

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

THAÍS TEODORO DE OLIVEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA PROTETORA INDUZIDA PELA IMUNIZAÇÃO
DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE ENOLASE
DE *Leishmania braziliensis* CONTRA A INFECÇÃO CAUSADA PELA ESPÉCIE
*Leishmania infantum***

Belo Horizonte

2017

THAÍS TEODORO DE OLIVEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA PROTETORA INDUZIDA PELA IM
UNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE
ENOLASE CONTRA A INFECÇÃO CAUSADA PELA ESPÉCIE *Leishmania*
*infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Leishmanioses

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

BELO HORIZONTE

2017

Santos, Thaís Teodoro de Oliveira.
SA237a Avaliação da eficácia protetora induzida pela imunização de Camundongos BALB/C com a proteína recombinante enolase contra a infecção causada pela espécie *Leishmania infantum* [manuscrito] / Thaís Teodoro de Oliveira Santos. -- Belo Horizonte: 2017.
62f.: il.
Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Coorientador (a): Mariana Costa Duarte.
Área de concentração: Imunologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Fosfopiruvato Hidratase. 2. Vacinas. 3. *Leishmania braziliensis*. 4. *Leishmania infantum*. 5. Imunidade Heteróloga. 6. Imunidade nas Mucosas. 7. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Duarte, Mariana Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA THAÍS TEODORO DE OLIVEIRA SANTOS

Realizou-se, no dia 13 de julho de 2017, às 14:00 horas, sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 320ª defesa de dissertação, intitulada “*Avaliação da eficácia protetora induzida pela imunização de Camundongos BALB/C com a proteína recombinante Enolase contra a infecção causada pela espécie Leishmania Infantum*”, apresentada por THAÍS TEODORO DE OLIVEIRA SANTOS, número de registro 2016658694, graduada no curso de CIENCIAS BIOLÓGICAS/NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador (UFMG), Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida (UFMG), Dra. Mariana Santos Cardoso (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 13 de julho de 2017.


Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho


Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida


Dra. Mariana Santos Cardoso

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me guiar através da sua energia tão presente e constante em minha vida. A espiritualidade, pelo estilo de vida que sigo e que me trouxe enormes mudanças.

Ao meu pai, Alcino, que hoje não está mais presente, mas que me forneceu toda a base com bastante simplicidade e humildade para que eu caminhasse bem e de forma independente. A minha mãe Raquel por ter hoje o papel de pai e mãe ao mesmo tempo e por estar sempre comigo;

Aos meus irmãos, Pedro e Gabriela, que são meu maior motivo de orgulho e por estarmos sempre um estimulando ao outro a buscar cada vez mais o conhecimento.

Agradeço aos meus Orientadores, Eduardo e Mariana, pela oportunidade de continuar os estudos com pessoas tão experientes e dedicadas.

Aos amigos de laboratório que sempre estiveram comigo na bancada, faça chuva ou faça sol.

E ao meu querido Partido dos Trabalhadores (PT) que trouxe enormes mudanças ao Brasil e que graças a ele muita oportunidade foi concedida aos menos favorecidos.

“O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente”.

Mahtma Gandhi

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Por ser um grave problema de Saúde Pública e ainda apresentar problemas nos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento dos doentes; o desenvolvimento de vacinas pode se apresentar como uma medida adicional e efetiva para o controle da doença. Um grande desafio encontrado no desenvolvimento de vacinas para as leishmanioses é a baixa eficácia dos antígenos em proteger contra diferentes espécies dos parasitos, uma vez que os candidatos, geralmente, oferecem proteção espécie-específica. Dessa forma, no presente estudo, a proteína enolase de *Leishmania braziliensis* foi expressa e avaliada como candidata vacinal contra a infecção causada pela espécie *Leishmania infantum*. A proteína recombinante (rEnolase) foi avaliada em associação ao adjuvante saponina e os ensaios de imunização foram realizados em camundongos BALB/c. Três doses, com intervalos de 15 dias, foram administradas e, 30 dias após a última dose, metade dos animais dos grupos foram eutanasiados para avaliação da imunogenicidade, e a outra metade foi infectada com promastigotas em fase estacionária dos parasitos. As avaliações parasitológica e imunológica dos animais infectados foram realizadas após 10 semanas da infecção. Os resultados mostraram que a vacina induziu uma resposta imune do tipo Th1 com níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF e uma produção de óxido nítrico pelas células fagocíticas após a estimulação *in vitro* com rEnolase ou usando o extrato solúvel dos parasitos, quando uma ELISA de captura e análises por citometria de fluxo foram realizadas. Os animais vacinados, quando comparados aos grupos controles, mostraram uma baixa carga parasitária no fígado, baço, medula óssea e linfonodos através das técnicas de diluição limitante e qPCR. Esses animais apresentaram baixos níveis de citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-10, e de anticorpos do isotipo IgG1. A proteção foi também associada com a produção de IFN- γ por células T CD4⁺. Desse modo, conclui-se que a proteína recombinante enolase de *L. braziliensis* ofertou proteção heteróloga contra *L. infantum* e poderia ser considerada como um candidato vacinal contra a leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Enolase; Vacina; *Leishmania infantum*; *Leishmania braziliensis*; proteção heteróloga; resposta imune.

ABSTRACT

The leishmaniasis are a complex of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Because it is a serious public health problem and still presents problems in the prevention and diagnosis methods, and treatment of the patients, the development of vaccines could be presented as an additional and effective measure for the control of the disease. A major challenge encountered in the development of vaccines for leishmaniasis is the low efficacy of antigens in protecting against different species of parasites, since they usually offer species-specific protection. Thus, in the present study, the enolase protein of *Leishmania braziliensis* was expressed and evaluated as a vaccine candidate against *Leishmania infantum* infection. The recombinant protein (rEnolase) was evaluated in combination with the saponin, and immunizations were performed on BALB/c mice. Three doses at 15 day intervals were administered and, 30 days after the last dose, half of the animals in the groups were euthanized for immunogenicity evaluations, and the other animals were infected with stationary-phase promastigotes of the parasites. The parasitological and immunological evaluations were performed after 10 weeks of infection. The results showed that the vaccine induced a Th1 immune response with elevated levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, and a production of nitric oxide by phagocytic cells, following the *in vitro* stimulation with rEnolase or using the soluble extract of the parasites, when an ELISA capture and flow cytometry were performed. The vaccinated animals, when compared to the control groups, showed a low parasite load in the liver, spleen, bone marrow and lymph nodes, through the limiting dilution and *q*PCR techniques. These animals also had low levels of Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-10, and IgG1 isotype antibodies. Furthermore, the protection was associated with an IFN- γ production by CD4⁺ T cells. Thus, it is concluded that the recombinant enolase protein of *L. braziliensis* can offered heterologous protection against *L. infantum* and could well be considered as a vaccine candidate against visceral leishmaniasis.

Keywords: Enolase; Vaccine; *Leishmania infantum*; *Leishmania braziliensis*; heterologous protection; immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas promastigota e amastigota do protozoário <i>Leishmania</i>	16
Figura 2. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.....	17
Figura 3. Purificação da proteína recombinante enolase (rEnolase)	35
Figura 4. Resposta imune após as imunizações e antes da infecção.....	37
Figura 5. Resposta imune induzida após a infecção desafio por <i>Leishmania infantum</i>	39
Figura 6. Produção intracelular de citocinas pelos linfócitos T.....	41
Figura 7. Produção de Nitrito	42
Figura 8. Avaliação da carga parasitária no baço dos animais imunizados e infectados utilizando a técnica de diluição limitante.	44
Figura 9. Avaliação da carga parasitária no baço dos animais imunizados e infectados utilizando a técnica de PCR quantitativo (<i>qPCR</i>).	45
Figura 10. Ciclo biológico heteroxeno do protozário <i>Leishmania</i>	56
Figura 11. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. Vetor de clonagem utilizado para a obtenção da proteína recombinante, p-GEM-T Easy Vector Systems (Promega).....	70
Figura 13. Vetor de expressão utilizado para a obtenção da proteína recombinante, pET28a(+) TEV.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos hospedeiros e vetores das principais espécies de <i>Leishmania</i> no Brasil.....	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - FERRAMENTA DE BUSCA DE ALINHAMENTO LOCAL BÁSICO
CETEA – COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
DMEM – DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM
ELISA – ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO POR LIGAÇÃO ENZIMÁTICA
FLPC – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
GM-CSF – FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS
HIV – VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
ICB – INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IFN- γ – INTERFERON – GAMA
IgG1 – IMUNOGLOBULINA 1
IgG2a – IMUNOGLOBULINA 2a
IL-4 – INTERLEUCINA 4
IL-17 – INTERLEUCINA 17
IPTG - ISOPROPIL-BETA-D-TIOGALACTOPIRANOSÍDEO
LM – LEISHMANIOSE MUCOSA
LPG – LIPOFOSFOGLICANO
LT – LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
LVC – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
LV – LEISHMANIOSE VISCERAL
mAb – ANTICORPO MONOCLONAL
MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
NEB – NEW ENGLAND BIOLABS
OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PAMP – PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS
PBS – TAMPÃO FOSFATO SALINO
PCLV – PROGRAMA DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL
PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
qPCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA
SDS-PAGE – DODECIL-SULFATO DE SÓDIO - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
SLA – EXTRATO PROTEICO SOLÚVEL DE LEISHMANIA
T CD4+ – LINFÓCITO T COM CLUSTER DE DIFERENCIAÇÃO 4
T CD8+ – LINFÓCITO T COM CLUSTER DE DIFERENCIAÇÃO 8

TLR – RECEPTOR TIPO TOLL

TNF- α – FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA.....	22
1.2 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA AS LEISHMANIOSES	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E METODOLOGIA.....	28
3.1 COMITÊ DE ÉTICA	28
3.2 PARASITOS	28
3.3 CLONAGEM EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA XP_001563419.1	28
3.3.1 CLONAGEM DA PROTEÍNA XP_001563419.1	28
3.3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	31
3.4 IMUNIZAÇÃO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	32
3.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE	32
3.5.1 PRODUÇÃO DE CITOCINAS	32
3.5.2 PRODUÇÃO DE NITRITO	33
3.5.3 CITOMETRIA DE FLUXO	33
3.5.4 RESPOSTA HUMORAL.....	33
3.6 CARGA PARASITÁRIA.....	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÃO	47
6 PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE.	566
ANEXO.....	70

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes a mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* ¹. Pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Triponosomatidae, são protozoários unicelulares, digenéticos e encontrados nas formas promastigota e paramastigota, nos hospedeiros invertebrados, e amastigota nos hospedeiros vertebrados ².

