dos casos registrados de LV no Continente Americano, fato que tornam as leishmanioses um importante problema de Saúde Pública e que requer, dessa forma, atenção especial por nossas autoridades competentes (Grimaldi & Tesh, 1993).

As formas clínicas mais comuns de leishmanioses causadas pela espécie *Leishmania amazonensis* são as leishmanioses cutânea e cutâneo-difusa (Garcez et al., 2002). Entretanto, Abreu-Silva et al. (2004), utilizando camundongos BALB/c experimentalmente infectados com essa espécie do parasita, demonstraram que o perfil da doença desenvolvida nos animais, por meio de achados parasitológicos, foi compatível com aquele encontrado na LV murina. Barral et al. (1991) também identificaram, por meio de análises genotípicas, essa espécie do parasita em 41 pacientes humanos diagnosticados com LV no Estado da Bahia, demonstrando assim a gravidade da doença que pode ser gerada por *L. amazonensis*.

Em modelos murinos, após a cura da leishmaniose cutânea causada por *L. major*, os animais adquirem imunidade contra a re-infecção. Tal fato tem estimulado experimentos visando o desenvolvimento de vacinas que possam atuar no controle mais efetivo da infecção (Scott et al., 1987; Reed & Campos-Neto, 2003). Preferencialmente, antígenos vacinais devem ser compartilhados por diferentes espécies do parasita e serem imunogênicos na maior parte delas, além da possibilitarem ofertar proteção cruzada contra outras espécies de *Leishmania* (Beyrodt, et al, 1997).

Em relação à resposta imune polarizada observada em leishmanioses, o modelo mais bem estudado até o presente momento envolve camundongos BALB/c e a espécie *L. major* (Wilson et al., 2005). A infecção progressiva é observada nos animais e caracterizada

pela expansão de linfócitos do tipo Th2 produtores de IL-4, IL-10 e IL-13. Ao contrário, a expansão de células do tipo Th1 em linhagens de camundongos resistentes, tais como o C3H, prima pela produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ que induzem ao fenótipo de cura da doença (Heinzel et al., 1991, Scott et al., 1988, Scott, 1993).

Na década de 50, formas vivas do parasita *L. major*, introduzidas em pequeno número e em regiões não-expostas do corpo, foram administradas em indivíduos com o intuito de que os mesmos desenvolvessem uma lesão cutânea única no local da injeção, que apresentasse cura espontânea e ofertasse proteção duradoura contra a re-infecção (Khamesipour et al. 2005). Tal técnica, denominada de Leishmanização, deixou de ser recomendada pela OMS após a verificação de que uma porcentagem significativa dos indivíduos infectados não apresentava cura espontânea e necessitava de tratamento médico (Ghalib & Modabber, 2007).

Posteriormente, formas vivas atenuadas, extratos brutos, semi-purificados e/ou purificados e, mais atualmente, com o avanço das técnicas biomédicas, as proteínas recombinantes, os plasmídeos de DNA e peptídeos sintéticos, vêm sendo estudados na tentativa de se desenvolver uma vacina contra as leishmanioses (Button & McMaster, 1988; Fernandes et al., 1997; Sjölander et al., 1998; Stager et al., 2000; Rafati et al., 2001; Fragaki et al., 2001; Oliveira da Silva et al., 2001; Coelho et al., 2003; Aguilar Be et al., 2005; Tewary et al., 2006; García et al., 2005; Khoshgoo et al., 2008; Ahmed et al., 2009).

Paralelamente, na leishmaniose visceral canina (LVC), a resposta imune do cão é baseada, principalmente, na produção de níveis elevados de anticorpos específicos ao parasita, a maioria dos quais são produzidos frente a proteínas conservadas de *Leishmania*, das quais destacam-se as proteínas de choque térmico (HSP) (MacFarlane et al., 1990), tubulinas (Paterakie et al., 1983) e histonas (Soto et al., 1992). Tais proteínas desempenham importantes funções durante a infecção no hospedeiro mamífero e, particularmente, no desenvolvimento da doença exercendo, dessa forma, um papel fundamental frente ao sistema imune do animal (Soto et al., 1993).

Soto et al. (1993) caracterizaram proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs) como proteínas capazes de direcionar a resposta imune do animal infectado induzindo à produção de níveis significativos de anticorpos específicos frente as mesmas. Tais proteínas são altamente conservadas entre as diferentes espécies de *Leishmania* e, funcionalmente,

participam da regulação da síntese protéica pelo parasita. Em eucariotos, as LRPs compreendem três grupos de proteínas: P0, P1 e P2; nas quais os grupos P1 e P2 formam homodímeros e são ligados nos ribossomos através da P0.

A utilização de amostras de soro de cães com LV infectados pela espécie *L. infantum* permitiu caracterizar a importância antigênica das LRPs durante a doença ativa, uma vez que níveis elevados de anticorpos específicos às mesmas foram encontrados nos animais doentes (Soto et al., 1993, Coelho et al., 2010).

Paralelamente, a administração de algumas LRPs associadas a adjuvantes de resposta imune Th1 foi capaz de induzir uma resposta imune protetora quando empregada em modelos murinos. Nesse sentido, a imunização de camundongos BALB/c com a proteína P0 de *L. infantum*, administrada sob a forma de proteína recombinante associada aos CpG-ODNs ou na forma de plasmídeos de DNA, foi capaz de induzir proteção heteróloga nos animais contra a infecção com *L. major* (Iborra et al., 2003; Iborra et al., 2005). Em paralelo, quando o extrato das LRPs, purificadas de *L. infantum*, foi utilizado como imunógeno vacinal em camundongos BALB/c, observou-se que as mesmas foram também capazes de induzir proteção contra a infecção causada por *L. major* (Ramirez et al., 2010; Iborra et al., 2008).

No presente trabalho, LRPs obtidas de *L. infantum* (LiRPs) foram utilizadas como antígenos vacinais em protocolos de imunização de camundongos BALB/c, contra a infecção experimental com *L. amazonensis*. Paralelamente, as LRPs de *L. amazonensis* (LaRPs) foram purificadas e também utilizadas como antígenos vacinais em protocolos de imunização de camundongos BALB/c, contra a infecção experimental com *L. amazonensis*, no intuito de se comparar a proteção, por ventura obtida, utilizando as diferentes LRPs, contra essa importante espécie causadora de leishmanioses em nosso país.

2. Revisão da Literatura

2.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. São consideradas endêmicas em 88 países, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil, Continente Africano e na Índia. Cerca de 380 milhões de pessoas estão expostas aos riscos da infecção pelo parasita e estimam-se que ocorram 2 milhões de novos casos a cada ano (WHO, 2006). O gênero *Leishmania* abrange 30 espécies do parasita e cerca de 20 são patogênicas ao homem e cão (Cupolillo *et al.*, 2000).

2.2. A etiologia e o ciclo biológico do parasita

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família *Phlebotominae*, pertencente aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas, sendo que apenas a fêmea tem hábitos hematófagos e é capaz de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero (Grimaldi & Tesh, 1993).

A transmissão do parasita *Leishmania* ocorre após a picada do vetor flebótomo, quando o vetor pode ingerir, junto com o sangue do hospedeiro mamífero, células parasitadas por formas amastigotas do parasita. As células infectadas podem se romper no intestino do vetor liberando os parasitas que, rapidamente, transformam-se em formas promastigotas procíclicas. Essas se multiplicam no trato digestivo médio e anterior do vetor e assumem a forma de paramastigotas, que se aderem ao epitélio do esôfago e faringe pelos hemidesmossomas. Ao se soltarem do epitélio, evoluem para formas promastigotas metacíclicas, formas altamente infectivas. Tais formas são móveis, ágeis e se dirigem para a parte anterior do aparelho bucal, onde se aderem, sendo essa a forma infectante do parasita

para o hospedeiro mamífero. Quando o vetor, agora infectado, realiza novo repasto sanguíneo, este pode inocular formas promastigotas metacíclicas junto com sua saliva. Após a entrada das formas promastigotas nas células do sistema fagocítico-mononuclear, dentre as quais se destacam os macrófagos; o parasita perde seu flagelo no vacúolo parasitóforo e converte-se nas formas amastigotas, que passam a se multiplicar no interior do vacúolo. As multiplicações sucessivas podem resultar no rompimento da célula e, conseqüentemente, a liberação dos parasitas, que podem ser fagocitados por novas células, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero (Pessoa & Martins, 1988; Medeiros et al., 2005).

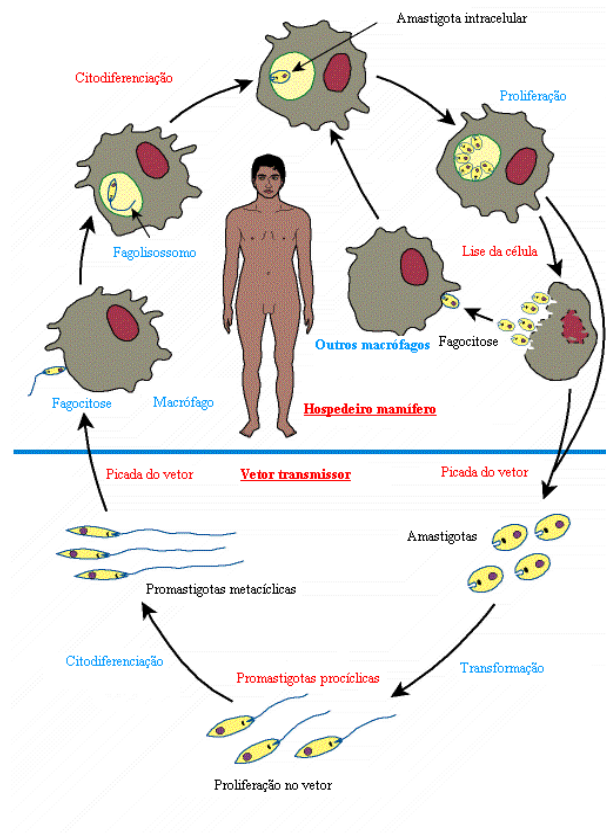


Figura 1: Ciclo biológico do parasita *Leishmania*. As formas promastigotas do parasita são transmitidas para o hospedeiro mamífero após a picada de um vetor flebotomíneo infectado. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitas podem ser fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear e transformar-se em formas amastigotas, que se multiplicam e podem levar ao rompimento da célula infectada e posterior disseminação, infectando outras células. O vetor é infectado ao realizar o repasto sanguíneo neste hospedeiro e ingerir alíquota de sangue contendo células parasitadas, que poderão liberar os parasitas e os mesmos se multiplicar no trato alimentar do vetor. Adaptado de Handman (2001).

2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses

A evolução clínica das leishmanioses é determinada, principalmente, pela espécie infectante do parasita, pelas características genéticas e pela imunidade inata do hospedeiro mamífero (Hommel et al., 1995).

As leishmanioses podem ser classificadas em duas grandes categorias clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT), que compreende as formas cutâneas, muco-cutânea e cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral (LV) (Kane & Mosser, 2000).

A leishmaniose cutânea (LC), a forma clínica mais comum da doença, caracteriza-se pela presença de uma lesão única nos pacientes. Normalmente, é causada por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis* nas Américas e por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* em países do Velho Mundo (Ashford, 2000).

Na leishmaniose muco-cutânea (LMC), uma forma clínica debilitante de leishmaniose, há ocorrência de lesões no nariz, na boca e garganta, que podem evoluir a lesões desfigurantes. Espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* podem causar essa forma da doença (Weigle & Saravia, 1996).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), uma forma anérgica e não-ulcerativa da doença, caracteriza-se pela presença de lesões disseminadas em diversas regiões do corpo, sendo associada a uma fraca resposta imune celular pelo paciente. As lesões podem tornar-se crônicas, debilitando o paciente. É, normalmente, causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. amazonensis* (Grimaldi & Tesh, 1993).

A LV, uma forma clínica de leishmaniose que acomete as vísceras do paciente e é, invariavelmente, fatal, quando não tratada; é causada pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (Roberts et al., 2000). Vale ressaltar que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* são consideradas genotipicamente idênticas (Maurício et al., 2000).

As formas clínicas mais comuns de leishmanioses causadas por *L. amazonensis* são a LC e LCD (Garcez et al., 2002). Abreu-Silva et al. (2004) demonstraram que camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. amazonensis* desenvolveram manifestações patológicas similares às encontradas na LV. Caso similar foi também descrito por Barral et al. (1991) em pacientes humanos com LV, no estado da Bahia, onde

estudo de genotipagem revelaram que 41 indivíduos acometidos pela doença estavam infectados por *L. amazonensis*, demonstrando assim a gravidade da doença que pode ser gerada por tal espécie de *Leishmania*.

2.4.0 diagnóstico, tratamento e controle da doença

O diagnóstico inicial da LT é realizado pela avaliação de parâmetros clínicos e epidemiológicos, porém, para um diagnóstico definitivo, há a necessidade da realização de exames parasitológicos, que visam a identificação da espécie infectante. Análises microscópicas de aspirados de lesões ou de cortes histológicos em lâminas, a inoculação de aspirados de tecidos infectados em hamsters e a cultura de fragmentos de tecidos são os métodos mais utilizados (Tavares et al., 2003).

O diagnóstico da LV é dificultado pela semelhança dos sintomas clínicos com outras doenças de incidência mais comum, como a malária e tuberculose (Rees & Kager, 1987; Kemp, 1997). O diagnóstico inicial é baseado na detecção de anticorpos específicos aos antígenos do parasita nas amostras de soro dos pacientes (Tavares et al., 2003). Nestes casos, a Análise de Imunoadsorção por Ligação Enzimática (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) são utilizados, porém, não apresentam a capacidade de diferenciar pacientes com a doença assintomática, na sua forma ativa ou já curada (Harith *et al.*, 1986). Testes parasitológicos, através da cultura de aspirados do baço e da medula óssea, são utilizados para o diagnóstico definitivo, embora se apresentem como métodos invasivos. Outros testes, como a reação de imunofluorescência (RIFI), o Western-Blotting e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são também utilizados (Manson-Bahr, 1987; Reed, 1996).

O tratamento clínico das leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes nas formas mais graves de LT. A aplicação de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais, o Estibogluconato de sódio (Pentostam[®], Glaxo Wellcome, Inglaterra) e o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime[®], Rhône Poulenc Rorer, França) é o método mais utilizado no tratamento (Franke et al., 1990). O uso desses fármacos, porém, pode provocar efeitos colaterais graves nos pacientes. Altas doses diárias, necessárias no curso do tratamento, podem causar fadiga, artralgias, mialgias, além de toxicidade renal, hepática e

cardíaca. Há, também, a dificuldade de transporte dos pacientes, normalmente residentes em áreas rurais até os centros mais especializados de Saúde, além do custo elevado dos fármacos, nem sempre custeados pelos pacientes, uma vez que esses, geralmente, possuem baixo poder aquisitivo (Grogl et al., 1991; Carvalho et al., 2002).

Pelas dificuldades inerentes ao tratamento das leishmanioses, pelo aumento do número de casos de resistência do parasita e de recidivas à doença; o controle da transmissão do parasita pode constituir-se em uma alternativa importante. Tal controle, porém, é uma tarefa difícil devido à grande variedade de espécies do parasita, além disso, as leishmanioses apresentam-se como uma doença zoonótica que é mantida, em sua grande maioria, em ciclos naturais envolvendo vetores e reservatórios silvestres. Há, também, a capacidade de adaptação do parasita que, mesmo na ausência de seu reservatório natural, pode sobreviver em outros hospedeiros encontrados em seu habitat (Kamhawi, 2000; Desjeux et al., 2004).

2.5. Imunologia das leishmanioses

A resistência à infecção contra *Leishmania* parece estar relacionada à imunidade celular, representada pela produção de IFN- γ , nos hospedeiros mamíferos (Scott, 2003).