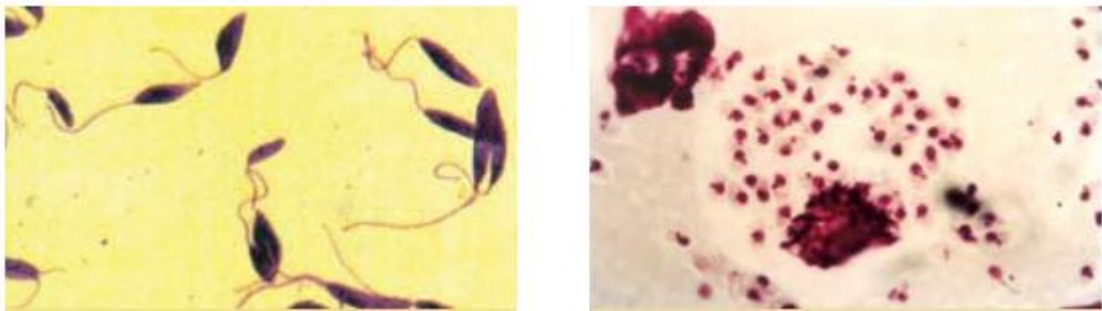


Figura 1. Formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) do protozoário *Leishmania*

38.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses podem ser classificadas em três diferentes formas clínicas: cutânea, mucocutânea, e visceral ³. Elas são prevalentes em 98 países e três territórios dos cinco continentes do mundo ⁴. Anualmente cerca de 1.3 milhões de casos novos são registrados, sendo 300.000 da forma visceral e um milhão com a forma cutânea e mucocutânea. A forma cutânea (LC) ocorre principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Tunísia; sendo caracterizada pela ocorrência de lesão ulcerosa, indolor e de difícil cicatrização. A forma mucosa (LM), com lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas, está restrita ao Novo Mundo, principalmente, no Brasil, Peru e Bolívia. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença por apresentar aspectos sistêmicos, como o aumento significativo do tamanho do baço, fígado e até mesmo dos gânglios linfáticos. Cerca de 90% dos casos de visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Sudão do Sul ³. Por ser uma doença negligenciada, dentre os 1.3 milhões de casos estimados, apenas cerca de 600.000 são realmente notificados (WHO, 2013).

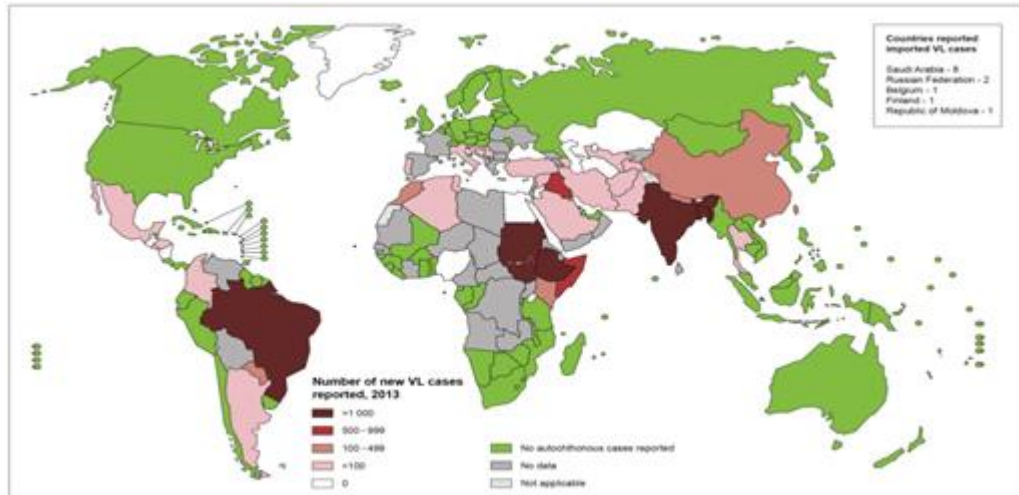


Figura 2. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.
Fonte: WHO; Leishmaniasis control programme. Annual country reports (2013).

Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. A doença afeta principalmente pessoas de baixa renda na África, Ásia e América Latina, e está associada a vários fatores, como a espécie do agente etiológico envolvido, subnutrição ⁶, deslocamento populacional, comprometimento do sistema imunológico ⁷, genética do hospedeiro, a ausência de recursos e outros ⁸. Há uma estimativa que cerca de 20.000 a 40.000 pessoas morrem anualmente dessa doença ⁵.

Embora a doença cutânea seja a forma mais comum da doença, a Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a mais grave, podendo ser fatal quando não tratada ⁹. Também conhecida como Kala-azar, a LV é causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, que incluem as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo essa a principal espécie causadora da doença no Brasil. No país, elas são consideradas um grave problema de Saúde Pública ¹⁰, uma vez que respondem por 90% dos casos de LV notificados na América Latina e por apresentar aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados; em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste ^{4,11}.

Os parasitos causadores das leishmanioses são protozoários digenéticos que realizam seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado ¹². A infecção ocorre através da picada de insetos, flebotomíneos fêmeas, da espécie *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo ¹³. O ciclo se inicia quando fêmeas infectadas do inseto vetor flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* regurgitam as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo ¹⁴. Esses insetos possuem o aparelho bucal curto e rígido, adaptado para dilacerar tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado, o que proporciona a obtenção de um misto de sangue, linfa e restos celulares durante a

alimentação, importante para a ingestão das formas infectantes. A saliva inoculada neste ambiente possui componentes biológicos que atuam com ação anticoagulante, vasodilatador e anti-agregante plaquetário, favorecendo o fluxo de sangue e acúmulo de linfa. As formas promastigotas metacíclicas infectam ou são tomadas por células do sistema fagocítico mononuclear através de receptores de superfície. No interior dessas células, se transformam nas formas amastigotas dentro do vacúolo digestivo, capazes de se desenvolverem e multiplicarem por divisões binárias sucessivas ^{14,15}.

Na ausência de um controle de multiplicação, ocorre a ruptura das células parasitadas, resultando na liberação das formas amastigotas para que possam infectar ou serem tomadas por novas células do hospedeiro. Um inseto vetor não infectado ao realizar o repasto sanguíneo pode ingerir, juntamente com o sangue do hospedeiro, essas formas do parasito, presentes no sangue ou linfa, as quais em seu trato intestinal se desenvolvem em promastigotas curtas e largas, paramastigotas arredondadas e por último nas promastigotas metacíclicas¹⁶. Essas formas promastigotas metacíclicas podem infectar um novo hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo, concluindo assim o ciclo biológico (APÊNDICE I).

Os flebotomíneos, também conhecidos como mosquito-palha, são encontrados em regiões intertropicais e temperadas no mundo. A fêmea põe seus ovos nas tocas de determinados roedores, em casca de árvores velhas, edifícios arruinados, rachaduras nas paredes das casas, abrigos de animais e até mesmo no lixo doméstico, onde as larvas podem encontrar a matéria orgânica, calor e umidade que necessitam para se desenvolverem. Para realizarem a hematofagia, geralmente, a atividade é crepuscular e noturna, essas fêmeas podem percorrer distâncias de até centenas de metros ao redor de seu habitat ¹⁷.

Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos comprovadas como vetores dos parasitos causadores de leishmanioses no mundo ³, sendo que algumas destas possuem estreita relação com algumas espécies de *Leishmania*, bem como seus reservatórios ¹⁸, conforme é mostrado na Tabela 1.

É uma doença relacionada não apenas a fatores climáticos, mas também com as mudanças ambientais como desflorestamento, construção de barreiras, esquemas de irrigação e ao processo de urbanização ¹⁹, uma vez que esses fatores levam a uma mudança ou redução do espaço ecológico natural da doença, propiciando a sua expansão.

Tabela 1. Relação dos hospedeiros e vetores das principais espécies de *Leishmania* no Brasil. Fonte: Livro Parasitologia Humana; David Pereira Neves (2005) ²⁰.

Hospedeiros e vetores das principais espécies causadoras das Leishmanioses no Brasil				
Doença	Agente etiológico	Vetor	Hospedeiro silvestre	Hospedeiro urbano
Leishmaniose Tegumentar (cutânea/mucocutânea)	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Lutzomyia intermedia</i> <i>L. pessoai</i> <i>L. wellcomei</i> <i>L. whitmani</i>	Roedores	Roedores, equídeos e canídeos(cão)
	<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>Lutzomyia umbratilis</i> <i>L. anduzei</i>	Edentados e Marsupiais	-
	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> <i>L. olmeca</i> <i>nociva</i>	Roedores	-
	<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	Roedores	-
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania infantum</i> (<i>chagasi</i> *)	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Canídeos (cão, raposa e chacal), marsupiais, roedores, edentados	Canídeos (cães)
*Após a descrição como <i>L. chagasi</i> nas Américas, verificou-se que o agente é geneticamente idêntico à espécie <i>L. infantum</i> . Dessa forma, prevaleceu o sinônimo sênior ²¹ .				