A importância do desenvolvimento de linfócitos T (LT) CD4⁺ do tipo Th1 e linfócitos T CD8⁺ no balanço entre as linhagens celulares Th1/Th2 foi demonstrada em modelos murinos infectados com *L. major* (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Os estudos demonstraram a associação entre a resistência à infecção por *L. major* e o desenvolvimento de uma resposta Th1, caracterizada pela produção de citocinas como IFN- γ e IL-12. Já a susceptibilidade à infecção parece ser devido ao desenvolvimento de uma resposta Th2, mediada pela produção de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13. Em camundongos resistentes à infecção por *L. major*, células dendríticas produtoras de IL-12 migram rapidamente para o local da infecção. As células têm a capacidade de interagir com o parasita nos linfonodos drenantes e com LT Th1 que expressam o receptor funcional de IL-12 (IL-12R) (Scott, 2003).

Algumas linhagens de camundongos, como C57BL/6, C57BL/10, C3H e CBA, são resistentes à infecção por *L. major*, mesmo quando um grande número de parasitas (10⁷) é

inoculado pela via subcutânea nos animais; enquanto outras linhagens, como BALB/c e SWR/J, apresentam um perfil de susceptibilidade. Camundongos BALB/c são utilizados como modelo de infecção para o estudo de candidatos vacinais contra algumas espécies de *Leishmania*, como *L. chagasi*, *L. major* e *L. amazonensis* (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Wilson et al., 2005).

2.6. Resposta imune na infecção com *L. amazonensis*

Diferenças no desenvolvimento clínico da doença causada por *L. major* ou *L. amazonensis* sugerem que diferentes aspectos da resposta imune podem estar envolvidos nas infecções por tais espécies. Nesse sentido, os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade e patogênese da infecção por *L. amazonensis* ainda não estão completamente elucidados (Soong et al., 1997; Campbell et al., 2004).

A fim de identificar o grau de envolvimento da resposta celular à *L. amazonensis*, Soong et al. (1997) demonstraram que a ativação de LT CD4+, além de facilitar o recrutamento de células para o sítio de infecção, foi essencial para a patogênese verificada em modelos murinos. Tais células foram capazes de produzir citocinas que regulam o recrutamento local de linfócitos e, uma vez que a multiplicação de *Leishmania* sp. ocorre preferencialmente em macrófagos imaturos, tal estratégia poderia beneficiar o parasita, em detrimento do hospedeiro (Soong et al., 1997).

A susceptibilidade à infecção com *L. amazonensis* tem sido associada à produção de baixos níveis de IFN- γ (Afonso & Scott, 1993). Entretanto, a inoperância dos mecanismos efetores, com prejuízo para a ativação de macrófagos, conduz à progressão da doença nos hospedeiros infectados com tal espécie do parasita. Aparentemente, as populações de LT CD4+ e CD8+ não são ativadas, sugerindo que possa estar ocorrendo uma evasão da resposta imune do hospedeiro (Ji et al., 2002). Assim, estudos envolvendo a infecção com *L. amazonensis* sugerem que a doença progressiva, verificada no modelo murino, seja devido à falha na indução inicial da produção de citocinas e quimiocinas com perfil de proteção, ou seja, importantes para o desenvolvimento da resposta Th1; o que acaba por conduzir a um estado de inoperância do sistema imune do animal frente ao parasita (Ji et al., 2002).

Camundongos C57BL/10, embora resistentes à infecção com *L. major*, são susceptíveis à infecção com *L. amazonensis*. O perfil de susceptibilidade é similar ao perfil desenvolvido em camundongos BALB/c, nos quais o desenvolvimento da resposta Th2 não parece ser essencial ao fenótipo de susceptibilidade ao parasita. A ausência da expressão de IL-10, verificada em camundongos *knockout* para esta citocina, aparentemente não influencia na resolução das lesões crônicas, uma vez que não é suficiente para aumentar a produção de IFN- γ . Esses resultados sugerem que, durante a infecção com *L. amazonensis*, mecanismos alternativos à produção de IL-10 sejam desencadeados e capazes de limitar a produção de IFN- γ (Jones et al., 2002).

2.7.Desenvolvimento de vacinas

Ao longo das últimas décadas, preparações vacinais diversas têm sido propostas e estudos têm sido conduzidos com a finalidade de se desenvolver uma vacina que apresente resultados satisfatórios na proteção contra *Leishmania*. As preparações testadas cronologicamente incluem desde formas promastigotas mortas pelo calor ou por fenol, associadas a diferentes adjuvantes; passando por promastigotas vivos atenuados ou irradiados (Handman, 2001); antígenos semi-purificados ou purificados sob a forma de proteínas nativas ou recombinantes (Wilson et al., 1995; Paraguai-de-Souza et al., 2001; Coelho et al., 2003; Zanin et al., 2007); vetores de expressão em eucariotos (plasmídeos de DNA); sistemas de expressão de imunógenos em bactérias e vírus e utilização de peptídeos sintéticos (Méndez et al., 2001; Gonzalo et al., 2001; Ramiro et al., 2003; Sukumaran et al., 2003; Aguilar-Be et al., 2005; Marques-Da-Silva et al., 2005).

Um antígeno candidato à vacina deve, preferencialmente, ser compartilhado por diferentes espécies do parasita, ser imunogênico contra a maioria dessas espécies e não interferir na imunogenicidade induzida por outros antígenos (Beyrodt, et al, 1997).

A escolha de um antígeno para utilização em uma vacina é regida, principalmente, pela imunogenicidade da proteína e dos epitopos que a constituem, podendo servir ou não como fatores protetores ou, ao contrário, ser um mecanismo para evadir à resposta imune do hospedeiro. O desenvolvimento de vacinas recombinantes (proteína purificada ou plasmídeo de DNA), ou mesmo vacinas contendo peptídeos sintéticos; apresenta a

vantagem de permitir a utilização de epitopos determinados e caracterizados, uma vez que é possível modificar tais moléculas e evitar os inconvenientes de epitopos não necessários ao desenvolvimento de proteção contra o parasita; como mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-ímmunes (Handman, 2001; Skeiky et al., 2002).

Dentre os antígenos candidatos à vacina e extensivamente estudados, citam-se as glicoproteína (gp) de 63 kiloDáltons (kDa) (gp63), gp46 ou antígeno de superfície do parasita 2 (PSA-2), proteína homóloga a receptores da proteína-cinase C em *Leishmania* (LACK), antígenos amastigota-específicos como A2, P4 e P8; o antígeno flagelar de *L. chagasi* 1 (LCR1), ligante fucose–manose (FML), bem como as frações protéicas constituintes da Leishvacin[®] (proteínas de peso molecular variando de 42 a 160 KDa) (Xu & Liew, 1995; Julia et al., 1999; Ghosh et al., 2001; Paraguai-de-Souza et al., 1994; Cardoso et al., 2003).

A obtenção e purificação destes antígenos, bem como a caracterização da resposta imune induzida por eles, constituem o objeto de diversos estudos. Antígenos recombinantes têm sido avaliados através de diferentes protocolos e preenchem parcialmente os requisitos para serem empregados como vacinas contra as leishmanioses. Alguns desses antígenos já foram testados, inclusive sob a forma de vacinas de DNA (Xu & Liew, 1995; Gurnathan et al., 1997; Campbell et al., 2003; Ahmed et al., 2004; Sukumaran & Madhubala, 2004; Aguilar-Be et al., 2005).

2.8. Proteínas Ribossomais de *Leishmania* (LRPs)

Evidências sugerem que proteínas ribossomais de *Leishmania* são moléculas imunologicamente relevantes durante a infecção ativa por esse protozoário. Na infecção com *L. infantum*, níveis elevados de anticorpos específicos a proteínas conservadas de *Leishmania* são encontrados, dentre as quais destacam-se a proteína de choque térmico de 70 KDa (hsp70), H2A e proteínas ácidas ribossomais (Requena et al., 2000).

Por meio de “screening” realizado em uma biblioteca de cDNA de *L. infantum*, clones com elevada similaridade para com os genes codificadores de proteínas ácidas

ribossomais foram identificados e chamados de proteínas “P” (Soto et al, 1993). Os clones identificados foram denominados de LiP e LiP’ e, posteriormente, re-classificados como LiP2a e LiP2b, devido à sua elevada similaridade com a proteína P2 de eucariotos (Soto et al., 1995).

Ribossomos eucarióticos possuem, aproximadamente, 70 proteínas sendo que 30 delas estão presentes na sub-unidade menor e 40 na sub-unidade maior. As proteínas da sub-unidade maior são divididas em 7 grupos (A60, B60, C60, D60, E60, F60 e G60) (Tsurugi et al., 1976). Já as da sub-unidade menor são divididas em 5 grupos (A40, B40, C40, D40 e E40) (Collatz et al., 1977). Proteínas ácidas ribossomais encontram-se no grupo A60 e localizam-se em uma protuberância lateral dos ribossomos (Tsurugi et al., 1978). São caracterizadas por um baixo ponto isoelétrico e, por isso, são chamadas de proteínas ácidas, sendo fosforiladas por proteínas cinases, e denominadas proteínas “P”. As proteínas “P” formam um complexo pentamérico composto por duas unidades P1, duas P2 e uma P0 (Tchórzewski, 2002).

A partir da identificação das proteínas “P” de *Leishmania*, as mesmas foram avaliadas quanto a sua possível utilização para o diagnóstico e/ou vacinas contra as leishmanioses.

Por meio do mapeamento de epítopos da proteína P2, foi demonstrado que seu reconhecimento por anticorpos presentes no soro de cães com LV não ocorre na região do C-terminal conservada e, assim, não demonstra reatividade cruzada com proteínas P2 de *Trypanosoma cruzi*; da P2 no lúpus ou da P2 humana, que reconhecem a região C-terminal (Soto et al, 1995), dessa forma, demonstram o potencial de tal proteína para o diagnóstico da LV. Avaliando-se a imunogenicidade da P2, foi verificado que a imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante P2, denominada de “LiP2a”, foi capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral que foi capaz de proteger os animais contra a infecção desafio (Soto et al., 2000).

Paralelamente, a proteína P0 de *L. infantum* foi clonada e caracterizada, apresentando uma região C-terminal com pouca similaridade em relação às proteínas de outros eucariotos (Soto et al., 1993). O mapeamento de epítopos mostrou que o determinante antigênico dessa proteína é uma região próxima à porção C-terminal (Soto, et al, 1995b). A administração da proteína LiP0 como vacina de DNA foi capaz de induzir

proteção parcial em camundongos BALB/c contra o desafio com *L. major*. Houve uma redução no tamanho da lesão e na carga parasitária na pata e nos linfonodos drenantes dos animais. A proteção foi relacionada à produção de IFN- γ , principalmente, por linfócitos T CD4⁺ (Iborra, et al, 2003). A mesma proteína, sob a forma recombinante e administrada junto a oligodeoxinucleotídeos ODN-CpGs, como adjuvantes de resposta Th1, foi capaz de induzir proteção em camundongos C57BL/6 contra o desafio com *L. major*, proteção essa correlacionada com a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e foi IL-12-dependente.

A co-administração do complexo formado pelas LRPs de *L. major*, quando associado ao adjuvante ODN-CpGs, induziu proteção em dois modelos experimentais de LT, tanto utilizando uma quantidade elevada de parasitas inoculados na pata de camundongos BALB/c pela via subcutânea, quanto com uma baixa dose de parasitas inoculados na orelha de camundongos C57BL/6 e por via intradérmica. Em ambos os casos, houve proteção nos animais imunizados contra a infecção por *L. major* (Iborra, et al, 2008).

As LRPs provenientes de *L. infantum* foram recentemente avaliadas para o diagnóstico sorológico de LV canina (LVC) causada pelas espécies *L. infantum* e *L. chagasi*. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados mostraram que tanto as LRPs quanto o extrato protéico solúvel (SLA) dos parasitas apresentaram sensibilidade similar para cães com LV sintomática, entretanto, para a detecção dos casos de animais com LV assintomática, as LRPs mostraram melhor sensibilidade, além de maior especificidade quando os soros de cães com outras parasitoses foram incluídos nas análises individuais (Coelho et al., 2009).

Desta forma, neste trabalho, LRPs purificadas a partir de duas espécies distintas de *Leishmania*, *L. infantum* (LiRPs) e *L. amazonensis* (LaRPs), foram utilizadas como imunógenos vacinais em protocolos de imunização de camundongos BALB/c, contra a infecção experimental com *L. amazonensis*, com o objetivo de verificar, inicialmente, a eficácia protetora dos imunógenos, bem como comparar a eficácia de cada um dos modelos de antígenos vacinais utilizados para conferir proteção contra uma importante espécie causadora de amplo espectro clínico de leishmanioses, no caso, *L. amazonensis*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar os níveis de proteção induzidos em camundongos BALB/c imunizados com proteínas ribossomais purificadas de *L. infantum* (LiRPs) ou de *L. amazonensis* (LaRPs) contra a infecção experimental com *L. amazonensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Imunizar grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo) com as LiRPs associadas à saponina, como adjuvante, ou apenas com saponina. A inoculação de PBS será utilizada como controle da infecção.
- Avaliar a resposta imune celular e humoral geradas pela imunização com as LiRPs/saponina, por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10, e da detecção dos anticorpos e IgG total, IgG1 e IgG2a específicos às proteínas ribossomais e ao extrato dos parasitas.
- Realizar a infecção desafio dos camundongos com 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* pela via subcutânea.
- Avaliar a eficácia protetora das LiRPs por meio da avaliação semanal do desenvolvimento de lesões nas patas infectadas e da quantificação da carga parasitária na pata infectada, no baço e fígado dos animais imunizados e desafiados com *L. amazonensis*.
- Avaliar a resposta imune celular e humoral geradas após a infecção desafio por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10, e da

detecção dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos às proteínas ribossomais e ao extrato dos parasitas.

- Realizar a dosagem de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess.
- Avaliar o perfil protéico de expressão das proteínas ribossomais purificadas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- Imunizar grupos de camundongos BALB/c (n=8, por grupo) com LaRPs associadas à saponina, como adjuvante, ou apenas com saponina. A inoculação de PBS será utilizada como controle da infecção.
- Realizar a infecção desafio dos camundongos com 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* pela via subcutânea.
- Avaliar a eficácia protetora das LaRPs por meio da avaliação semanal do desenvolvimento de lesões nas patas infectadas e da quantificação da carga parasitária na pata infectada, no linfonodo poplíteo, no baço, no fígado e na medula óssea dos animais imunizados e desafiados.
- Avaliar a resposta imune celular desenvolvida após a infecção desafio por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com cerca de 6 a 8 semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC/UFMG, sob as devidas condições de manejo. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG (Anexo).

4.2. Parasitas

As amostras IFLA/BR/1967/PH-8 de *Leishmania amazonensis* e MCAN/ES/1996/BCN/150/MON-1 de *L. infantum* foram utilizadas. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 24°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados quando encontravam-se na fase logarítmica de crescimento.

4.3. Preparação do extrato protéico solúvel de *Leishmania*

O extrato protéico solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento dos parasitas, cultivadas em meio de Schneider's completo. Para tal, uma cultura com 10^8 parasitas/mL foi centrifugada por 15 min e a 5000 rpm, a 4°C. O pellet foi ressuscitado em 5 mL de PBS 1x e centrifugado a 5000 rpm por 10 min e a 4°C. O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuscitado em 5 mL de PBS 1x e submetido a um processo de choque térmico por 6 vezes. Em seguida, o lisado foi

sonicado em 6 ciclos de 30 seg, com intervalos de 30 seg e amplitude de 38 MHz. O produto foi, então, centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min e o sobrenadante, que corresponde ao SLA, foi retirado, dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e armazenado a -80°C.

4.4.Purificação das LRPs de *L. infantum* (LiRPs) e LRPs de *L. amazonensis* (LaRPs)

Para a preparação das LRPs de *L. infantum* e *L. amazonensis*, os parasitas foram cultivados em meio de Schneider's completo, na temperatura de 24°C e utilizados em sua fase logarítmica de crescimento. As formas promastigotas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min e a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 5 mL de PBS 1x gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspenso em solução de lise, a qual foi constituída por tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 7.4, KCl 40 mM, MgCl₂ 25 mM, detergente NP40 10%, PMSF 0.1 M, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 0.5 mg/mL e β-mercaptoetanol.

Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 4.000 rpm por 2 min e a 4°C para sedimentar o núcleo. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 13.000 rpm por 15 min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi coletado e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi então centrifugado a 90.000 rpm por 1 h e a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 200 µL de tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 100 mM, AcNH₄ 0.5 M, PMSF 0.1 M, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 0.5 mg/mL e β-mercaptoetanol, utilizando uma seringa de vidro. O produto foi centrifugado a 90.000 rpm por 2 h a 4°C, em gradiente de sacarose 20-40% preparado no mesmo tampão citado anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet, no qual as LRPs estavam presentes, foi ressuspenso em 500 µL de PBS 1x, dosadas por Bradford e armazenado a -80°C.

As LiRPs utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Dr. Manuel Soto, do Departamento de Biologia Molecular, Universidade Autónoma de Madrid, Madrid, Espanha, colaborador deste projeto de pesquisa.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Um gel em concentração de 15% de acrilamida (Laemmli, 1970) foi preparado para a migração das LiRPs e das LaRPs na presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Utilizaram-se 10 µg, em cada canaleta, dos complexos protéicos. Estas amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)). A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/l e SDS 0,5% , pH 8.3), sob voltagem de 150 V. O gel foi retirado do aparato para eletroforese vertical e submerso por 30 min em solução corante de 0,5% Coomassie Brilliant Blue, que foi posteriormente descorado pela adição de uma solução descorante (ácido acético 5%, metanol 10 % e H₂O qsp).

4.6. Esquema das imunizações

Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo) foram imunizados por via subcutânea no coxim plantar esquerdo, com três doses e intervalos de 15 dias entre as mesmas. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo foi imunizado com 12 µg das LiRPs associados a 25 µg de saponina (*Quillaja saponaria*), como adjuvante, em um volume final de 20 µL; outro grupo foi imunizado com 25 µg de saponina em um volume final de 20 µL e o último grupo foi inoculado com 20 µL de PBS 1x.

Em novos experimentos, grupos de camundongos BALB/c (n=8, por grupo) foram imunizados por via subcutânea no coxim plantar esquerdo, com três doses e intervalos de 15 dias entre as mesmas. Os camundongos foram divididos em três grupos: um grupo foi imunizado com 12 µg das LaRPs associadas a 25 µg de saponina e em um volume final de 20 µL; outro grupo foi imunizado com 25 µg de saponina e o último grupo foi inoculado com 20 µL de PBS 1x.

4.7. Infecção desafio

A infecção desafio foi realizada 30 dias após a última dose da vacina. Para tal, foram utilizadas 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*. Os parasitas foram cultivados em meio Schneider's completo por cerca de 6 dias, a 24° C. Os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer e administrados no coxim plantar direito dos animais, em um volume final de 20 µl em PBS 1x.

Após o desafio, o desenvolvimento da lesão foi monitorado por meio de leituras semanais da espessura da pata infectada, comparando-se com os valores obtidos na pata não-infectada, de onde foi obtido o valor médio e o erro padrão dos grupos experimentais. A medição foi realizada com a utilização de um paquímetro (L.S. Starrett S.A., SP, Brasil).

4.8. Cultivo celular

Cerca de dez semanas após a infecção desafio, camundongos foram sacrificados para a avaliação da resposta celular e humoral induzidas. Para tal, o baço, fígado e amostras de sangue dos animais foram retirados de forma asséptica. O baço dos animais foi macerado em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), composto por 4,5 g/L de glicose, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomina, pH 7.4. O produto foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As hemácias foram lisadas com 3 mL de tampão de lise, constituído de Tris-HCl 17 mM pH 7.3 e cloreto de amônio 144 mM, durante 4 min. Foi então acrescentado meio DMEM, para um volume final de 10 mL para cessar a lise celular. O material foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 min e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então ressuscitado em 1 mL de DMEM completo (o qual foi constituído por 20% de soro fetal bovino inativado).

Para o cultivo dos esplenócitos, foram utilizadas placas de 24 pocos (Nunclon, Nunc), nas quais 1×10^6 células por/mL foram incubadas em meio DMEM completo. Os esplenócitos foram estimulados com as LiRPs ou LaRPs (12 µg), SLA (50 µg) ou com a concanavalina A (ConA, 5 µg), utilizada como controle positivo. Para controle negativo, as

células foram incubadas sem estímulo. A incubação foi feita a 37°C, com 5% de CO₂ por 48 h e, após esse período, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas.

Para avaliar a participação de LT CD4⁺ e CD8⁺ e a dependência de IL-12 na produção de IFN- γ , os esplenócitos estimulados com as LiRPs ou com o SLA foram também incubados na presença de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺.

4.9. Dosagem de citocinas

As citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram quantificadas por ELISA de captura nos sobrenadantes de cultura celular dos esplenócitos, utilizando-se kits específicos obtidos junto a Pharmingen®.

4.10. Dosagem de Óxido Nítrico

A detecção de óxido nítrico (NO) foi realizada pelo método de Griess. Em uma placa de 96 wells (Falcon), 100 μ L do reagente de Griess foram misturados com 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de esplenócitos. Após incubação de 10 min na temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540 nanômetros (nm) e comparada a uma curva-padrão.

4.11. ELISA para detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a

As amostras de soro coletadas dos animais imunizados e/ou desafiados foram utilizadas para avaliação da resposta humoral. Para tal, placas de 96 wells (Falcon) foram sensibilizadas com 2 μ g/well das LRPs em tampão “coating buffer” pH 9.6, “overnight” e a 4°C. Após 3 lavagens com PBS 1x/Tween 20 0.05%, as placas foram bloqueadas com 5% de caseína por 1 h e a 37°C. Soros dos camundongos diluídos 1:100 foram adicionados e a incubação ocorreu por 2 h e a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com os conjugados anti-IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo, todos marcados com a enzima peroxidase, diluídos a 1:5.000, por 1 h e a 37°C. As placas foram novamente lavadas por 7

vezes e incubadas com *orto*-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato pH 5.0 e H₂O₂ 30 vol, por 30 min e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a leitura feita em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 492 nm.

4.12. Carga parasitária

A avaliação da carga parasitária foi realizada pelo método da diluição limitante no baço, fígado, medula óssea, linfonodo poplíteo e num fragmento de tecido de lesão da pata infectada dos animais desafiados. A técnica consiste em determinar a maior diluição na qual parasitas vivos podem ser visualizados (Coelho et al., 2003). Para tal, fragmentos do baço e fígado foram retirados e pesados. Os materiais foram, então, macerados em meio de Schneider's completo e os produtos gerados foram serialmente diluídos em placas de 96 wells (Nunc). A incubação foi feita por 7 dias, a 24°C e a maior diluição na qual parasitas vivos podiam ser visualizados foi determinada pela visualização em um microscópio invertido.

4.13. Análise estatística

O *software* Prism 5.0 foi para graficar os resultados obtidos e para a realização das análises estatísticas. Os dados foram inicialmente submetidos à análise de normalidade de distribuição dos valores e, seguidamente estes foram comparados através do teste One-way ANOVA com o post-teste de Bonferroni, para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Resposta Imune Celular Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs Associadas à Saponina

A resposta imune celular induzida pelas imunizações dos animais, antes da infecção desafiada com *Leishmania*, foi avaliada pela quantificação das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, esses, estimulados com as LiRPs.

Na análise da *figura 2*, pode-se observar que os animais imunizados com LiRPs/Saponina produziram níveis significativamente elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, em comparação aos grupos controle (PBS e saponina). Nos grupos controle, os níveis encontrados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF foram reduzidos e não houve diferença significativa na produção dessas citocinas, na presença ou ausência dos estímulos.

A produção de IL-4 e IL-10 foi também avaliada nos sobrenadantes das culturas dos esplenócitos, sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre os 3 grupos, após a utilização dos estímulos (*figura 3*).

Na análise destes resultados, pode-se concluir que a imunização de camundongos BALB/c com as LiRPs associadas à saponina foi capaz de gerar uma resposta imune Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF após os estímulos com as LiRPs.

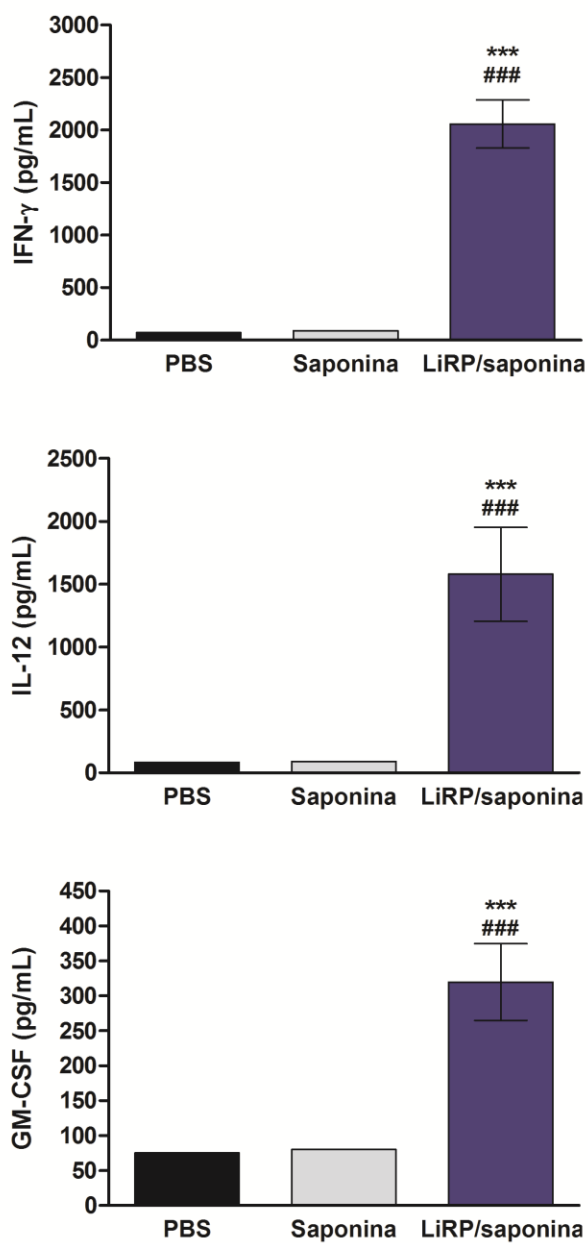


Figura 2: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os esplenócitos dos camundongos foram estimulados com 12 μ g de LiRPs e, posteriormente, incubados por 48 horas a 37°C e com 5% de CO₂. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

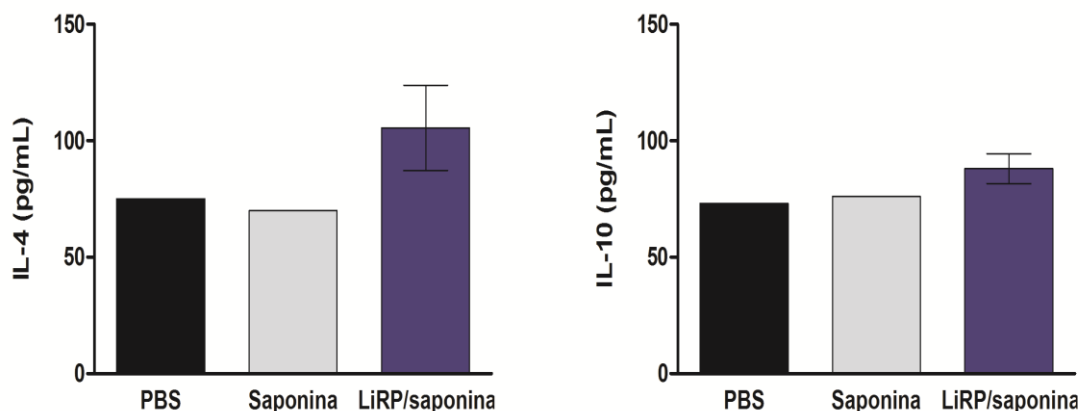


Figura 3: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os esplenócitos dos camundongos foram estimulados com 12 μ g de LiRPs e, posteriormente, incubados por 48 horas a 37°C e com 5% de CO₂. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRP/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

5.2. Resposta Humoral Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs Associadas à Saponina

Um indicativo da geração de uma resposta imune Th1 ou Th2, em camundongos BALB/c, diz respeito à produção dos isotipos IgG1 e IgG2a. Citocinas secretadas por células do sistema imune atuam sobre linfócitos B (LB) induzindo à mudança de isotipos dos anticorpos IgGs produzidos por tais células. Nesta linhagem de camundongo, a citocina IL-4 induz, preferencialmente, a produção de IgG1, enquanto que o IFN- γ induz à produção de IgG2a (Afonso & Scott, 1993). Dessa forma, a resposta humoral dos camundongos imunizados com as LiRPs associadas à saponina foi avaliada para a verificação do perfil de isotipos de IgGs gerados frente às LRPs.

Na análise da *figura 4*, pode-se observar que no grupo imunizado com as LiRP/Saponina a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LiRPs foi maior em relação aos grupos controle. Pode-se verificar também que a produção de IgG2a anti-LiRP foi

significativamente maior em relação aos níveis de IgG1 anti-LiRPs, nos animais imunizados.

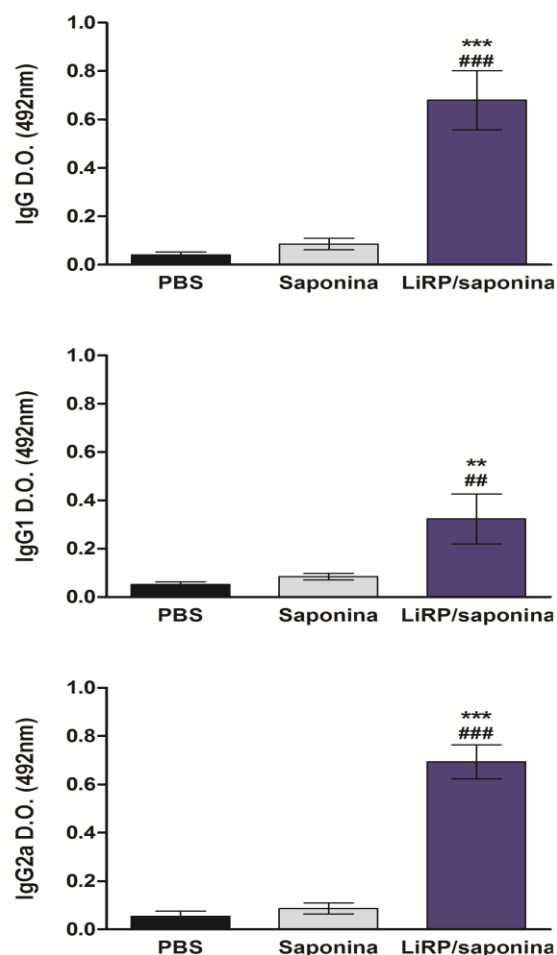


Figura 4: Análise da produção de IgG total, IgG1 e IgG2a pelos camundongos imunizados com LiRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os soros dos camundongos foram coletados e analisados para a produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LiRPs. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

5.3. Avaliação da Proteção Conferida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LiRPs associadas a Saponina Após a Infecção Desafio com *L. amazonensis*

Para avaliar a eficácia de proteção decorrente da imunização com LiRPs/Saponina, camundongos foram infectados pela via subcutânea com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*.

Na avaliação do desenvolvimento das lesões (**figura 5**), pode-se observar que os animais imunizados com as LiRPs/Saponina apresentaram redução significativa no tamanho dos edemas, a partir da 7^a semana após a infecção desafio, quando comparados aos grupos controles. Na avaliação da carga parasitária, realizada cerca de 10 semanas após a infecção, a pata infectada e o baço dos animais foram coletados e avaliados para detecção dos parasitas, por meio da técnica de diluição limitante (Coelho et al., 2003). Na análise dos resultados, pode-se observar que a carga de parasitas observada no baço e na lesão dos animais imunizados foi significativamente menor em relação aos grupos controle (**figuras 6A e 6B**).