Inicialmente, a LV tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte ¹⁰. E a ligação entre o ciclo doméstico e silvestre ocorre quando humanos se instalam próximos às margens de florestas e porque alguns reservatórios silvestres possuem hábitos sinantrópicos ^{22,23}. No ambiente silvestre, os principais reservatórios do parasito são as raposas (*Dusicyon vetulus*

e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*)^{24,25}. Já na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção, precedendo a infecção em humanos²⁶.

Com relação às formas clínicas da LV, ela pode se apresentar de modo assintomático, agudo ou crônico. Os indivíduos assintomáticos desenvolvem sintomatologias pouco específicas, como febre baixa, tosse seca, diarreia, sudorese com a cura de forma espontânea ou a manutenção do parasito sem evolução clínica durante a vida. Esses casos geralmente são de difícil identificação e conseqüente tratamento e representa a maior parcela da população infectada vivendo em áreas endêmicas. Na forma aguda, pode-se observar febre alta, palidez de mucosas e hepatoesplenomegalia discretas. Pode ser confundida, clinicamente, com outras doenças, como malária, febre tifoide e doença de Chagas²⁷. E por último temos a forma crônica ou Kala-azar clássica de evolução prolongada. Esta se caracteriza por febre irregular, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, cefaleia, dores musculares, dentre outros sintomas^{1,28}.

No cão, a doença se apresenta mais comumente de forma sistêmica e crônica, porém a evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito em poucas semanas²⁷. Esses animais são classificados, com relação aos sinais clínicos apresentados, como cães assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos, oligossintomáticos, com a presença de poucos sintomas como pequena perda de peso e pelo opaco, e por último em sintomáticos, onde apresentam praticamente todos os sintomas da doença, como as alterações cutâneas, linfadenopatia, onicogrifose, vômito, alopecia, emagrecimento, febre, palidez de mucosas, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores²⁹.

A forma assintomática da doença pode atingir entre 40 a 60% da população de animais soropositivos³⁰. Há uma estimativa de que três de cinco cães infectados e assintomáticos transmitem o parasito para os insetos vetores, e essa taxa de transmissão não altera de forma significativa entre os grupos de animais assintomáticos e sintomáticos. Dessa forma, a leishmaniose visceral canina (LVC) não é apenas um problema veterinário, uma vez que há uma correlação direta entre a prevalência da doença nos cães e sua incidência no homem³¹.

Devido a notificação compulsória dessa doença e a evolução grave das formas clínicas, é necessário um diagnóstico preciso e precoce seguida do tratamento da doença. Porém muitos métodos diagnósticos não apresentam resultados rápidos, além de uma baixa sensibilidade de detectar o parasito em pacientes assintomáticos ou até mesmo uma baixa especificidade ao apresentar reação cruzada com outros Tripanosomatídeos, como o *Tripanosoma cruzi*³²⁻³⁴. Quanto ao tratamento, não é recomendado para os cães, uma vez que podem permanecer como reservatórios do parasito³⁵.

Já para o tratamento no homem existem duas formulações de antimoniato disponíveis para o tratamento da LV: estibogluconato de sódio e antimoniato-N-metil

glucamina, que apresentam boa eficácia terapêutica. No Brasil, apenas o antimoniato-N-metil glucamina está disponível, em conjunto com a anfotericina B, como uma droga alternativa, sendo essa atualmente disponibilizada pelo Ministério da Saúde sob duas formas: o desoxicolato de anfotericina B e lipossomal. Apesar de serem drogas eficazes, a forma lipossomal apresenta um alto custo e as demais causam efeitos colaterais graves, principalmente, relacionados ao sistema cardiovascular, hepático e renal ³⁶. Além disso, o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos está aumentando rapidamente em todo o mundo, não induzindo uma cura completa dos pacientes. Portanto, há uma grande necessidade ainda de novas terapias mais seguras e eficazes ³⁷.

No Brasil, temos o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) que visa reduzir as taxas de letalidade da doença, que vem aumentando gradativamente, passando de 6,7% em 2012 para 7,8% em 2015, e o grau de morbidade da forma visceral da doença através de medidas que devem ser empregadas em conjunto para uma maior eficácia na redução da incidência da doença. Entre essas medidas temos o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, mobilização social, controle da população de reservatórios, com a identificação de cães de sorologia positiva e a posterior eutanásia, e também do agente transmissor, com o uso de inseticidas de poder residual em domicílios ³⁸. Porém, tais medidas são empregadas esporadicamente e de forma isolada, e somado a baixa efetividade que elas apresentam, acabam gerando um entrave na redução da doença. Dessa forma, candidatos vacinais imunogênicos e de amplo espectro se tornam alvos de muitas pesquisas, pois podem atuar na prevenção e no controle dessa doença negligenciada.

1.1 Justificativa

Segundo a OMS, as doenças tropicais negligenciadas são um grupo diverso de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, custando o desenvolvimento da economia em bilhões de dólares a cada ano ³. Elas afetam, principalmente, as populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em estreito contato com vetores infecciosos e animais domésticos e pecuária ³⁹.

De acordo com relatórios da OMS, o trabalho de superação das doenças tropicais negligenciadas se baseia em cinco estratégias: tratamento preventivo, supervisão inovadora e intensa das doenças, controle de vetores e manejo de pesticidas, água potável segura, serviços básicos de saneamento, higiene e educação; serviços veterinários de saúde pública. Embora uma abordagem possa predominar para o controle de uma doença específica ou em um grupo de doenças, evidências já mostram que para um controle eficaz é necessária a combinação e implementação conjunta de várias dessas práticas ⁵.

Atualmente, no Brasil, temos as leishmanioses como destaque por serem doenças tropicais e terem se tornado um grave problema de Saúde Pública devido a sua expansão territorial, acometendo indivíduos de diferentes grupos de idades e onde já se observa o aumento da frequência de sua associação com outras doenças tropicais, como a esquistossomose mansônica ¹⁰.

As estratégias de controle estão centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico e eutanásia em cães soro positivos), bem como para a aplicação de inseticidas de poder residual, diagnóstico correto e tratamento adequado dos casos humanos registrados ³⁸. Devido à ineficiência de controle da doença, o desenvolvimento de vacinas preventivas de amplo espectro de proteção para cães pode se tornar uma medida fundamental na redução da incidência da doença em humanos e na sua transmissibilidade, por cães aos insetos vetores.

1.2 Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses

Atualmente, existem três vacinas disponíveis para prevenção da LVC. A vacina CaniLeish[®] (Virbac, França), produzida a partir de antígenos da *Leishmania infantum* (LiESP/QA-21), não é encontrada no mercado brasileiro, mas é utilizada por alguns países da Europa. Essa vacina apresentou eficácia na prevenção dos sinais clínicos em cães de cerca de 68.4%, com um nível de proteção de 92.7% e é bastante tolerada pelos animais, onde o maior evento adverso se apresenta como um leve inchaço local associado a dor local da injeção⁴⁰. Apesar de induzir uma resposta imune mediada por células T do subtipo Th1, importante para o combate ao parasito, ela não tem um caráter preventivo, mas sim terapêutico, pois ela não previne o cão da infecção primária pelo protozoário, apenas controla a carga parasitária no animal⁴¹ e o avanço de sinais clínicos graves. Assim, ela pode ser administrada antes ou após a infecção.

No Brasil, temos duas vacinas que foram aprovadas em 2014 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Leishmune[®] (Zoetis, Campinas, Brasil) e a Leish-Tec[®] (Hertape S.A., Juatuba, Brasil). A Leishmune[®] foi produzida a partir de uma fração glicoproteica purificada de *Leishmania donovani* associada ao adjuvante saponina. O seu uso foi suspenso no mesmo ano pelo MAPA em conjunto com o Ministério da Saúde, por não apresentar os requisitos da avaliação de um ensaio clínico de Fase III⁴². Já a Leish-Tec[®] se encontra atualmente no mercado e foi produzida a partir da proteína recombinante A2 de *Leishmania infantum* associada ao adjuvante saponina. A vacina apresenta 71% de eficácia e 43% na redução da transmissibilidade em estudos de fase III⁴¹.

Dessa forma, embora muitos pesquisadores tenham colocado esforços nas tentativas de encontrar uma alternativa eficiente para a prevenção da LVC, nenhuma vacina ainda tem se apresentado eficaz no controle da doença^{43,44}. A busca por alvos vacinais persiste, principalmente, por aqueles antígenos imunodominantes⁴⁵, que desencadeiam respostas do tipo Th1⁴⁶ e se apresentam conservados entre as espécies causadoras das leishmanioses, de forma a apresentar um amplo espectro de proteção.

Há a possibilidade de encontrar esses antígenos através da imunoproteômica, uma técnica que combina o Western-Blotting com a proteômica⁴⁷. Essa é uma abordagem utilizada atualmente, além de outros fins, para a identificação de proteínas antigênicas e imunogênicas de *Leishmania* para a posterior avaliação do seu potencial como candidato diagnóstico ou vacinal contra as leishmanioses⁴⁸⁻⁵⁰.

Em trabalhos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foi realizado um estudo utilizando a técnica de imunoproteômica, que apresentou como objetivo geral a identificação de proteínas antigênicas expressas nas formas amastigotas e promastigotas da espécie *Leishmania braziliensis*, para fins de emprego em testes sorológicos mais eficazes contra a LT⁵¹. A identificação ocorreu por meio do reconhecimento dos antígenos

por anticorpos presentes nos soros de pacientes com LT (formas cutânea e mucocutânea da doença).

Uma vez que essas proteínas foram identificadas por anticorpos de pacientes infectados, elas possuem também o potencial para serem testadas como alvos vacinais, por terem sido capazes de induzir resposta imune contra elas. Nas últimas décadas, tem-se emergido o uso de enzimas da via glicolítica como candidatos vacinais em diferentes estudos ^{52,53}. A proteína escolhida neste trabalho, enolase, foi reconhecida nos extratos proteicos de ambas as formas do protozoário no estudo imunoproteômico supracitado e foi avaliada como candidato vacinal contra a infecção por *L. infantum*.