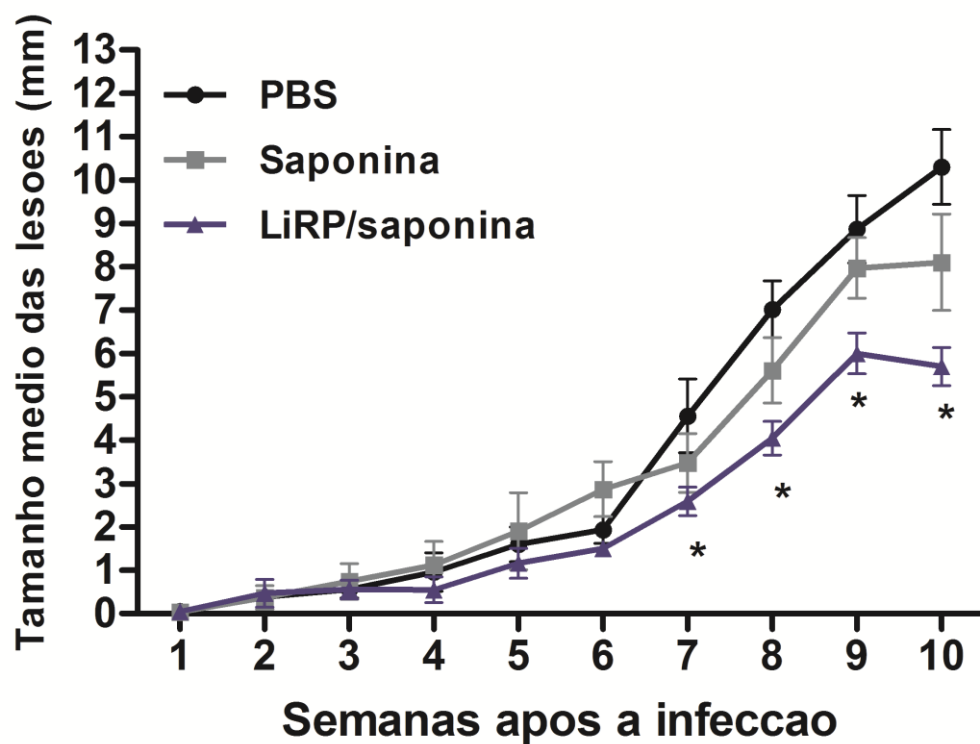


Figura 5: Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas dos camundongos imunizados e desafiados camundongos imunizados e após a infecção desafio com *L. amazonensis*. O tamanho médio das lesões foi determinado por cerca de 10 semanas após o desafio. Cada símbolo representa a média e o desvio padrão dos grupos. *indica $P < 0,005$ no grupo LiRPs/saponina, quando comparado aos grupos controle (PBS e saponina).

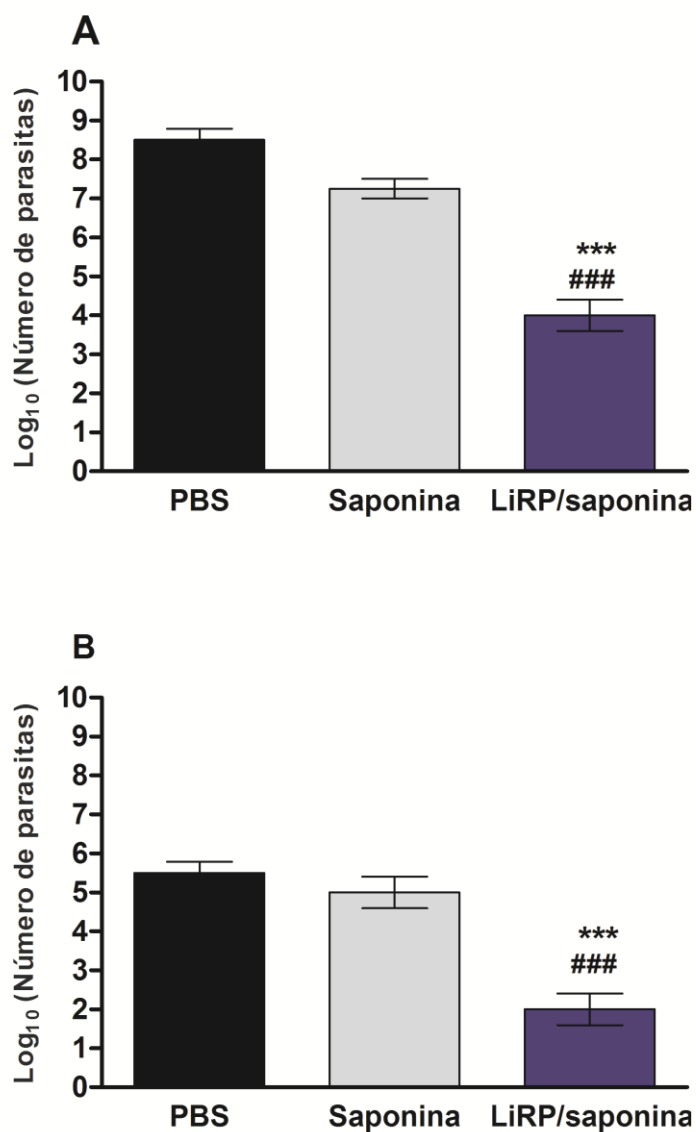


Figura 6: Avaliação da carga parasitária na pata infectada e baço dos camundongos imunizados e desafiados com *L. amazonensis*. Cerca de 30 dias após a última imunização, os camundongos foram infectados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* por via subcutânea. A carga parasitária nas patas infectadas (A) e no baço (B) dos animais foram avaliadas pelo método da diluição limitante. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

Paralelamente, a produção de NO pode indicar a ativação do mecanismo leishmanicida dos macrófagos e a posterior resolução da infecção. A produção de NO pode ser detectada através da liberação de nitrito (NO_2^-), que é um produto final oxidativo do NO. Neste trabalho, a produção de nitrito foi avaliada pelo método de Griess nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos dos animais imunizados com as LiRPs/Saponina e desafiados com *L. amazonensis*. Podemos observar que no grupo LiRPs/Saponina, a produção de nitrito foi significativamente maior em relação à observada nos grupos controle (*figura 7A*).

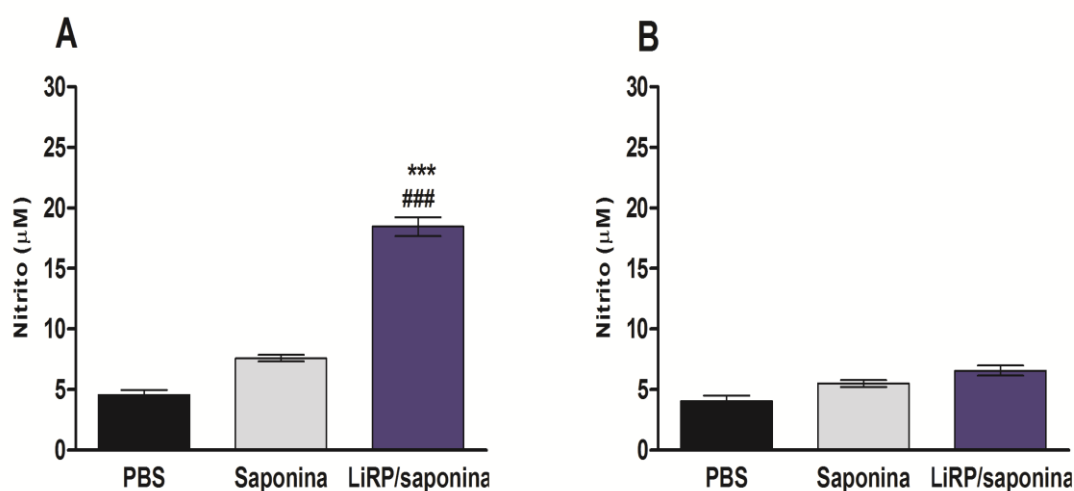


Figura 7: Avaliação da produção de nitrito pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados com *L. amazonensis*. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e a produção de nitrito foi avaliada cerca de 10 semanas após o desafio. A produção foi avaliada sob estímulos com 50 µg de SLA (A) ou não-estimuladas (B). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

5.4. Resposta Imune Celular Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações e a Infecção Desafio com *L. amazonensis*

Para avaliar a resposta celular gerada após as imunizações e a infecção desafio com *L. amazonensis*, as citocinas IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram dosadas nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos, após seu estímulo com as LiRPs.

Os animais do grupo LiRPs/Saponina, que apresentaram carga parasitária no baço e na pata infectada significativamente menor que os controles, produziram níveis elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, quando comparados com os grupos PBS e saponina. Os níveis de tais citocinas foram elevados tanto após o estímulo com as LiRPs quanto com o SLA (*figuras 8 e 9*).

Quando analisamos o nível destas citocinas após os estímulos com as LiRPs ou com o SLA antes e após o desafio experimental no grupo imunizado com LRP/Saponina, podemos verificar que, após o estímulo do SLA, a produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF foi maior em relação à produção observada antes do desafio, indicando que os animais foram capazes de desenvolver um resposta imune específica contra o parasita.

Com o intuito de verificar a participação de células T CD4⁺ e CD8⁺ na produção de IFN- γ e a dependência de IL-12 nessa produção, esplenócitos dos animais do grupo LiRPs/Saponina, estimulados com as LRP ou com o SLA, foram cultivados na presença de anticorpos monoclonais anti-IL-12, anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺.

Podemos observar, na *figuras 8C e 8D*, que a produção de IFN- γ foi significativamente reduzida na presença dos anticorpos monoclonais, indicando que a produção de tal citocina ocorreu por ambos os tipos celulares e, em ambos os casos, houve a dependência da IL-12. Entretanto, quando analisamos estatisticamente a produção de IFN- γ na presença do anticorpo monoclonal anti-CD4⁺, em relação ao monoclonal anti-CD8⁺, verificamos que neste último a produção foi maior do que na presença de anti-CD4⁺ (*figuras 8C e 8D*).

A produção de IL-4 e IL-10 no grupo LiRPs/saponina foi reduzida em relação aos grupos controle, após o estímulo com o SLA (*figura 10*). Assim, a proteção observada nesse grupo pode também ser relacionada a uma baixa produção de citocinas relacionadas à resposta Th2. Por outro lado, os animais dos grupos PBS e Saponina, que apresentaram

elevada carga parasitária e níveis baixos de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, produziram níveis significativamente elevados de IL-4 e IL-10 após o estímulo com o SLA, indicando que a resposta Th2 exacerbada pode ser relacionada à suscetibilidade à infecção nestes animais.

Dessa forma, pode-se concluir que a proteção efetuada pela imunização com as LiRPs/saponina nos camundongos BALB/c contra a infecção desafio com *L. amazonensis* foi relacionada com à indução de uma resposta imune Th1, com a participação de citocinas como IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF e que a produção de IFN- γ se deu por ambos os tipos celulares CD4⁺ e CD8⁺, sendo dependente de IL-12. Além disso, aparentemente, a maior produção de IFN- γ parece estar ocorrendo via LT CD4⁺ nos animais imunizados e desafiados.

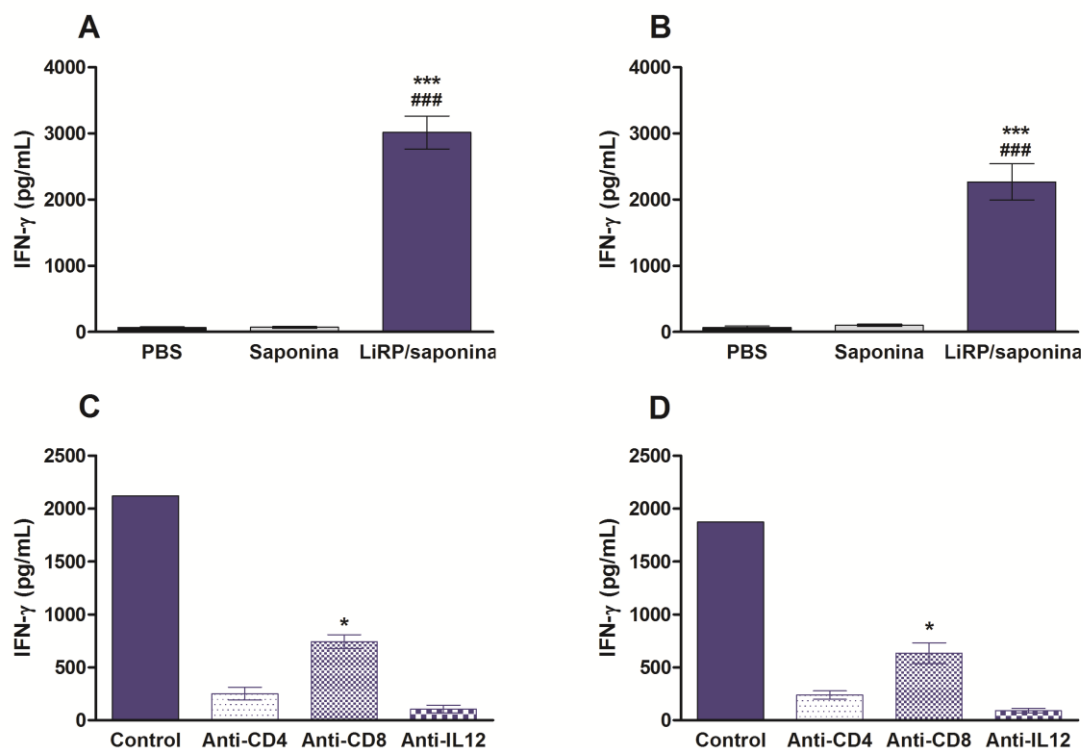


Figura 8: Análise da produção de IFN- γ , na presença de anticorpos anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ e anti-IL-12, pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose dos imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e a resposta celular foi avaliada cerca de 10 semanas após o desafio. Nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos foi avaliada a produção de IFN- γ , após os estímulos com 50 μ g de SLA (B) ou 12 μ g de LiRPs (A). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRP/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente). A produção de IFN- γ foi avaliada após os estímulos com 50 μ g de SLA (D) ou 12 μ g de LiRPs (C) na presença de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ e anti-IL-12. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. * indica $P < 0,0001$ quando comparados aos grupos anti-CD4 e anti-IL-12.

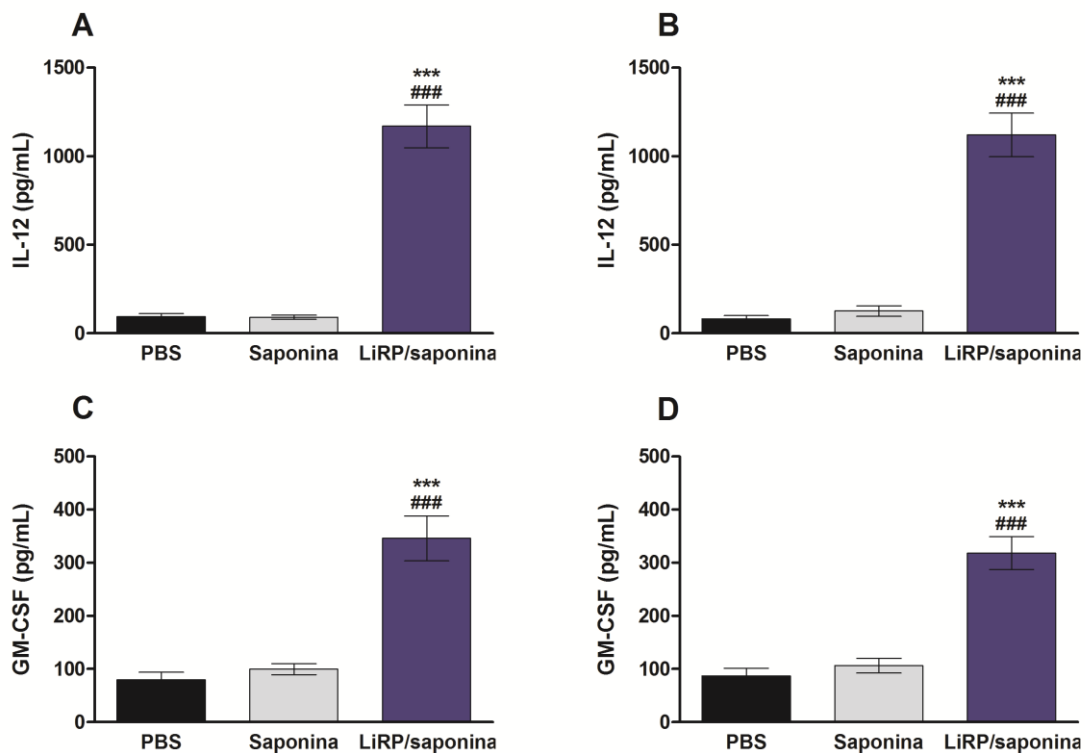


Figura 9: Análise da produção de IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose dos imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e a resposta celular foi avaliada cerca de 10 semanas após o desafio. Nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos foi avaliada a produção de IL-12 e GM-CSF após os estímulos com 50 μ g de SLA (**B** e **D**) ou 12 μ g de LiRPs (**A** e **C**). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

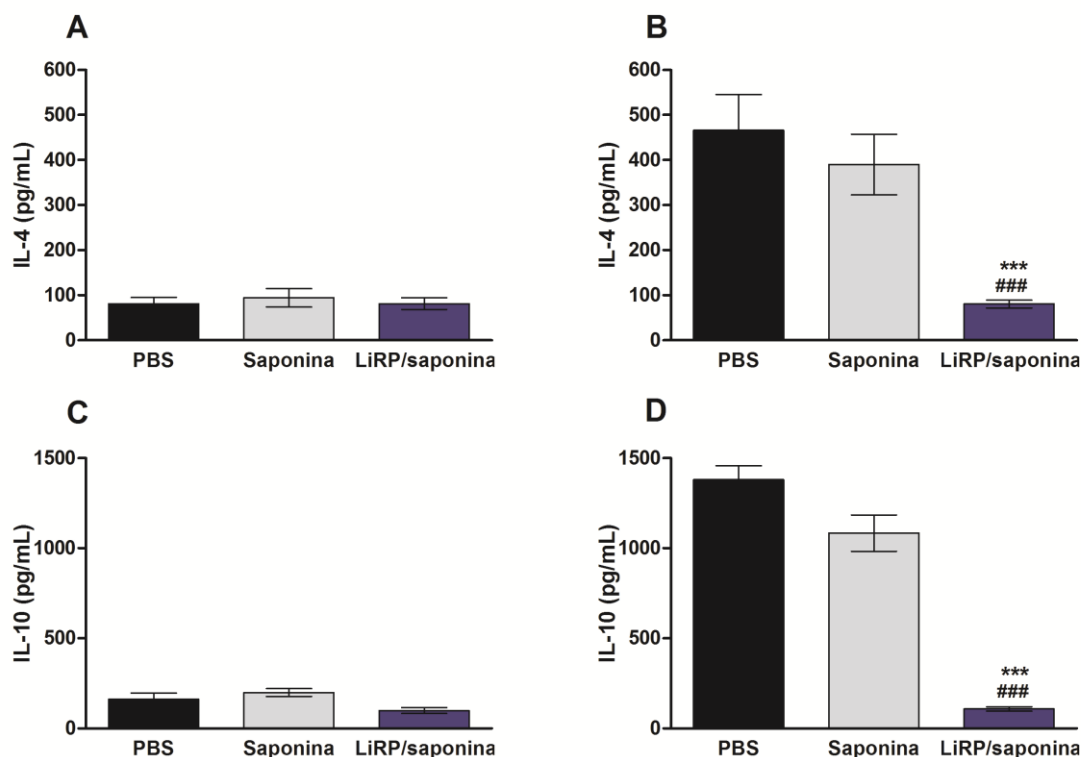


Figura 10: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* a resposta celular foi avaliada cerca de dez semanas após o desafio. Foi avaliada nos sobrenadantes de esplenócitos a produção de IL-4 e IL-10 após os estímulos de 50 µg de SLA (**B e D**), 12 µg de LiRPs (**A e C**). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRP/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

5.5. Resposta Humoral Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações e a Infecção Desafio com *L. amazonensis*

Na avaliação da produção de anticorpos após a infecção desafio, pode-se observar que os animais imunizados com LiRPs/Saponina apresentaram uma maior produção de anticorpos IgG total anti-LiRPs, quando comparados aos níveis obtidos nos grupos controle (*figura 11*). Quando avaliamos os isotipos de IgG neste grupo, verificamos que a produção de anticorpos IgG2a anti-LiRPs foi significativamente maior do que os níveis obtidos de anticorpos IgG1 anti-LiRPs. Tal fato pode indicar que, em tal grupo, houve a

predominância de resposta imune tipo Th1 neste grupo. Nos grupos controle, podemos observar uma produção similar de IgG1 e IgG2a anti-LiRPs.

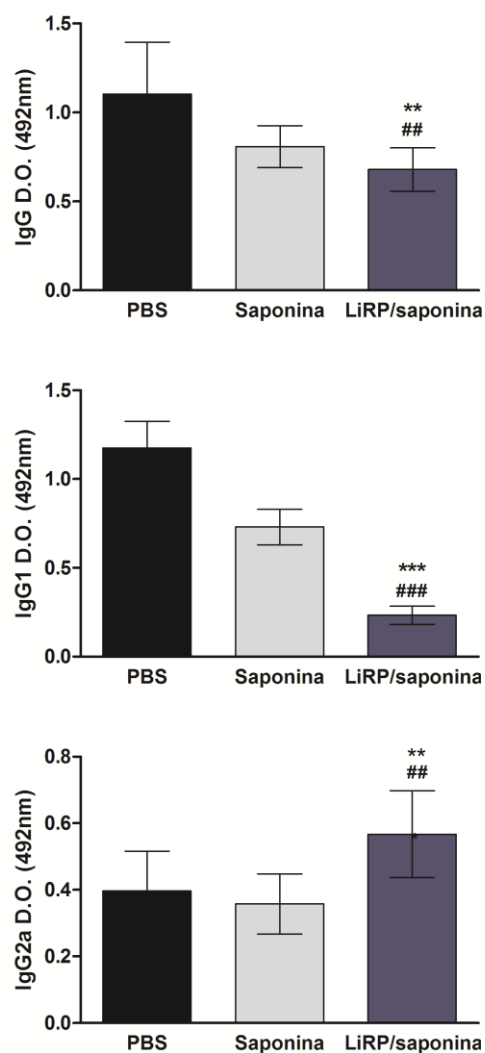


Figura 11: Análise da produção IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LiRPs pelos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e a resposta humoral foi avaliada 10 semanas após o desafio. A presença de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LiRPs foi avaliada nos soros dos animais. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. ** e ## indicam $P < 0,001$ no grupo LiRP/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente); *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LiRPs/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

5.6. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das LRPs de *L. infantum* (LiRPs) e *L. amazonensis* (LaRPs)

Após a purificação das LaRPs, o perfil de expressão protéico das proteínas ribossomais de *L. infantum* e *L. amazonensis* foi avaliado. Na **figura 12**, podemos observar os resultados, nos quais algumas variações de bandas foram obtidas, entretanto, em sua magnitude, houve uma conservação acentuada das diferentes proteínas ribossomais presentes em ambos os extratos.

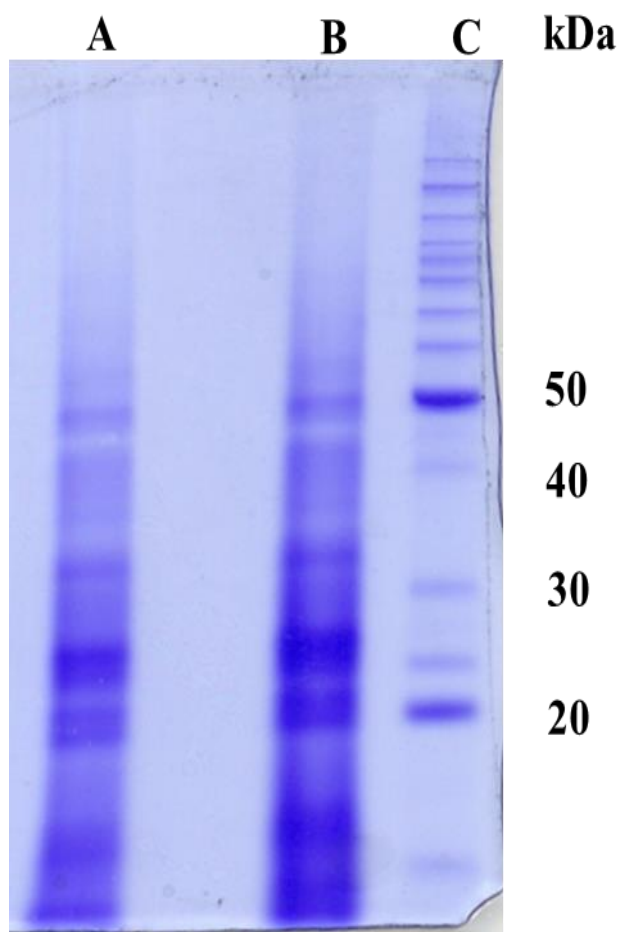


Figura 12: Fotodocumentação de Gel SDS-PAGE 10%, corado pelo Coomassie Brilliant Blue. Alíquotas de 10 μ g de proteínas ribossomais purificadas, e diluídas em tampão de amostra em condições não redutoras, foram separadas em gel de poliacrilamida 10%.

A - Proteínas ribossomais de *L. infantum*

B - Proteínas ribossomais *L. amazonensis*

C - Padrão de peso molecular.

5.7. Avaliação da Proteção Conferida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LaRPs associadas a Saponina Após a Infecção Desafio com *L. amazonensis*

Na avaliação do desenvolvimento das lesões (*figura 13*), pode-se observar que os animais imunizados com as LaRPs/saponina apresentaram redução significativa no tamanho médio dos edemas, a partir da 7^a semana até a 9^a semana após a infecção desafio, quando comparados aos grupos controles. Já na avaliação da carga parasitária, realizada cerca de 11 semanas após a infecção, o baço, fígado, a medula óssea, o linfonodo popliteo e a pata infectada foram coletados e avaliados para a detecção dos parasitas, por meio da técnica de diluição limitante (Coelho et al., 2003). Na análise dos resultados, pode-se observar que a carga de parasitas observada no baço, fígado, linfonodo popliteo e na pata dos animais imunizados com LaRPs/saponina foi significativamente menor em relação aos grupos controle (*figura 14*), enquanto que na medula óssea não foram detectados parasitas no grupo LaRPs/saponina (*figura 14D*).

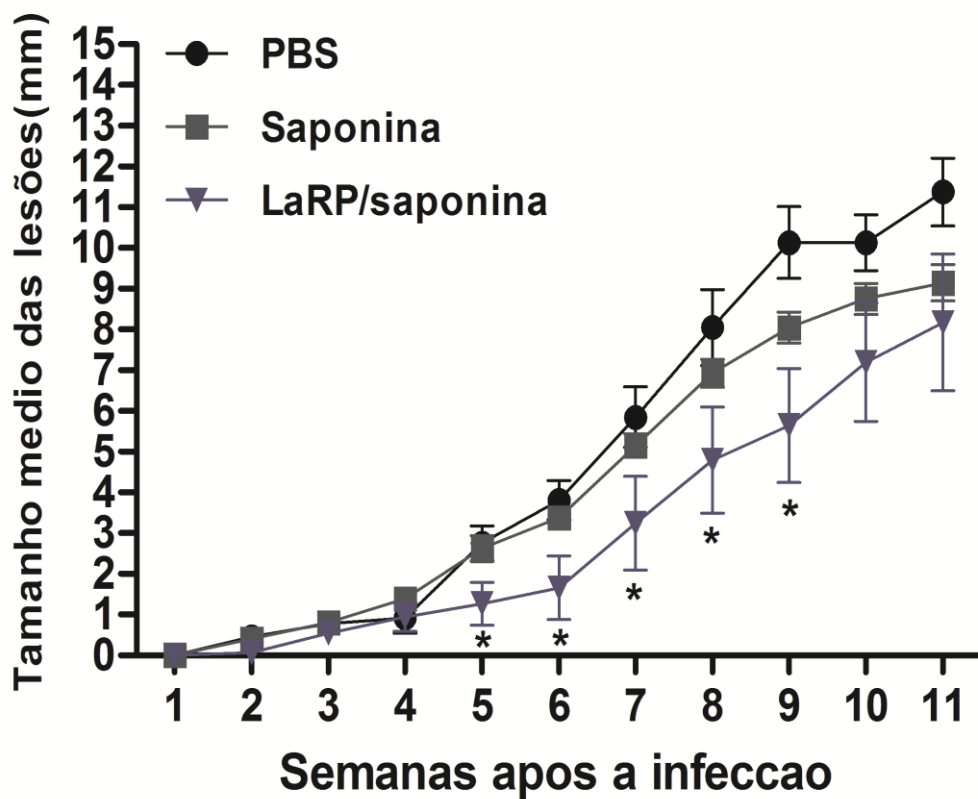


Figura 13: Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas dos camundongos imunizados e desafiados camundongos imunizados e após a infecção desafio com *L. amazonensis*. O tamanho médio das lesões foi avaliada cerca de 11 semanas após o desafio. Cada símbolo representa a média e o desvio padrão dos grupos. *indica $P < 0,005$ no grupo LaRPs/Saponina, quando comparado aos grupos controle (PBS e saponina).

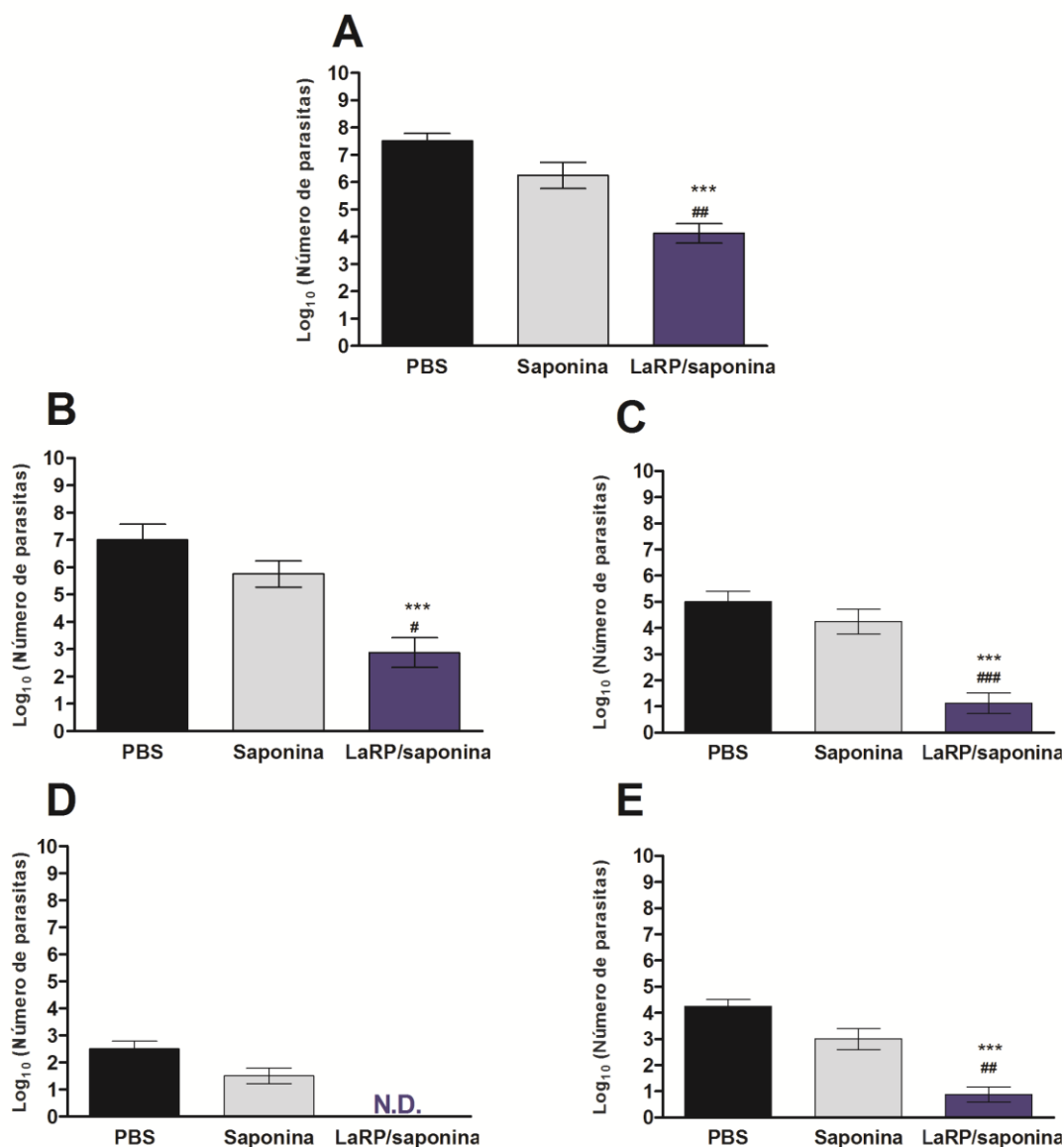


Figura 14: Avaliação da carga parasitária na pata infectada e baço dos camundongos imunizados e desafiados com *L. amazonensis*. Cerca de 30 dias após a última imunização, os camundongos foram infectados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* por via subcutânea. A carga parasitária foi avaliada na pata infectada (**A**), no linfonodo poplíteo (**B**), baço (**C**), na medula óssea (**D**) e no fígado (**E**) pelo método de diluição limitante. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LaRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente). ** e ## indicam $P < 0,001$ no grupo LaRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente). # indica $P < 0,05$ no grupo LaRPs/saponina em comparação ao grupo saponina. N.D. (não detectado).