A enolase, presente em *Archaea*, bactérias e eucariotos, apresenta uma importante função enzimática na glicólise, atuando na nona etapa, onde realiza a conversão da molécula 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (PEP) por uma reação de desidratação, ou na reação inversa durante a gliconeogênese; ou seja, é uma enzima essencial e presente em todos os organismos que realizam glicólise ou fermentação para obtenção de energia ⁵⁴. Além da localização citosólica, pode-se apresentar na superfície da membrana plasmática como receptor de plasminogênio, que pode ser convertido em plasmina, enzima envolvida em vários processos fisiológicos, como a degradação de fibrina e outros componentes da matriz celular do hospedeiro vertebrado. Essa ativação enzimática permite que o patógeno invada e dissemine dentro do hospedeiro. Dessa forma, enolase tem um papel fundamental não apenas na sobrevivência do parasito, mas também no mecanismo de invasão e estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero ^{55,56}.

Para o seu emprego em testes vacinais, é necessária a obtenção dessa proteína em larga escala, fazendo-se necessário o uso de técnicas da biologia molecular que permitam que a proteína seja produzida sob a forma recombinante ao utilizar a maquinaria de diferentes linhagens de bactérias, tais como *Escherichia coli* ⁵⁷. Além da vantagem da produção da proteína em larga escala, essa técnica também apresenta um baixo custo e uma resposta imune celular e humoral mais específica em relação ao uso de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). E apesar de existir outros métodos vacinais, como na vacina de DNA, as proteínas recombinantes são as únicas licenciadas para uso humano ⁴⁴.

Muitos estudos que exploram a patologia de várias doenças que envolvem tanto a medicina veterinária quanto a humana utilizam modelos animais. E a escolha de um modelo experimental é crítico para o sucesso dos estudos de vacinas contra as leishmanioses ⁴². Muitos são os modelos disponíveis, como roedores, cachorros e macacos, porém, nenhum reproduz com precisão o que acontece nos humanos ⁵⁸.

Apesar de camundongos diferirem no número de granulócitos no sangue periférico, que são as células que atuam na defesa primária, entre 13 e 24% ⁵⁹, quando comparado aos humanos, que apresentam cerca de 60%, eles apresentam as maiores

vantagens em um estudo primário devido ao seu fácil manuseio, baixo custo, tempo curto de experimentação, e uma ampla disponibilidade de reagentes para caracterizar a resposta imune ⁵⁸. Por esses motivos, e somando-se ao fato de o genoma murino ser o segundo mais estudado entre os mamíferos, perdendo apenas para o humano, camundongos BALB/c, uma linhagem isogênica e susceptível a infecção por *Leishmania* spp. ⁶⁰, foi o modelo experimental escolhido neste trabalho.

Para uma imunização bem sucedida, ou seja, que induza proteção contra as leishmanioses, é necessário que seja feita a escolha de um adjuvante apropriado para que atuem em conjunto com os alvos vacinais no desencadeamento da resposta imune protetora contra as leishmanioses. Os adjuvantes operam como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) e através de receptores como, por exemplo, os do tipo Toll (TLR), são reconhecidos pelas células dendríticas. A sinalização por TLR induz a célula dendrítica a expressar moléculas, incluindo moléculas coestimuladoras e citocinas, que são necessárias, além do antígeno, à ativação de linfócitos T virgens e à sua diferenciação em células efetoras ⁶¹. Dependendo da natureza do microorganismo que induz a resposta inicial, a célula dendrítica direciona a diferenciação do linfócito T virgem em tipos distintos de células efetoras, podendo ser dos subtipos Th1, Th2 ou Th17 que possuem as citocinas de assinatura, IFN- γ , IL-4 e IL-17, respectivamente ⁶².

O perfil de resposta associado à proteção do hospedeiro contra *Leishmania* é determinada pelo subtipo Th1, que é o repertório imune encontrado em pacientes assintomáticos, ou seja, aqueles que conseguem controlar a infecção sem o avanço da doença. Já pacientes com os sintomas clínicos graves apresentam o repertório imune do subtipo Th2, em que as células imunes não conseguem combater o parasito e reduzir a carga parasitária, propiciando o agravamento da infecção e causando a doença ^{63,64}.

Muitos estudos têm utilizado a saponina como adjuvante, sendo associada aos candidatos na indução de uma resposta imune contra as leishmanioses ⁶⁵⁻⁶⁸. A saponina é um glicosídeo proveniente do metabolismo secundário vegetal muito utilizado por induzir um perfil de resposta Th1 nos modelos animais ⁶⁹. Em altas doses pode ser tóxico e causar reações adversas, como uma inflamação local indesejada, dessa forma seu uso foi limitado ao modelo animal ⁷⁰. Porém, muitos estudos tem abordado seu uso associado a outras moléculas, como colesterol e fosfolipídios, formando o ISCOMATRIX, que possui uma aplicabilidade em vacinas humanas, principalmente, para o câncer, por desencadear um aumento da resposta imune e da apresentação cruzada em células dendríticas (Den Brok et al. 2016; Maraskovsky et al. 2009; Pearse and Drane 2004).

No entanto, antígenos que induzem um repertório imune para o subtipo Th1 são uma estratégia de maior interesse para o desenvolvimento de alvos vacinais contra a LV ⁵². Um desafio ainda encontrado para uma vacina contra as leishmanioses é a baixa eficácia

dos candidatos contra diferentes espécies de *Leishmania*, uma vez que esses alvos conferem uma proteção espécie-específica ⁷⁴.

Além disso, diferenças estruturais nos fatores de virulência entre as distintas espécies dos parasitos como, por exemplo, na diversidade da estrutura de lipofosfoglicanos (LPG) da superfície de *Leishmania*, que afetam os mecanismos de evasão no hospedeiro, dificultam o desenvolvimento de uma vacina protetora heteróloga ⁷⁵. Ao buscar na literatura, estudos mostram a utilização da proteína enolase de *Leishmania donovani* como alvo vacinal contra a LV causada pela mesma espécie ^{46,53}, além de outros patógenos como *Ascaris suum* ⁷⁶ e *Echinococcus granulosus* ⁷⁷. Dessa forma, houve o questionamento de se tal proteína seria capaz de induzir uma proteção heteróloga contra outras espécies de *Leishmania*. A partir desse questionamento, este trabalho propõe a avaliação da proteína enolase clonada de *Leishmania braziliensis* como um candidato vacinal contra a infecção experimental causada por uma espécie diferente de sua origem, *Leishmania infantum*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da proteína enolase de *Leishmania braziliensis*, XP_001563419.1, na proteção de camundongos BALB/c contra a infecção causada por *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* a presença de epitopos lineares preditos de linfócitos B e T para proteína de *Leishmania* (XP_001563419.1), previamente selecionadas por imunoproteômica, e verificar a conservação desses epitopos, utilizando programas de bioinformática (BepiPred 2.0, NetCTL 1.2 Server, NetMHCIIpan 3.2 Server).
- Obter a proteína recombinante através da expressão heteróloga em bactérias e purificação por cromatografia de afinidade.
- Avaliar o perfil da resposta imune celular gerada nos animais imunizados com as proteínas, antes e após uma infecção desafio com promastigotas estacionárias de *L. infantum*, através da dosagem de citocinas, resposta humoral, produção de espécies reativas de oxigênio nos macrófagos e avaliação da carga parasitária no fígado, baço, linfonodos drenantes e medula óssea dos animais;
- Avaliar o perfil de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 nos animais imunizados e desafiados após estimulação com o extrato solúvel de *L. infantum* através da técnica de citometria de fluxo.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), com o número de protocolo 333/2015, sendo o documento de aprovação apresentado no Apêndice II. Camundongos BALB/c com oito semanas de idade foram obtidos junto ao Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que se encontra no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e foram mantidos sob as devidas condições de manejo.

3.2 Parasitos

No presente estudo, as cepas BH46 de *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46) e M2904 de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) foram utilizadas. As amostras foram colocadas no meio de cultura “Schneider Insect Medium” (Sigma-Aldrich). Garrafas de cultivo foram mantidas sob agitação constante em shaker, dentro de estufa biológica à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram realizadas algumas passagens dos parasitos em meio de cultura líquido e durante a sua fase log, cerca de 2×10^8 promastigotas/mL foram centrifugadas à $4,000 \times g$ e lavadas três vezes adicionando 5 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) estéril e gelado. Após cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a suspensão celular foi centrifugada com uma força de $8,000 \times g$ por 20 minutos à 4°C e alíquotas contendo o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) foram mantidas em freezer a -80°C .

3.3 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante

3.3.1 Clonagem da proteína XP_001563419.1

Utilizando a base de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI) foi possível obter a sequência gênica, a partir do identificador do gene: 5413930, e de aminoácidos da proteína enolase de *L. braziliensis* (XP_001563419.1). Foi realizado um pareamento da sequência proteica da enolase utilizando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com outras espécies de *Leishmania*. A partir da sequência gênica e utilizando o programa NEBcutter (NEBcutter V2.0), foram desenhados o primer *forward* (5'**GCTAGCATGCCGATCCAGAAGGTGTA**), com a sequência correspondente ao corte pela enzima de restrição NheI, e *reverse* (5'**AAGCTTTTACGCCAGCCGGAGTA**), com a sequência correspondente ao corte pela enzima HindIII (DUARTE *et al.*, 2015). Dessa forma,

a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um volume total de 50 μL utilizando a enzima “Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen, 5 U/ μL) e como molde o DNA genômico de *L. braziliensis*, este extraído pelo protocolo caseiro utilizando proteinase K para a lise celular, um volume de fenol:clorofórmio para a separação das proteínas e lipídeos solúveis na fase orgânica e o etanol 100% para a precipitação overnight do DNA. O produto da PCR foi submetido à separação em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), com uma tensão de 80 V. A banda correspondente ao tamanho esperado da sequência gênica da proteína enolase (1.290 pares de base) foi excisada e purificada utilizando o kit EasyGen, seguindo as recomendações do fabricante, para a obtenção do DNA purificado. A amostra de DNA foi dosada utilizando o aparelho “Nanodrop N2000” (ThermoFisher Scientific).

O produto da purificação foi ligado no “p-GEM-T Easy Vector Systems” (Promega; ANEXO I). Esse, é um vetor de clonagem que possui em suas extremidades uma 3'-Timina adicional que pode se parear com a ponta 3'-Amina do amplicon gerado pela enzima polimerase durante a PCR. Além de ser um vetor aberto com pontas ligantes em produtos de PCR, o vetor possui sequências correspondentes à resistência ao antibiótico ampicilina e a enzimas de restrição em seu sítio múltiplo de clonagem, o que permite a digestão e a ligação orientada do amplicon. A ligação do amplicon no vetor de clonagem foi realizada utilizando a enzima “T4 DNA Ligase” (Promega, 1-3 U/ μL), seguindo protocolo do fabricante.

Durante a transformação, ao produto da ligação foram adicionados em 50 μL de *E. coli* BL21 (DE3) competentes e, posteriormente, transferidas para uma cubeta. Utilizando o equipamento “MicroPulser Electroporation Apparatus” (BioRad) foi liberado um pulso elétrico na cubeta de 2,50 kV. Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas sob agitação em shaker a 37°C durante uma hora em 400 μL meio de cultura 2xyt líquido. Ao final do intervalo, as bactérias foram plaqueadas em meio 2xyt sólido com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, 1 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal (Invitrogen). A placa foi incubada por 18 h à 37°C em estufa biológica. O crescimento de colônias brancas nas placas de ágar sólido indicou a presença do amplicon ligado ao vetor, gerando assim células recombinantes por meio da eletroporação. Dessa forma, as colônias brancas foram repicadas em uma nova placa com meio de cultura sólido e a confirmação da presença de vetores recombinantes foi avaliada pela técnica de PCR de colônia, em que o molde de DNA utilizado para a amplificação é fornecido pela própria colônia de bactérias. O primer utilizado na PCR de colônia foi o próprio primer específico desenhado para a proteína enolase.

Após a confirmação por PCR dos plasmídeos recombinantes, foi realizada a retirada do DNA plasmidial da colônia alvo utilizando o kit Miniprep Easy

Gen, seguindo as informações do fabricante. Dessa forma o plasmídeo recombinante e o vetor pET28a-TEV foram digeridos duplamente pelo uso das enzimas NheI e HindIII à 37°C durante 4 horas, e através da corrida do produto da digestão em gel de agarose 1% foi possível visualizar duas bandas correspondentes aos vetores abertos e uma terceira do amplicon. As bandas correspondentes ao tamanho do vetor pET28a-TEV e ao do amplicon foram excisadas e purificadas utilizando o kit EasyGen. O vetor pET28a-TEV é um plasmídeo utilizado para a expressão de proteína e que possui de forma semelhante ao pGEM, sequências correspondentes à resistência ao antibiótico canamicina e a enzimas de restrição em seu sítio múltiplo de clonagem (ANEXO II).

Para a ligação do amplicon no vetor pET28a-TEV utilizou-se a enzima “T4 DNA Ligase” (Promega, 1-3 U/μL). Repetiu-se a etapa de eletroporação no equipamento “MicroPulser Electroporation Apparatus” (BioRad) com um pulso elétrico de 2,5 kV, porém utilizando a bactéria *E. coli* Arctic Express (DE3). A linhagem Arctic Express (DE3) foi delineada para a expressão de proteínas recombinantes em vetores dirigidos pelo promotor T7 e diferencialmente das demais *E. coli*, possuem uma baixa temperatura de cultivo, 12°C, favorecendo uma cobertura maior de solubilidade da proteína. Além disso, a bactéria expressa gene de resistência ao antibiótico gentamicina e co-expressa outras duas chaperoninas, Cpn10 e Cpn60, bastantes adaptadas para o enovelamento da proteína a baixas temperaturas. Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas, sob agitação em shaker, à 37°C durante uma hora em 400 μL meio de cultura 2xyt líquido. Ao final do intervalo, as bactérias foram plaqueadas em meio 2xyt sólido.

As colônias brancas que cresceram após a transformação foram repicadas em uma nova placa com meio de cultura sólido com 50 μg/mL de canamicina apenas e a confirmação da presença de vetores recombinantes foi avaliada pela técnica de PCR de colônia. O primer utilizado para a PCR de colônia foi o primer T7 (Macrogen®, South Korea), específico para a região promotora do vetor (DUARTE *et al.*, 2015). Para reafirmar a presença do amplicon de interesse e ausência de mutações em regiões promotoras da tradução foi realizado o sequenciamento do plasmídeo no equipamento MegaBACE 1000 DNA Sequencing System (GE Healthcare), com o auxílio do kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit Cycle Sequencing”. A leitura foi na matriz de leitura longa “MegaBACETM” e a análise dos dados foi possível utilizando o software “Sequence Analyzer” na versão 3.0. A colônia da bactéria reconhecidamente recombinante foi estocada em glicerol (15%) no freezer a -80°C.

3.3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante

Primeiramente, foi realizado um teste de expressão com os tempos 0 e 1, 2 e 3 horas após a adição de diferentes concentrações do indutor isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG, 0.5 mM, 1 mM e 1.5 mM; Promega, USA), utilizado como indutor de expressão adicionado após a cultura de bactérias atingir a densidade óptica de 0,6 ($DO_{600}=0.6$). Em cada tempo, foram retiradas alíquotas de 400 μ L das culturas, centrifugadas em um tubo eppendorf de 2 mL e a 3.000 x g. No tempo 3 foram separadas a fração solúvel e insolúvel para o teste de solubilidade. Em uma pequena fração do sobrenadante foi adicionado um tampão para proteína e, posteriormente, submetido a uma alta temperatura, 100°C, no termociclador por 10 minutos para a desnaturação completa das proteínas. As amostras foram corridas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) utilizando Bis-acrilamida 40%.

A banda da proteína com maior intensidade foi obtida na fração de teste de tempo 3, na concentração de 1 mM de IPTG. Dessa forma, a expressão em larga escala foi realizada a partir de um pré-inóculo de 5 mL, onde 2 mL foram transferidos para 1 L de meio 2xyt com 50 μ g/mL de canamicina e 20 μ g/mL de gentamicina (Thermo Fisher Scientific). A cultura foi induzida com IPTG após a densidade óptica de 0.6 e incubada por 24 horas, a 12°C. Após o tempo determinado, a cultura foi centrifugada a 200 x g, por 30 min e a 4°C⁴⁸.

O pellet de bactérias foi ressuspenso usando PBS 1x e lisado através de 10 ciclos de sonicação (40% potência), de 1 minuto intercalando com banho de gelo por 1 minuto, e centrifugado novamente à 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. A proteína recombinante, contendo a cauda de histidina, foi coletada do sobrenadante e purificada utilizando a coluna de afinidade HISTRap 5ml (GE Healthcare Life Science). Essa coluna foi inserida no sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas – *FLPC* (GE Healthcare Life Science).⁴⁸ A coluna foi pré-lavada, usando 5x seu volume, com PBS 1x e 30 mM imidazol, e a eluição da proteína foi realizada com uma solução de PBS 1x e 500 mM de imidazol. Após utilizar o sistema de afinidade, a proteína r-Enolase foi passada em uma coluna de poliximixina B – agarose (Sigma-Aldrich) para a retirada de endotoxinas (< 10ng de LPS por 1mg de proteína recombinante, medido através do método cromogênico do ensaio do lisado de amebócitos do limulus, QCL-1000, BioWhittaker). Seguindo a purificação, a proteína purificada foi dosada utilizando o ensaio à base de Cobre, onde o ácido ácido bicinconínico (BCA), reagente cromogênico, forma um complexo com o cobre reduzido (Cu^{1+}) pelos resíduos de aminoácidos em condições alcalinas. Dessa forma, utilizou-se o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Imunização e infecção experimental

Grupos de camundongos BALB/c (n=16, por grupo) foram imunizados pela via subcutânea no coxim plantar esquerdo da pata traseira, com três doses das vacinas, em intervalos de 15 dias. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 1) Grupo inoculado com salina (20 μ L PBS 1x), como controle da infecção;
- 2) Grupo imunizado com 12.5 μ g de saponina (*Quillaja saponaria bark saponin*, Sigma) diluído em 20 μ L PBS 1x, como controle do adjuvante;
- 3) Grupo imunizado com 12.5 μ g da proteína recombinante enolase diluído em 20 μ L PBS 1x;
- 4) Grupo imunizado com 12.5 μ g da proteína recombinante enolase em associação à saponina (12.5 μ g) diluído em q.s.p. 20 μ L PBS 1x.

Decorridas quatro semanas da última imunização, a metade dos animais (n=8, por grupo) foram eutanasiados para análise da resposta imune celular e humoral geradas pela vacina. Enquanto a outra metade dos animais foram desafiados pela via subcutânea no coxim plantar direito da pata traseira com 1×10^7 promastigotas na fase estacionária de *L. infantum* diluídas em 20 μ L PBS 1x. Os camundongos infectados foram monitorados durante 10 semanas após o desafio e então eutanasiados para as coletas do soro, fígado, baço, linfonodo drenante da pata direita e medula óssea para a dosagem da carga parasitária e da resposta imunológica celular e humoral de cada animal.