5.8. Resposta Imune Celular Induzida nos Camundongos BALB/c Após as Imunizações com LaRPs/saponina e a Infecção Desafio com *L. amazonensis*

Os animais do grupo LaRPs/Saponina, que apresentaram carga parasitária significativamente menor que os controles, produziram níveis elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF quando comparados com os grupos PBS e saponina. Os níveis de tais citocinas foram elevados tanto após o estímulo com as LaRPs quanto com o SLA (*figura 15*). Dessa forma, os resultados indicam que a proteção dos animais correlacionou-se com o desenvolvimento de uma resposta Th1.

A produção de IL-4 e IL-10 no grupo LaRPs/saponina foi reduzida em relação aos grupos controle, após o estímulo com o SLA (*Figura 16*). Assim, a proteção observada nesse grupo pode também ser relacionada a uma baixa produção de citocinas relacionadas à resposta Th2. Por outro lado, os animais dos grupos PBS e Saponina, que apresentaram elevada carga parasitária e níveis baixos de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF; produziram níveis significativamente elevados de IL-4 e IL-10 após o estímulo com o SLA, indicando que a resposta Th2 exacerbada pode estar relacionada à suscetibilidade desses animais à infecção.

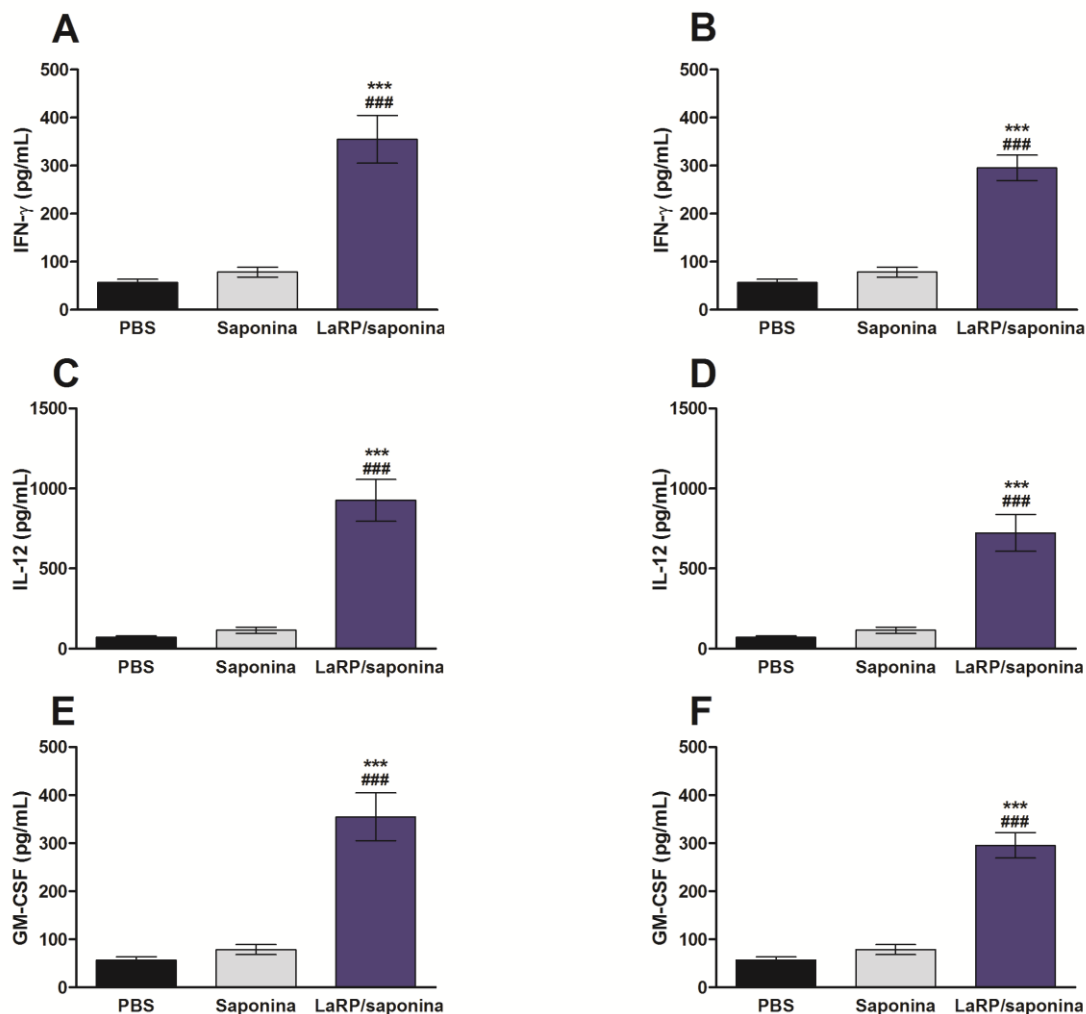


Figura 15: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose dos imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e a resposta celular foi avaliada cerca de 11 semanas após o desafio. Nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos foi avaliada a produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF após os estímulos com 50 μ g de SLA (B, D e F) ou com 12 μ g de LaRPs (A, C e E). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LaRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

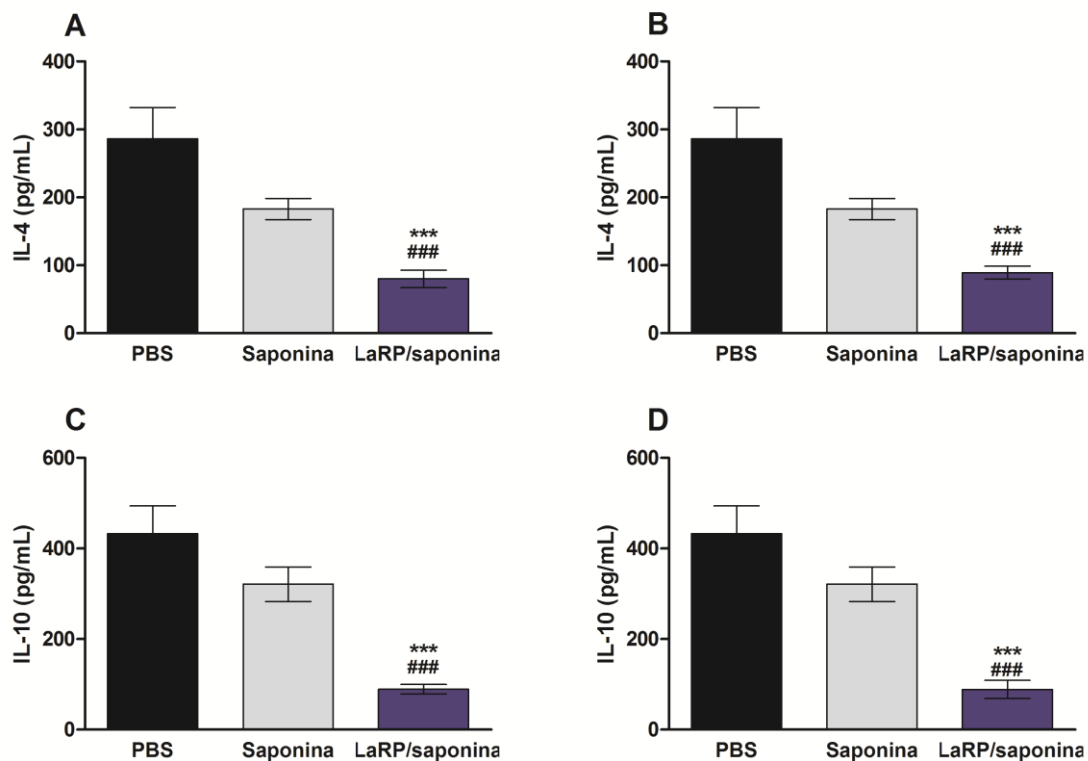


Figura 16: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* a resposta celular foi avaliada cerca de 11 semanas após o desafio. Foi avaliada nos sobrenadantes de esplenócitos a produção de IL-4 e IL-10 após os estímulos de 50 μ g de SLA (B e D), 12 μ g de LaRPs (A e C). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** e ### indicam $P < 0,0001$ no grupo LaRPs/saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina, respectivamente).

6. Discussão

No Brasil, a LT é uma das patologias que mais merece atenção, devido ao risco de ocorrência de deformidades físicas que podem causar no homem, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Além disso, é uma doença que apresenta ampla distribuição geográfica, com registros de casos em todas as regiões brasileiras (Ministerio da Saude, 2010).

Leishmania amazonensis é um dos principais agentes etiológicos de leishmanioses nas Américas e é associado a um amplo espectro de manifestações clínicas nos hospedeiros mamíferos, que variam desde a doença assintomática até a LV, potencialmente fatal (Grimaldi, et al., 1989; Barral et al., 1991). Além disso, *L. amazonensis* possui áreas de distribuição comuns a outras espécies de *Leishmania*, tais como a *L. chagasi* (Grimaldi et al., 1993).

Modelos murinos são importantes na compreensão na biologia das leishmanioses. A polarização da resposta imune do tipo Th1 ou Th2, observada nos modelos de infecção de camundongos BALB/c com *L. major*, tem fornecido informações importantes a respeito da resposta imune protetora e sobre os mecanismos de patogenicidade; no entanto, esse dogma não é plenamente aplicável na leishmaniose humana e para a infecção com outras espécies de *Leishmania* utilizando em outros modelos murinos (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). A infecção murina com *L. amazonensis* têm suas particularidades; muitas linhagens de camundongos são geneticamente suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*, desenvolvendo lesões progressivas que não regridem naturalmente e que apresentam elevada carga parasitária (Soong et al., 1997). A resposta mista tipo Th1/Th2, observada na infecção por *L. amazonensis*, parece ser similar àquela observada na doença humana (Silveira et al., 2009), validando a importância biológica deste modelo para o estudo das leishmanioses humanas.

Como o tratamento da doença ainda é considerado insatisfatório, com muitos efeitos colaterais e o desenvolvimento de resistência dos parasitas aos fármacos usados, o desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses é altamente desejável como uma medida profilática e para o controle efetivo da doença (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Nas Américas, algumas vacinas utilizam o lisado de *L. amazonensis* (Vélez, 2005; Armijos, 2004) ou a mistura de espécies nativas (Antunes, 1986). No Velho Mundo, é usado o antígeno autoclavado de *L. major* (ALM). Vacinas de segunda geração, que utilizam parasitas vivos, mas geneticamente modificados, causam uma resposta imune específica provocada por uma infecção abortiva que não induz à doença (Souza, 1994; Alexander, 1998; Papadopoulo, 2002).

As vacinas de terceira geração são as que usam como antígenos vacinais as proteínas derivadas do parasita ou da saliva do vetor, peptídeos sintéticos e os plasmídeos de DNA. Dentre os antígenos vacinais baseados em DNA mais promissores temos os seguintes: LEIF, TSA, LmsT11, H1, CpA/CpB, KMP11 e NH36 (Palatnik-de-Sousa, 2008). Baseados na observação de que a saliva do vetor incrementa a infecciosidade do patógeno, alguns antígenos que não só protegem contra a infecção, mas que também diminuem a viabilidade e reprodutibilidade do parasita no vetor vem sendo testados. Este é o caso da proteína maxadilana (Brodie, 2007), e do antígeno SP15, obtido do *Phlebotomus papatasi*, que induz resistência em camundongos contra a infecção desafio com *L. major* (Valenzuela et al., 2001).

O desenvolvimento de vacinas efetivas contra as leishmanioses requer a definição de potenciais candidatos que sejam capazes de induzir resposta protetora, preferencialmente, contra diferentes espécies de *Leishmania*, sendo denominada de proteção heteróloga. Desta forma, muitas proteínas conservadas nos parasitas, tais como as histonas, proteínas ribossomais, proteínas de choque térmico e cisteína-proteinases, são indicadas como possíveis candidatos a vacinas, por terem sido identificadas propriedades antigênicas e/ou imunogênicas destas proteínas em indivíduos que desenvolvem diferentes formas clínicas de leishmanioses (Requena, et al., 2000; Soto, et al., 2009). Dentre elas, as proteínas ribossomais de *Leishmania* podem ser consideradas como partículas imunologicamente relevantes durante a infecção ativa, haja vista que alguns dos seus constituintes serem moléculas antigênicas reconhecidas pelo sistema imune do homem e de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (Skeiky, et al., 1994; Requena, et al., 2000; Coelho, et al., 2009). Além disso, proteínas ribossomais têm sido relacionadas com atividades celulares e liberação de citocinas após a infecção em modelos murinos (Requena, et al., 2000; Cordeiro-Da-Silva, et al., 2001; Roberts, et al., 2005). As LRPs têm

sido avaliadas estudos como antígenos vacinais nas leishmanioses. Tais proteínas, purificadas da espécie *L. major*, quando administradas com o adjuvante ODN-CpGs, foram capazes de fornecer proteção contra o desafio com essa mesma espécie, tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 (Iborra et al., 2008).

As saponinas são esteróides ou glicosídeos triterpenóides encontrados em plantas selvagens ou cultivadas, animais marinhos inferiores e em algumas bactérias. São glicosídeos tensoativos que contem um núcleo hidrofóbico de estrutura triterpenóide com cadeias de carboidratos ligadas ao núcleo (Rajput et al. 2007). Adequada para uso veterinário, a saponina ainda não pode ser utilizada em humanos por possuir alguns efeitos citotóxicos, principalmente hemolíticos, que podem ser reduzidos através de remoção química de porções glicídicas da molécula (Palatnik de Sousa et al, 2004). A capacidade das frações QuilA e QS-21 (frações do extrato de *Quilaja saponaria*) de estimular a resposta imune Th1 e linfócitos T citolíticos, a torna ideal para o uso contra patógenos intracelulares (Sun; et al., 2009). Além dos estudos em modelo murino (Palatnik de Sousa et al., 2004 ; Aguilar-Be et al., 2005 ; Paraguai de Sousa et al, 2001), a utilização de saponina na proteção contra LVC também está sendo avaliada. A proteína A2, administrada em cães juntamente com tal saponina, induziu proteção nestes animais, que foi correlacionada com níveis elevados de IFN- γ (Fernandes et al., 2008).

Desta forma, o presente trabalho objetivou a utilização de proteínas purificadas de ribossomos de duas diferentes espécies de *Leishmania* [*L. infantum* (LiRPs) e *L. amazonensis* (LaRPs)] associadas a saponina, a fim de testar seu efeito protetivo contra a infecção de camundongos BALB/c com a espécie *L. amazonensis*.

A proteção induzida pela imunização com os imunógenos vacinais foi associada à presença de níveis elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, e a uma baixa produção de IL-4 e, especialmente, de IL-10. Tal fato remeteu ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 nos animais, primada pela produção de IFN- γ , um importante marcador de resistência contra várias espécies de *Leishmania* (Afonso & Scott, 1993; Jones, et al., 2000; Kaye, et al., 1991; Kima, et al., 2000).