3.5 Avaliação da imunogenicidade

3.5.1 Produção de citocinas

A produção de citocinas foi avaliada da cultura de esplenócitos obtida a partir da maceração de um pedaço do baço dos animais em 1 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; contendo 5,6% bicarbonato de sódio, 200 U/mL penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). Dessa forma, 5×10^6 células/mL foram plaqueadas em duplicata, com Meio DMEM como controle, e estimuladas com a proteína rEnolase ou SLA de *L. infantum*, nas concentrações de 10 e 25 μ g/mL, respectivamente, por 48 h a 37°C em incubadora de 5% CO₂⁶⁷. A contribuição dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ na produção de IFN- γ foi analisado mediante a adição de anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD4+ (GK 1.5) e anti-CD8+ (53-6.7). Decorridos o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados para a detecção dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 pela técnica

de ELISA de captura, seguindo as instruções do kit comercial (BD OptEIA set mouse, Pharmingen).

3.5.2 Produção de nitrito

A produção de óxido nítrico foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos pelo método de Griess ⁷⁸.

3.5.3 Citometria de fluxo

Adicionalmente à análise de citocinas extracelulares, os esplenócitos de animais imunizados e desafiados foram submetidos à avaliação por citometria de fluxo para análise da produção interna de citocinas contra antígenos dos parasitos. O protocolo utilizado foi semelhante ao utilizado por Martins et al. (2017). Para tal, esplenócitos (1×10^7 células) foram inseridos em tubos de propileno (Falcon, BD Pharmingen) e estimulados com SLA de *L. infantum* (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A leitura com 30.000 eventos por amostra foi realizada no equipamento FACScalibur (Becton Dickson - BD) e a análise dos dados foi feita utilizando o software Cell-Quest (BD). A densidade dos gráficos de distribuição de CD4+/FL1 ou CD8+/FL1 contra IFN- γ /FL-2, TNF- α /FL-2, ou IL-10/FL2 determinaram a porcentagem de células T produzindo IFN- γ +, TNF- α + e IL-10+. Os resultados foram expressos como índices, os quais foram obtidos pela taxa entre a porcentagem de células T CD4+ e CD8+ presentes nas culturas estimuladas com SLA pelos valores obtidos das culturas sem a adição de estímulos.

3.5.4 Resposta humoral

A resposta humoral foi avaliada 30 dias após a última imunização e 10 semanas decorrida a infecção desafio, como descrito por Martins et al. (2015). Através da técnica de ELISA indireta, foi realizado o bloqueio de placas de cultura de 96 poços com a proteína rEnolase, na concentração de 0.5 μg por poço, e SLA *L. infantum*, na concentração de 1.0 μg por poço, diluídas em tampão carbonato (0,24% NaHCO_3 e 0,16% Na_2CO_3 , pH 9,6). As placas foram incubadas por 18 h na geladeira. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com uma solução PBS 1x e 5% de Albumina de Soro Bovino (BSA) por 1 h em estufa a 37°C. Após, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem, contendo PBS 1x e 0.05% Tween 20. As amostras de soro foram aplicadas no volume de 100 μL na diluição 1:100 de PBS 1x e 0.5% BSA. As placas com as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C e depois lavadas 3 vezes, novamente, com a solução de lavagem, quando

houve a aplicação de 100 μ L dos anticorpos anti-IgG1 e IgG2a de camundongos conjugados com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:10.000 e 1:20.000, respectivamente, em PBS 1 x e 0.5% BSA. Após as placas terem sido incubadas na estufa a 37°C por 1 h, prosseguiu-se com a etapa de lavagem com 3 repetições e a adição de 100 μ L da solução reveladora, constituída de 0,1 M de ácido cítrico, 0,2 M de Na₂PO₄, 2 mg de OPD e 0,1% de água oxigenada. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com absorvância de 492 nm.

3.6 Carga parasitária

Para avaliar a carga parasitária nos animais imunizados e infectados, dois métodos foram utilizados: a diluição limitante em amostras do fígado, baço, linfonodo drenante e medula óssea, e a técnica de *q*PCR para análise de amostras do baço. Para a diluição limitante, os órgãos foram macerados em meio Schneider's incompleto na proporção de 1 mL de meio de cultura para cada 100 mg de tecido. Utilizando placas de cultura celular de 96 poços, foram realizadas diluições seriadas em meio Schneider's completo, partindo de uma diluição de 10⁻¹ até a diluição máxima de 10⁻¹². As placas foram incubadas em estufa a 24°C durante 7 dias, quando com o auxílio de um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss), foi possível verificar a carga parasitária pela maior diluição com ausência de parasitos no meio (Coelho et al. 2003).

O ensaio do *q*PCR em tempo real foi realizado utilizando 1 μ L dos iniciadores *forward* e *reverse* do gene que codifica o kDNA do parasito na concentração de 2 mM, 5 μ L de SYBR GREEN PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) e 4 μ L de DNA (10 ng/ μ L), perfazendo um volume final de 10 μ L de reação. O ensaio foi realizado em duplicata utilizando o aparelho ABI PRISM 7500 (PE Applied Biosystems)⁸⁰. Os resultados foram expressos na escala negativa de log, os quais foram ajustados de acordo com o peso dos órgãos em miligramas.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram plotados na planilha do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados pelo software GraphPad PrismTM (versão 6.0 para Windows). A análise estatística para os diferentes grupos experimentais foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do post-teste de Bonferroni. A replicata biológica realizada gerou resultados similares. Diferenças foram consideradas significativas estatisticamente quando o *P* valor foi menor que 0.05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, temos os resultados da obtenção da proteína Enolase na sua forma recombinante. A proteína Enolase foi clonada utilizando o vetor de clonagem p-GEM, ambos digeridos com a enzima de restrição NheI e HindIII (Promega). O vetor de clonagem recombinante foi digerido, e o inserto com a ORF codificadora da proteína foi transferido para o vetor de expressão pET28a-TEV. No vetor de expressão, a bactéria *E. coli* Artic Express foi transformada com o plasmídeo recombinante para a posterior expressão em larga escala em meio de cultura 2xyt acrescido de antibiótico. Frações da expressão foram coletadas e analisadas para a posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel no sistema FPLC (Figura 3).

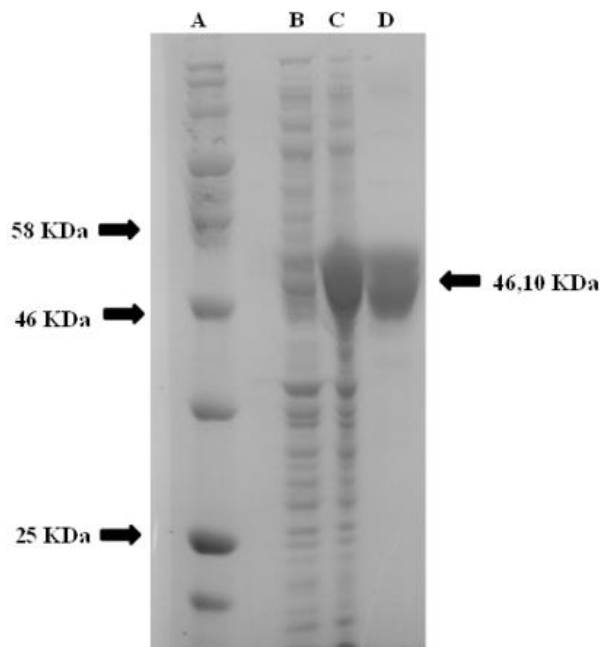


Figura 3. Expressão e purificação da proteína recombinante enolase (rEnolase). Um padrão de proteína de baixo peso molecular (Invitrogen™, Life Technologies, USA) foi utilizado (em A). Esta figura apresenta um extrato proteico não induzido e outro induzido (em B e C, respectivamente), assim como da proteína recombinante purificada (10 µg, em D), os quais foram corridos em gel 12% SDS-PAGE e coradas utilizando o corante Coomassie-Blue. A seta preta indica a posição da proteína rEnolase no gel (aproximadamente 46.1 kDa).

Na coluna A temos o padrão de peso molecular utilizado para a identificação da proteína recombinante, que possui um peso de cerca de 50 kDa. Na coluna B temos a amostra da expressão proteica realizada pela bactéria *Escherichia coli* transformada com o plasmídeo recombinante, na qual há várias bandas de pesos variados que indicam não

apenas a expressão da proteína alvo, mas também de outras proteínas intrínsecas da bactéria. Na coluna C há a mesma expressão, porém, com a indução do promotor presente no sítio múltiplo de clonagem com IPTG. Dessa forma, a banda correspondente da proteína se apresentou mais forte devido a sua alta concentração no gel. E, por último, na coluna D temos a proteína purificada, onde as proteínas intrínsecas da bactéria foram retiradas, purificando apenas a proteína rEnolase através da sua cauda de histidina.

Muitos trabalhos buscam alvos na forma promastigota do parasito, por ser a forma infectante do parasito e que entra em primeiro contato com o hospedeiro. À vista disso, é importante ressaltar que essa proteína foi encontrada não apenas na forma promastigota, mas também da amastigota. É evidente que a forma amastigota deve ser considerada na busca pelos alvos uma vez que se apresenta dominante poucas horas depois da infecção no hospedeiro vertebrado, sendo também responsável pela forma ativa da doença e, conseqüentemente, em constante contato com o sistema imune ^{48,81,82}; assim, tornando-se um potencial alvo vacinal.

Na Figura 4 temos gráficos que apresentam a produção de citocinas e de anticorpos após as imunizações e antes da infecção desafio. Após 30 dias da última imunização foi realizado o cultivo dos esplenócitos da metade dos animais de cada grupo, com a ausência de estímulo utilizando meio de cultura (controle negativo) e estimulados com a proteína rEnolase ou com SLA, por 48 horas. O sobrenadante das culturas foi retirado para a dosagem de citocinas por meio da técnica de ELISA de captura. No gráfico A é possível observar que o grupo de animais imunizados com a rEnolase associada ao adjuvante apresentou uma produção significativa de IFN- γ na presença do estímulo da rEnolase, em relação aos demais grupos. O mesmo padrão foi observado para as citocinas IL-12 e GM-CSF, marcadores de resposta celular do tipo Th1.

A citocina IL-12 é um estímulo inicial na indução da resposta Th1, atuando na proliferação e diferenciação de células T, e é excretada pelos fagócitos na imunidade inata ⁴⁴, sendo importante na transição da resposta inata para a adaptativa ⁸³. Já GM-CSF é um fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, secretada por células T, macrófagos e células endoteliais e que atua nos progenitores mielóides que residem na medula óssea. Ambas são citocinas que atuam no desenvolvimento da resposta imunológica favorável ao combate do parasito, ao atuar na proliferação e desenvolvimento da resposta celular Th1 ^{62,84}.

Na figura 4A é possível verificar uma baixa produção de IL-4 no grupo rEnolase/saponina, principal citocina de indução do perfil Th2 e da molécula reguladora IL-10, citocina produzida por macrófagos e células dendríticas e que possui um efeito anti-inflamatório ao apresentar alça de retroalimentação negativa. As células Th1 também induzem a produção da citocina IL-10 que atua com um feedback negativo nessas células

ao diminuir a ativação dos fagócitos, ou seja, suprimindo a resposta inata bem como a adaptativa^{75,85}. Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de IL-4 e IL-10 entre os grupos vacinados com apenas a proteína recombinante ou quando combinada com o adjuvante⁸⁶.

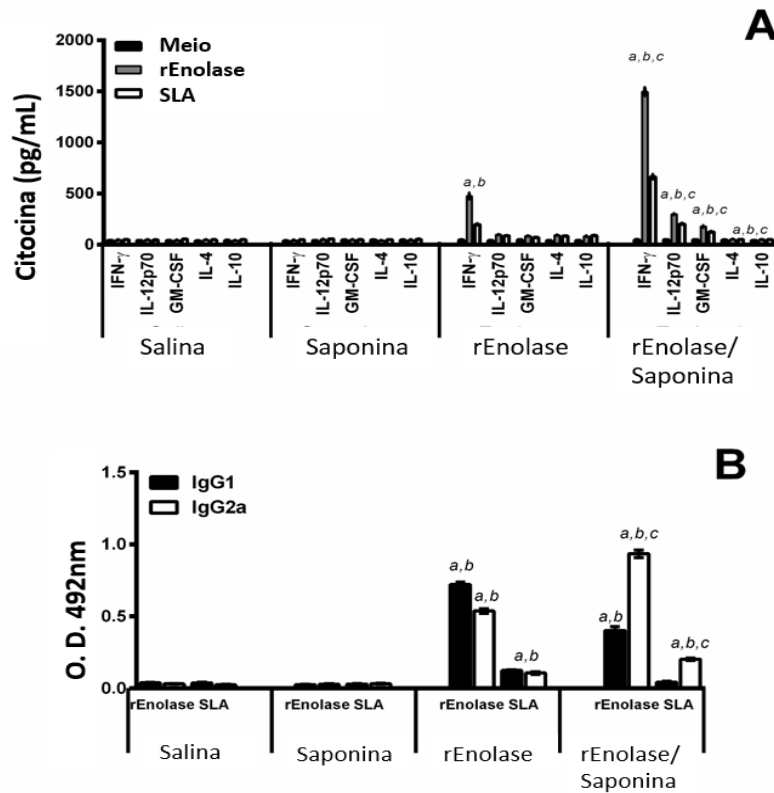


Figura 4. Resposta humoral após as imunizações com a rEnolase e antes da infecção pela *L. infantum*. Para avaliar a produção de citocinas antes da infecção, esplenócitos dos camundongos imunizados (n=8, em cada grupo) foram cultivados na ausência de estímulos (grupo controle com meio de cultura) ou estimulados com rEnolase e extrato solúvel de *L. infantum* (SLA), para posterior dosagem dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF nos sobrenadantes pela técnica de ELISA de captura (em A). Para a análise da produção de anticorpos, os isotipos IgG1 e IgG2a específicos para o SLA e rEnolase, foram avaliados nas amostras de soro dos animais imunizados (em B). Em todos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. As letras a, b, e c indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos salina, saponina e rEnolase, respectivamente ($P < 0.05$).

Em paralelo, o sangue desses animais, trinta dias após a última imunização, foi retirado e o soro foi usado para experimentos de ELISA e avaliação da dosagem dos níveis de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a. Como pode ser visualizado no gráfico B, houve uma grande produção de anticorpos IgG nos grupos vacinados tanto com a rEnolase quanto com a rEnolase associada ao adjuvante. Isso mostra a indução da resposta humoral frente a

essas imunizações. Porém, no grupo vacinado com a rEnolase associada a saponina a produção foi maior e mais significativa em relação aos demais grupos de anticorpos do isotipo IgG2a anti-rEnolase, em relação aos níveis de anticorpos IgG1.

Dessa forma, é possível inferir que houve uma resposta humoral dependente de células T com mudança de isotipo, e como a diferenciação se deu com um maior balanço dentro do repertório Th1, a presença de IFN- γ sobre as células B pode promover a mudança de subclasses de IgG, notadamente para IgG2a. Segundo Martins et al. (2015), poder-se-ia especular que a imunização com proteínas recombinantes foi capaz de induzir uma produção específica das citocinas GM-CSF, IFN- γ e IL-12, assim como, uma baixa produção de IL-4 e IL-10, e de anticorpos IgG1 nos animais vacinados ⁸⁷.

Após 10 semanas do desafio dos animais com *L. infantum*, os mesmos foram eutanasiados para a análise da imunogenicidade e da carga parasitária. Como pode ser visto na Figura 5, o gráfico A mostra a produção de citocinas, em que o grupo vacinado com a rEnolase associada ao adjuvante manteve o padrão de alta produção das citocinas do tipo Th1 e uma baixa do tipo Th2 em relação aos demais grupos. Porém, cabe ressaltar o aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-10 nos grupos controles e da rEnolase após a infecção, em relação aos valores encontrados antes do desafio, representando um aumento da suscetibilidade à infecção relacionada com o desenvolvimento da resposta Th2 ⁸⁸.

A linfoproliferação específica para *Leishmania* e a estimulação de células T para produzir IFN- γ é importante na proteção contra a infecção por *Leishmania* ⁴⁶. Dessa forma, foi feita a análise do envolvimento dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ na produção de IFN- γ pelo grupo imunizado com a rEnolase associada a saponina. Além dos estímulos na cultura de esplenócitos, houve também o bloqueio dessas células ao utilizar anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12, uma das principais citocinas que atuam na estimulação dos linfócitos⁸³. Por meio do gráfico B é possível inferir que a produção de IFN- γ foi significativamente inibida quando houve o bloqueio de células T CD4+ ou da citocina IL-12, quando comparado ao bloqueio de células T CD8+. Dessa forma, um papel mais relevante das células T CD4+ na produção do IFN- γ foi observado no grupo rEnolase/saponina.

Mesmo com a inibição das células TCD4+ houve produção de IFN- γ , mostrando que há outras células atuando em sua síntese e manutenção como, por exemplo, células NK ⁸⁹. Sendo assim, segundo Martins et al. (2015), essa produção é considerada como uma implicação indireta do envolvimento de células T na produção de IFN- γ ⁸⁷. É importante salientar que, na Figura 5, após a infecção, os grupos controles e rEnolase apresentaram uma produção significativa de citocinas IL-4 e IL-10, e de anticorpos IgG1, marcadores de resposta celular do tipo Th2 ⁴⁶. Dessa forma, a progressão da doença nesse modelo é associada à supressão da resposta Th1, devido à redução da produção de IL-12 e IFN- γ pelos esplenócitos, com um aumento das citocinas IL-4 e IL-10 ⁹⁰.