A indução do fenótipo de resistência contra a infecção por *Leishmania* requer, possivelmente, a participação conjunta de populações de LT CD4⁺ e LT CD8⁺, ambos contribuindo na produção de IFN- γ (Herath et al., 2003). Nossos resultados mostram que no

sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais vacinados com as LiRPs/saponina foi detectado níveis elevados dessa citocina após a infecção com *L. amazonensis*. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contribuíram para a produção de IFN- γ nos camundongos imunizados com as LiRPs/saponina. A ativação induzida dos dois subconjuntos de células pode ser importante na eliminação dos parasitas, fato que foi observado no baço dos animais vacinados com uma preparação purificada de gp63 (Bhowmick, et al., 2008) e dp72 (Rachamim, et al. 1993) e desafiados com *L. donovani*. Tal fato também foi observado em camundongos imunizados com vacinas de célula híbrida compostas de macrófagos expressando a proteína KMP-11 (Basu, et al., 2007). Nos camundongos imunizados com as LiRPs/saponina, observou-se que a produção de IFN- γ foi realizada por LT CD4⁺ e LT CD8⁺, e foi amplamente dependente da presença de IL-12, haja vista que a incubação das culturas de esplenócitos, com os devidos estímulos e a presença de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 ou anti-IL-12, restringiu significativamente a produção de IFN- γ pelas células esplênicas dos animais imunizados com LiRPs.

O papel protetor da IL-12 pode explicar sua capacidade de aumentar a atividade de leishmanicida de macrófagos (Taylor, et al., 1997; Murray, et al., 1997). Nossos dados indicam que a imunização utilizando as LiRPs ou LaRPs, associadas à saponina, produziu uma resposta celular específica do tipo Th1, que foi mantida após a infecção desafio com *L. amazonensis*, protegendo os camundongos vacinados contra a infecção desafio com tal espécie, haja vista a redução significativa da carga parasitária em alguns órgãos analisados dos animais de todos os grupos, vacinados e controles. Esses apresentaram significativo desenvolvimento de lesão cutânea e carga parasitária, de modo que os experimentos tiveram de ser interrompidos devido à falta posterior dos animais controles. Tais dados estão de acordo com aqueles relatados por Iborra et al. (2008), que demonstrou que a resposta imune do tipo Th1 específica ao parasita foi obtida após a imunização com as LRPs de *L. major*, associadas aos CpG-ODNs, que foi capaz de induzir proteção em camundongos BALB/c e C57BL/6 contra a infecção experimental com *L. major*. Demonstrando seu papel envolvido na proteção contra as leishmanioses, a IL-12 já foi utilizada como adjuvante em estudos vacinais contra diversas espécies de *Leishmania* (Coelho et al., 2003; Tewary et al., 2006) e também no tratamento imunoterápico de

camundongos infectados, nos quais observou-se uma redução significativa da carga parasitária (Murray, et al., 1995).

Em nossas análises, a proteção dos camundongos dos grupos LiRPs e LaRPs, associadas à saponina, foi relacionada também com uma produção aumentada de GM-CSF. Citocinas tais como GM-CSF, IL-3 e M-CSF são responsáveis por regular a proliferação e diferenciação de células mielóides (Cotterell et al., 2000). Nossos resultados demonstram a detecção, nos sobrenadantes de cultivo de esplenócitos dos animais imunizados com as LiRPs e LaRPs, níveis elevados de GM-CSF em relação aos grupos controle. Tal citocina é descrita com função na ativação *in vitro* de macrófagos e na indução de resistência contra a infecção por diferentes tipos de patógenos intracelulares e em modelos murinos, como *L. major* (Dumas, et al., 2003) e *L. donovani* (Murray, et al., 1995).

Em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major*, foi observado que nos animais resistentes ocorreu um aumento dos níveis de GM-CSF (Saha, et al., 1999). Em camundongos infectados com *L. donovani* e posteriormente tratados com GM-CSF, houve uma redução significativa da carga parasitária. A redução do número de parasitas no fígado desses animais foi acompanhada pelo aumento do número de neutrófilos e monócitos na circulação sanguínea, pelo influxo e acúmulo nos órgãos infectados por células mielo-monocíticas (Murray, et al. 1995). Macrófagos derivados de monócitos humanos, pré-tratados com a proteína GM-CSF recombinante, foram capazes de inibir a replicação dos parasitas internalizados, sugerindo que tal citocina pode ser considerada um ativador de macrófagos (Weiser, et al. 1987). Além disso, demonstrou-se que a imunização de voluntários humanos com uma preparação de *Leishmania* contendo GM-CSF como adjuvante induziu a uma resposta imune do tipo Th1 (Follador, et al., 2002) e que a administração de uma vacina terapêutica contendo quatro antígenos de *Leishmania*, combinada com GM-CSF, foi correlacionada com a resolução de lesões mucosas em um paciente com leishmaniose muco-cutânea (Badarao, et al., 2001).

Nos grupos imunizados com as LRPs/saponina, os níveis de IL-4 e IL-10 foram menores quando comparados aos grupos controle, nesses grupos, a produção foi significativamente maior após os estímulos dos esplenócitos com SLA ou com as LaRPs.

Nossos resultados mostram também que a proteção contra a progressão da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c foi associada com uma queda significativa

da produção da citocina IL-10. Níveis muito baixos dessa citocina foram observados após a infecção desafio com tal espécie do parasita. Também, foi possível detectar nos sobrenadantes dos cultivos de esplenócitos dos grupos controle, pesadamente bparasitados por *L. amazonensis*, uma produção significativamente maior de tal citocina. O controle da resposta mediada por IL-10 nos camundongos vacinados pode ser crítica para a proteção, desde que IL-10 é considerada como um importante fator relacionada com a progressão da doença na infecção por *Leishmania* em camundongos BALB/c (Murphy, et al., 2001; Awasthi, et al., 2004; Garg, et al., 2006) ou em camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-10 (Murphy, et al., 2002).

Além disso, IL-10 também foi associada com a progressão da doença na infecção com *L. amazonensis*, pelo fato de que camundongos nocautes deficientes dessa citocina apresentaram menor número de parasitas nas lesões em comparação aqueles de linhagem selvagem (Padigel, et al., 2003). A principal ação da IL-10 sobre o sistema imune, que favorece a progressão da doença, pode estar relacionada à desativação de macrófagos, causada pela inibição da produção de NO (Vouldoukis et al., 1997). Tal fato está em concordância com nosso estudo, no qual os camundongos dos grupos controle, não-protetidos, não produziram níveis significantes de NO.

A participação de IL-4 na suscetibilidade à *L. amazonensis* é controversa; a maior produção dessa citocina ocorre ao mesmo tempo em que há um número elevado de parasitas nos camundongos infectados (Saha; et al., 1993). A IL-4 também inibiu a atividade leishmanicida de macrófagos humanos (Vouldoukis et al., 1997). Quando o tratamento de camundongos BALB/c nocautes de IL-4, infectados com *L. donovani*, por meio do uso do estibogluconato de sódio foi avaliado, observou-se que os animais não responderam ao tratamento e houve uma produção prejudicada de IFN- γ (Alexander et al., 2000). Além disso, a neutralização da IL-4 endógena não foi associada com a redução da carga parasitária em camundongos BALB/c, apesar da supressão verificada da resposta imune Th2 (Lehmann, et al., 2000).

Em paralelo, a proteção fornecida pela imunização de camundongos BALB/c com DNA codificador da proteína A2 ou com a proteína gp63 associada a moléculas lipossomais foi relacionada a uma produção reduzida de IL-4 (Zanin et al., 2007; Bhowmick; et al., 2008). No entanto, em outro trabalho, a proteção fornecida pela

imunização com antígenos de *L. amazonensis* foi associada à produção elevada de IL-4 (Vilela et al., 2007).

Na avaliação da resposta humoral dos animais imunizados, foi observado que os animais imunizados produziram níveis baixos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos ao parasita, quando comparados aos níveis observados nos demais grupos. Alguns trabalhos, como o descrito por Kima et al. (2000), demonstram que a presença de altos níveis de anticorpos pode causar efeitos deletérios ao fenótipo de proteção contra a infecção por *Leishmania*. Dessa forma, os níveis elevados de IgG total, IgG1 e IgG2a que foram observados nos animais não-protegidos contra *L. amazonensis*, pode ter tido papel importante na susceptibilidade à infecção, e ter contribuído para a progressão da doença.

De um modo geral, observou-se que ambos os imunógenos foram eficazes em seus objetivos – garantir proteção nos animais infectados. Na avaliação da carga parasitária, observou-se que após 10 a 11 semanas da infecção desafio, os animais apresentaram uma redução significativa no tamanho médio das lesões e no número de parasitas viáveis nas lesões, avaliados pela técnica de diluição limitante, quando comparados aos animais dos grupos controle. Nos animais imunizados com as LiRPs, houve uma diminuição do número de parasitas encontrados na pata infectada, que foi acompanhada por uma redução das lesões inflamatórias dérmicas após 10 semanas de infecção. Em se considerando apenas as medidas das lesões, resultados distintos foram obtidos com a imunização utilizando as LaRPs, já que houve redução significativa no número de parasitas na pata infectada, linfonodos drenantes e baço dos animais, mas a partir da 9ª semana após a infecção, houve uma progressão no tamanho das lesões nos animais imunizados com LaRPs/saponina. Entretanto, no principal parâmetro avaliativo para verificar eficácia ou não de proteção contra a Leishmaniose Tegumentar, a avaliação da carga parasitária, ambos os extratos ribossomais mostraram-se efetivos em proteger os animais de uma infecção mais severa e progressiva, conforme foi observado nos animais dos grupos controle (salina e saponina)

Neste trabalho, observou-se que a imunização de camundongos BALB/c com as LRPs purificadas das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*, associadas ao adjuvante saponina, foram capazes de induzir uma resposta Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF. Houve reduções significativas na carga parasitária dos animais utilizando ambos os tipos de LRPs nas patas infectadas, baço, linfonodos drenantes dos

animais e uma completa eliminação dos parasitas na medula óssea dos animais infectados. A redução do número de parasitas nos camundongos protegidos ocorreu, possivelmente, pela ativação dos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, via produção de NO. A proteção heteróloga observada neste estudo relaciona-se, possivelmente, à elevada homologia entre as proteínas ribossomais das diferentes espécies de *Leishmania*, conforme mostrado neste trabalho em um gel SDS-PAGE, e ao papel funcional desempenhado por tais proteínas no envolvimento da resistência de modelos murinos contra a infecção pelas diferentes espécies do parasita.

7. Conclusões

- A imunização de camundongos BALB/c com proteínas ribossomais de *Leishmania* levou à geração de uma resposta imune celular e humoral específica do tipo Th1.
- Tal resposta foi devida à ativação de linfócitos T dos tipos CD4⁺ e CD8⁺, sendo amplamente dependente da presença de IL-12.
- A imunização com as LiRPs/saponina ou LaRPs/saponina mostrou-se eficaz em induzir proteção significativa em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.
- A imunização com as LiRPs/saponina ou LaRPs/saponina permitiu a indução de uma resposta protetora contra *L. amazonensis* após a desafio, primada pelos níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF e níveis baixos de IL-4 e IL-10. Houve também a predominância de anticorpos do isotipo IgG2a anti-LRPs e anti-SLA nos animais imunizados e desafiados, indicativos da manutenção da resposta tipo Th1.
- Os animais imunizados e protegidos apresentaram reduções significativas no número de parasitas nas patas infectadas, no baço, fígado e linfonodo poplíteo; acrescido de uma completa eliminação dos parasitas na medula ossea.
- O protocolo de purificação das LRPs mostrou-se satisfatório e os perfis protéicos gerados em ambos os extratos mostraram uma conservação na expressão protéica entre proteínas ribossomais de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

8. Perspectivas

- Empregar uma abordagem proteômica, baseada na combinação das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, para melhor comparar e definir os perfis de expressão protéica das LRPs de *L. infantum* e *L. amazonensis*.
- Identificar as proteínas comumente expressas nos extratos ribossomais de *L. infantum* e *L. amazonensis*.
- Clonar os genes codificadores de tais proteínas de interesse para a obtenção de proteínas recombinantes e realizar a predição de epitopos para linfócitos T CD8⁺ usando as sequências primárias dessas proteínas;
- Avaliar o grau de proteção nos animais imunizados e infectados, por meio da determinação da carga parasitária e avaliar a resposta celular e humoral por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 e dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a, e realizar a dosagem de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes das culturas pelo método de Griess.

9. Referências bibliográficas

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONCALVEZ DA COSTA, S.C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet. Parasitol.*, 121:179-187. 2004

AFONSO, L.C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. & Immun.*, v. 61, p. 2952–2959, 1993.

AGUILAR BE, I.; ZARDO, R.S.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA CABRERA, G.B.; ROSADO VALLADO, M.; MUT MARTIN, M.; ROSARIO, M.; MISS, G.; PALATNIK DE SOUSA, C.B.; DUMONTEIL, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* dna vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. & Immun.*, v. 73, n. 2, p. 812-819, 2005.

AHMED, S.B., BAHLOUL, C., ROBBANA, C., ASKRI, S., DELLAGI, K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, v. 16, n. 22, p.1631-9. 2004.

AHMED, S.B.; TOUIHRI, L.; CHTOUROU, Y.; DELLAGI, K.; BAHLOUL, C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine*, v. 27, p. 99-106, 2009.

ALEXANDER, J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a TH1 response. *J. Immunol.*, v. 161, p. 6794-801. 1998.

ALEXANDER, J., CARTER, K.C., AL-FASI, N., SATOSKAR, A., BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol.*, v. 30, n. 10, p. 2935-43. 2000.

ANTUNES, C.M.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; COSTA, A.; MELO, M.N.; DIAS, M.. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Epidemiol.*, v. 15, p. 572-80. 1986.

ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; CALVOPINA, M.; HIDALGO, A.; CEVALLOS, W.; CORREA, J. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 22, p. 1320-6. 2004.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasit.*, v. 30, p.1269-81. 2000.

AWASTHI, R.K.; MATHUR, B.; SAHA, J. Immune response to *Leishmania* infection, *Indian J. Med. Res.*, v. 119, p. 238-58. 2004

BADARO, R.; LOBO, I.; NAKATANI, M.; MUINOS, M.; NETTO, E.M.; COLER, R.N.; REED, S.D. Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal Leishmaniasis refractory to antimony: a case report, *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 5, p. 223-32.2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BUTTON, L.L. & MCMASTER, W.R. Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *J. Exp. Med.*, v. 167, p.724-29, 1988.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; DE JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; GRIMALDI Jr.G. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, p. 536-46, 1991.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; HALDAR, A.K.; NASKAR, K.; DE, T.; DANA, S.K.; WALDEN, P.; ROY, S. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting a strong CD8 P cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13, *Infect. & Immun.*, v. 75, p. 5956-66. 2007.

BEYRODT, C.G.; PINTO, A.R.; FREYMÜLLER, E.; BARBIÉRI, C.L. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect. & Immun.*,v. 65, p. 2052-9. 1997.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect. & Immun.*, v. 76, p. 100-15. 2008.

BRODIE, T.M.; SMITH, M.C.; MORRIS, R.V.; TITUS, R.G. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect. & Immun.*, v. 75, p. 2359-65. 2007.

CAMPBELL, K.; DIAO, H.; JI, J.; SOONG, L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect. & Immun.*, v. 71, p. 6270-78, 2003.

CARDOSO, S.R.; DA SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; LIU, I.A.; FUJIWARA, R.T.; NASCIMENTO, E. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 2, p.193-9, 2003.

CARVALHO, F.A.; CHAREST, H.; TAVARES, C.A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E.P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 43, p. 289-95, 2002.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. & Immun.*, v. 71, p. 3988-94, 2003.

COELHO, E.A.; RAMÍREZ, L.; COSTA, M.A.; COELHO, V.T.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; TAVARES, C.A.; BONAY, P.; NIETO, C.G.; ABÁNADES, D.R.; ALONSO, C.; SOTO, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 16, n. 12, p. 1774-80, 2010.

COLLATZ, E.; ULBRICH, N.; TSURUGI, K.; LIGHTFOOT, H.N.; MACKINLAY, W.; LIN, A.; WOOL, I.G. Isolation of eukaryotic ribosomal proteins: Purification and characterization of the 40 S ribosomal subunit proteins Sa, Sc, S3a, S3b, S5', S9, S10, S11, S12, S14, S15, S15', S16, S17, S18, S19, S20, S21, S26, S27', and S29. *J. Biol. Chem.*, v. 25, n. 24, p. 9071-80. 1977.

CORDEIRO-DA-SILVA, M.C.; BORGES, E.; GUILVARD, A.; OUAISSI, J. Dual role of the *Leishmania major* ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infect. & Immun.*, v. 69, p. 6588-96. 2001.

COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood*. v. 95, n. 5, p. 1642-51. 2000.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol. Today*, v. 16, p. 142-44, 2000.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis :epidemiology and public health aspects. *Wld. Hlth Statist. Quart.*, v. 45, p. 267-75.1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, p. 305-18, 2004.

DUMAS, C.; MUYOMBWE, A.; ROY, G.; MATTE, C.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages in vitro and delays disease development in mice. *Infect. & Immun.*, v. 71, P. 6499-09, 2003.

FRAGAKI, K.; SUFFIA, I.; FERRUA, B.; ROUSSEAU, D.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Immunization with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine*, v. 19, p. 1701-09, 2001.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALEZ, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LIANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann. Intern. Med.*, v. 113, p. 934-40, 1990.

FERNANDES, A.P.; HERRERA, E.C.; MAYRINK, W.; GAZZINELLI, R.T.; LIU, W.Y.; COSTA, C.A.; TAVARES, C.A.P.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; GENTZ, R.; NASCIMENTO, E. Immune responses induced by a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* recombinant antigen in mice and lymphocytes from vaccinated subjects. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 39, p.70-78, 1997.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A.; MICHALICK, M.S.; DE FREITAS, E.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.E.

F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*. v. 26, n. 46, p. 5888-95, 2008.

FOLLADOR, C.; ARAUJO, G.; ORGE, L.H.; CHENG, L.P.; DE CARVALHO, O.; BACELLAR, R.P.; ALMEIDA, E.M. CARVALHO, J. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Vaccine*, v. 20, p. 1365-68, 2002.

GARCEZ, L.M.; GOTO, H.; RAMOS, P.K.; BRIGIDO, M.C.; GOMES, P.A.F.; SOUZA, R.A.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SHAW, J.J. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 1755-64, 2002.

GARCÍA, A.L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K.W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; BAÑULS, A.L.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J.C. American Tegumentary Leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical polymorphism. *Infect. Genet. Evol.*, v. 5, n. 2, p. 109-16, 2005.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis, *Indian J. Med. Res.* v. 123, p. 439-54, 2006.

GHALIB, H. & MODABBER, F. Consultation meeting on the development of therapeutic vaccines for post-Kalazar dermal leishmaniasis. *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, v. 17, p. 6-7, 2007.

GONZALO, R.M.; RODRÍGUEZ, J.R.; RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect.*, v. 3, n. 9, p. 701-11, 2001.

GRIMALDI, Jr, G.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 41, p. 687-25, 1989.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, p. 230–50, 1993.

GROGL, M.; MARTIN, R.K.; ODUOLA, A.M.J.; MILHOUS, W.K.; KYLE, D.E. Characteristics of multidrug resistance in Plasmodium and Leishmania: detection of P-glycoprotein-like components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 45, p. 98-111, 1991.

GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*. v. 20, n 1-2, p. 59-66, 2001.

GURUNATHAN, S.; SACKS, D.L.; BROWN, D.R.; REINER, S.L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R.A. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, v. 186, p. 1137-47, 1997.

HANDMAN E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 14, n. 2, p. 229-43, 2001.

HARITH, A.E.; KOLK, A.H.; KAGER, P.A.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R., KIUGU, S.; KIUGU, S.; LAARMAN, J.J. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, n. 4, p. 583-36, 1986.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in

vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 88, p. 7011-5, 1991.

HERATH, S.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite. Immunol.*, v. 11, p. 559-67, 2003.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 89, p. 55-73, 1995.

IBORRA, S.; SOTO, M.; CARRIÓN, J.; NIETO, A.; FERNÁNDEZ, E.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect. & Immun.*, v. 71, n. 11, p. 6562-72, 2003.

IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; ANDERSON, C.; ALONSO, C.; SACKS, D.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect. & Immun.*, v. 73, n. 9, p. 5842-52, 2005.

IBORRA, S.; PARODY, N.; ABÁNADES, D.R.; BONAY, P.; PRATES, D.; NOVAIS, F.O.; BARRAL-NETTO, M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes & Infect.*, v. 10, n. 11, p. 1133-41, 2008.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66, p. 338-345, 2002.

JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, v. 165, p. 364-72. 2000.

JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U.; HUNTER, C.A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 Interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. & Immun.*, v. 70, p. 2151-58, 2002.

JULIA, V.; GLAICHENHAUS, N. CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect & Immun.*, v. 67, n. 7, p. 3641-4, 1999.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes & Infection*, v. 2, p. 1765-73, 2000.

KANE, M.M. & MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 7, p. 26-31, 2000.

KAYE, P. M.; CURRY, A.J.; BLACKWELL, J.M. Differential production of Th1 and Th2-derived cytokines does not determine genetically controlled vaccine induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* v. 146, p. 2763–70, 1991.

KHAMESIPOUR, A.; DOWLATI, Y.; ASILIAN, A.; HASHEMI-FESHARKI, R.; JAVADI, A.; NOAZIN, S.; MODABBER, F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, v. 23, n. 28, p. 3642-48, 2005.

KHOSHGOO, N.; ZAHEDIFARD, F.; AZIZI, H.; TASLIMI, Y.; ALONSO, M.J.; RAFATI, S. Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum*

infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine*, v. 26, p. 5822-29, 2008.

KEMP, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl.*, v. 105, p. 5-33, 1997.

KIMA, P.E.; CONSTANT, S.L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K.S.; HABERMAN, A.M.; SHLOMCHIK, M.J.; McMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 191, p. 1036-67, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-85, 1970.

LEHMANN, J.; ENSSLE, K.H.; LEHMANN, I.; EMMENDÖRFER, A.; LOHMANN-MATTHES, M.L. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J. Interferon Cytokine Res.*, v. 20, n. 1, p. 63-77, 2000.

MANSON-BAHR, P.E.C. Diagnosis. In: Peters, W. and Killick-Kendrick (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine*, v. 2, Academic Press, Inc., New York, 1987.

MARQUES-DA-SILVA, E.A.; COELHO, E.A.; GOMES, D.C.; VILELA, M.C.; MASIOLI, C.Z.; TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; AFONSO, L.C.; REZENDE, S.A. Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol. Res.*, v. 98, n. 1, p. 67-74, 2005.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today.*, v. 16, n.5, p. 188-9, 2000.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol. Rev.*, v. 201, p. 206-24, 2004.

MCFARLANE, J.; BLAXTER, M.L.; BISHOP, R.P.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur. J. Biochem.*, v. 20, n. 190, p. 377-84, 1990.

MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E.L.T.; HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MÉNDEZ, S.; GURUNATHAN, S.; KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MOGA, M.A.; SKEIKY, Y.A.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; SEDER, R.A.; SACKS, D. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J. Immunol.*, n. 166, v. 8, p. 5122-8, 2001.

MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection, *Eur. J. Immunol.*, v. 31, p. 2848-56, 2001.

MURRAY, H.W.; CERVIA, J.S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.P.; STOECKLE, M.Y.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* v. 95, p. 1183-92, 1995.

MURRAY, H.W. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, n. 175, p. 1477-79, 1997.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. & Immun.*, n. 70, p. 6284-93, 2002.

OLIVEIRA, D.A.; SILVA, V.; BORJA-CABRERA, G.P.; PONTES, N.N.C.; SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; SOUZA, C.B.P. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kalazar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v. 19, p. 1082-92, 2001.

PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania Mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J. Immunol.*, n. 171, p. 3705-10, 2003.

PALATNIK DE SOUZA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, n. 26, p. 1709-24, 2008.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; BRETON, M.; KUNDING, C.; DUMAS, C.; FILLIONI, E.T. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* biopterin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect. & Immun.*, n. 70, p. 62-8, 2002.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; PARAGUAI-DE-SOUSA, E.; GOMES, E.M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, n. 2, p. 547-51, 1994.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; CASAS, C.P.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; TINOCO, L.W.; DA SILVA, B.P.; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing Quillaja saponaria sapogenins. *Vaccine*. v. 22, n. 19, p. 2470-9, 2004.

PARAGUAI DE SOUZA, E.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. v. 19, n. 24, p. 3104-15, 2001.

PATERAKI, E.; PORTOCALA, R.; LABROUSSE, H.; GUESDON, J.L. Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. *Infect & Immun.*, v. 42, n. 2, p. 496-500, 1983.

PESSÔA, S.B. & MARTINS, A.V. Gênero *Leishmania*; *Leishmania donovani*/Leishmaniose Visceral ou Calazar. In: *Parasitologia Médica*. 11^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

RAFATI, S.; SALMANIAN, A.H.; TAHERI, T.; VAFA, M.; FASEL, N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine*, v. 19, p. 3369-75, 2001.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis, *J. Immunol.*, v. 150, p. 2322-31, 1993.

RAJPUT, Z.I.; HU, S.H.; XIAO, C.W.; ARIJO, A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, v. 8, n. 3, p. 153-61, 2007.

RAMÍREZ, L.; IBORRA, S.; CORTÉS, J.; BONAY, P.; ALONSO, C.; BARRAL-NETTO, M.; SOTO, M. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010.

RAMIRO, M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine.* , v. 21, n. 20, p. 2474-84, 2003.

REED S.G. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p. 471-78, 1996.

REED, S.G.; COLER, R.N.; CAMPOS-NETO, A. Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. *Expert. Rev. Vaccines*, v. 2, n. 2, p. 239-52, 2003.

REES, P.H. & KAGER, P.A. Visceral leishmaniasis and post-kalazar dermal leishmaniasis. In: Peters, W. and Killick-Kendrick (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1987.

REQUENA, J.C.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections, *Parasitol. Today*, v. 16, p. 246-50, 2000.

ROBERTS, L.J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S.J. Leishmaniasis. *Brit. Med. J.*, v. 321, p. 801-4, 2000.

ROBERTS, M.T.; STOBER, C.B.; MCKENZIE, A.N.; BLACKWELL, J.M. Interleukin- 4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine *Leishmania major* infection. *Infect. & Immun.*, v. 73, p. 7620-28, 2005.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 845-58, 2002.

SAHA, B.; BASAK, S.K.; ROY, S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. III. Cytokine-mediated regulation of parasite replication. *Scand. J. Immunol.*, v. 37, n. 2, p. 155-8, 1993.

SAHA, B.; SAINI, A.; GERMOND, R.; PERRIN, P.J.; HARLAN, D.M.; DAVIS, T.A. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *Eur. J. Immunol.*, v. 29, n. 7, p. 2319-29, 1999.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity

or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, v. 168, p. 1675-84, 1988.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. *J. Immunol.*, v. 139, p. 3118-25, 1987.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, v. 260, p. 496-7, 1993

SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. *Immunol. Res.*, v. 27, p. 489-498, 2003.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; DE CASTRO, J.; GOMES, C.M.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 31, n. 8, p. 423-31, 2009.

SKEIKY, Y.A.; BENSON, D.R.; ELWASILA, M.; BADARO, R.; BURNS JR, J.M.; REED, S.G. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins, *Infect. & Immun.*, v. 62, p. 1643-51, 1994.

SKEIKY, Y.A.; COLER, R.N.; BRANNON, M.; STROMBERG, E.; GREESON, K.; CRANE, R.T.; WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine.*, v. 20, n. 28, p. 3292-303, 2002.

SJÖLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 160, p. 3949-3957, 1998.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY Jr., B.L.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; McMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, v. 158, p. 5374-83, 1997.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; GOMEZ, L.C.; NAVARRETE, I.; ALONSO, C. Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *Eur. J. Biochem.*, v. 205, n. 1, p. 211-16, 1992.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; GARCIA, M.; GOMEZ, L.C.; NAVARRETE, I.; ALONSO, C. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J. Biolog. Chem.*, v. 268, n. 29, p. 21835-843, 1993.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; QUIJADA, L.; ANGEL, S.O.; GOMEZ, L.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; ALONSO, C. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 100, n. 2, 246-52, 1995.

SOTO, M.; RAMIREZ, L.; PINEDA, M.; GONZÁLEZ, V.; ENTRINGER, P.; INDIANI DE OLIVEIRA, C.; NASCIMENTO, I.; SOUZA, A.; CORVO, L.; ALONSO, C.; BONAY, P.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, A.; IBORRA, S. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection, *Scho. Res. Exch.*, Article ID 173039, 2009.

SOUZA, A.E.; BARRES, P.A.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. (1994) Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 63, p. 213-20, 1994.

STÄGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 165, p. 7064-71, 2000.

SUKUMARAN, B.; TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine.*, v. 21, n. 12, p. 1292-9, 2003.

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Curr. Mol. Med.*, v. 4, n. 6, p. 667-79, 2004.

SUN, H.X. ; XIE, Y. ; YE, Y.P. ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine.*, v. 27, n. 33, p. 4388-401, 2009.

TAVARES, CA.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, v. 3, p. 657-67, 2003.

TAYLOR, A.P.; MURRAY, H.W. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice, *J. Exp. Med.* v. 185, p. 1231-39, 1997.

TCHÓRZEWSKI, M. The acidic ribosomal P proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 34, n. 8, 911-5, 2002.

TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 24, p. 2409-2416, 2006.

TSURUGI, K.; COLLATZ, E.; WOOL, E.G.; LIN, A. Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins L4, L5,

L7, L9, L11, L12, L13, L21, L22, L23, L26, L27, L30, L33, L35', L37, and L39. *J. Biol. Chem.*, v. 251, n. 24, p. 7940-6, 1976.

TSURUGI, K.; COLLATZ, E.; TODOKORO, K.; ULBRICH, N.; LIGHTFOOT, H.N.; WOOL, I.G. Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J. Biol. Chem.*, v. 253, n. 3, p. 946-55, 1978.

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S., ROWTON, E.D. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.*, v. 194, p. 331-42, 2001.

VELEZ, I.D.; GILCHRIST, K.; ARBELAEZ, M.P.; ROJAS, C.A.; PUERTA, J.A.; ANTUNES, C.M. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 99, p. 593-8, 2005.

VILELA, M.D.E.C.; GOMES, D.C.; MARQUES-DA-SILVA, E.D.E.; SERAFIM, T.D.; AFONSO, L.C.; REZENDE, S.A. Successful vaccination against *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice with freeze-thawed *Leishmania* antigen and *Corynebacterium parvum*. *Acta Trop.*, v. 104, n. 3, p. 133-9, 2007.

VOULDOUKIS, I.; BÉCHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; SILVAO, D.A.; DEBRÉ, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.*, v. 27, p. 860-65, 1997.

WEIGLE, K. & SARAVIA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p. 433-50, 1996.

WEISER, W.Y.; VAN NIEL, A.; CLARK, S.C.; DAVID, J.R.; REMOLD, H.G. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, v. 166, n. 5, p. 1436-46, 1987.

WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; ANDERSEN, K.P.; WEINSTOCK, J.V.; METWALI, A.; ALI, K.M.; DONELSON, J.E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect & Immun.* v. 63, n. 5, p. 2062-9, 1995.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathog.*, v. 38, p. 147-60, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The disease and its impact. World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The disease and its impact. World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2003.

XU, D.; LIEW, F.Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology.*, v. 84, n. 2, p. 173-6. 2005.

ZANIN, F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; SILVA COSTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes & Infect.*, v. 9, n. 9, p. 1070-7, 2007.

10. Anexos

- 10.1. Certificado da aprovacao do projeto intitulado “*Proteinas ribossomais de Leishmania (LRPs) empregada no diagnostico laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina e no desenvolvimento de vacinas*” pelo comite de etica em expermientacao animal (CETEA/UFMG).
- 10.2. Artigo publicado na revista *Microbes and Infection* em 2010, intitulado “*Vaccination with the Leishmania infantum ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis challenge*”.