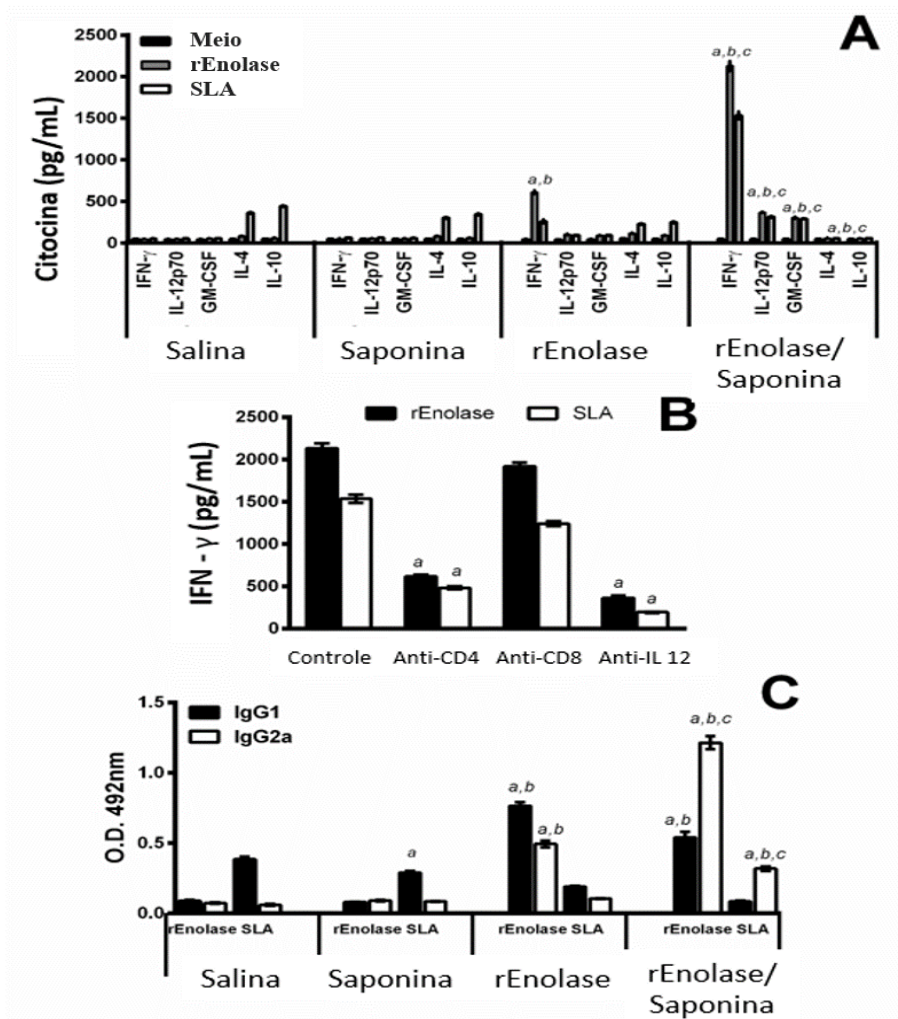


Figura 5. Resposta imune induzida após a infecção desafio por *Leishmania infantum*. Para avaliar a produção de citocinas após a infecção, esplenócitos dos camundongos imunizados e infectados (n=8, em cada grupo) foram cultivados na ausência de estímulos (grupo controle com meio de cultura) ou estimulados com rEnolase e extrato bruto de *L. infantum* (SLA), para posterior dosagem dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF nos sobrenadantes pela técnica de ELISA de captura (em A). Esplenócitos do grupo rEnolase/saponina foram cultivados na ausência (controle) ou presença de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, e anti-IL-12, quando a produção de IFN- γ foi avaliado. A letra a indica uma diferença significativa ($P < 0.05$) em relação ao controle positivo (em B).

Corroborando com os dados anteriores, foi gerada a análise da produção intracelular das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 após o desafio. Esplenócitos foram cultivados e estimulados com SLA para posterior investigação no ensaio de citometria de fluxo. Por meio da Figura 6, reconhece-se que a imunização com a rEnolase combinada ao adjuvante induziu níveis elevados e significativos de células T CD4+ produtoras de IFN- γ ⁸⁶ em

detrimento da diminuição das células produtoras de IL-10, quando comparado aos resultados encontrados nos grupos controles.

Esse resultado salienta a importância dos linfócitos T CD4+ na produção do IFN- γ e de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), sendo essa, uma importante citocina envolvida no aumento da resposta inflamatória com o processo de ativação e recrutamento de neutrófilos. No entanto, trabalhos anteriores têm também mostrado a importância dos linfócitos T citotóxicos na proteção contra *Leishmania*, uma vez que, concomitantemente com as células T helper, apresentam um papel importante não apenas na re-infecção, mas também na infecção primária por aumentarem a resposta Th1^{60,91}.

A citocina IFN- γ atua com um *feedback* positivo tanto nas células de origem, TCD4+, com ação autócrina aumentando a sua polarização para Th1, como nos macrófagos, com uma ação parácrina, células da imunidade inata infectadas pelo protozoário causador da doença. Ao atuar nos macrófagos, essa citocina ativa fatores de transcrição que expressam enzimas ligadas à síntese de espécies reativas de oxigênio (oxidase) e óxido nítrico (óxido nítrico sintase induzível, iNOS), que atuam diretamente na morte do parasito^{92,93}.

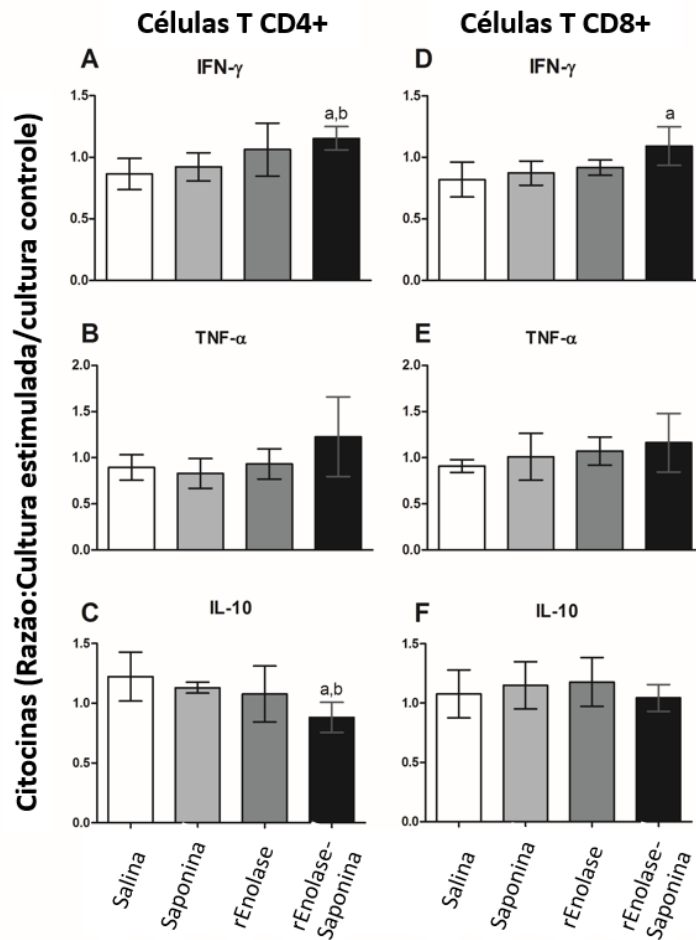


Figura 6. Produção intracelular de citocinas pelos linfócitos T. Os níveis de células T produtoras de citocinas intracelulares foram calculados pela razão entre os valores das culturas estimuladas com SLA de *L. infantum* sobre o da cultura controle (SLA/CC) nos camundongos que foram imunizados com salina (barras brancas), saponina (barras cinza claro), rEnolase (barras cinzentas escuras), ou rEnolase/saponina (barras pretas) ($n = 8$, em cada grupo). Resultados são dados pela diferenciação da produção por células T CD4+ (em A,B e C, indicando os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, respectivamente) e pelas células T CD8+ (em D, E e F, indicando os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, respectivamente). Em todos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. As letras a e b indicam diferenças estatisticamente significantes, em relação aos grupos salina e saponina, respectivamente ($P < 0.05$).

Para evidenciar se a produção de citocinas estava realmente ocasionando um aumento da atividade dessas células parasitadas, realizou-se a dosagem de nitrito, uma vez que o óxido nítrico, quando diluído, possui uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato⁹⁴. Constatou-se, por meio do gráfico na Figura 7, que houve uma alta produção dessa molécula pelo grupo imunizado com rEnolase combinada a saponina, em relação aos demais grupos. Resultados similares foram encontrados por Gupta et. al. (2014) em camundongos vacinados com rLdEno+BCG (rEnolase associada ao Bacilo Calmette-Guérin), cujos esplenócitos produziram quantidade significativas de nitrito em relação aos grupos controle, 45 dias após a infecção desafio⁴⁶.

Para corroborar com o dado anterior do aumento da atividade dos macrófagos devido à produção elevada de óxido nítrico, a investigação da proteção conferida pelas imunizações através da quantificação da carga parasitária nos animais infectados foi realizada.

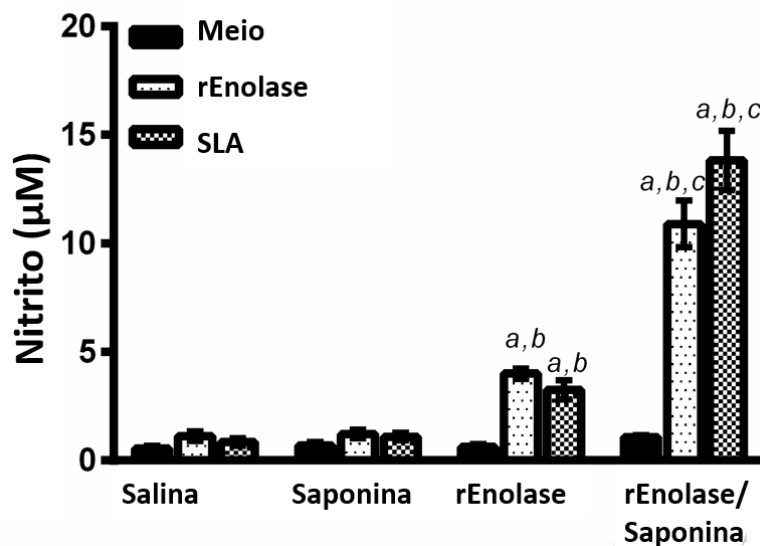


Figura 7. Produção de nitrito. Os esplenócitos dos animais que foram imunizados e infectados (n=8, em cada grupo) foram cultivados na ausência de estímulos (grupo controle com meio de cultura) ou estimulados com rEnolase e extrato bruto de *L. infantum* (SLA) para a análise da produção de nitrito no sobrenadante. Em todos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. As letras a, b, e c indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos salina, saponina e rEnolase, respectivamente ($P < 0.05$).

Cada um dos quatro gráficos apresentados na Figura 8 representa um dos órgãos analisados pela técnica de diluição limitante. Observa-se uma alta quantidade de parasitos nos grupos controles, sendo que o grupo imunizado com a rEnolase combinada ao adjuvante apresentou a maior redução da carga parasitária em todos os órgãos avaliados: fígado, baço, medula óssea e linfonodos, na ordem de 85%, 77%, 90%, e 83%,

respectivamente, em relação ao grupo salina ⁹⁵. Segundo Gupta et al. (2014), uma significativa redução de 90% da carga parasitária foi observada no baço, fígado e medula óssea de hamsters vacinados com a proteína rLdEno (rEnolase de *L. donovani*), associada ao adjuvante BCG, 90 dias após a infecção ⁴⁶. Dados diferentes foram encontrados por Ramírez et al. (2013), em que camundongos vacinados com proteínas recombinantes na ausência do adjuvante (CpG-ODN) apresentaram uma carga parasitária similar ao grupo salina em órgãos como linfonodos e baço ⁶⁰. Assim, como observado no presente estudo, animais imunizados somente com a proteína rEnolase, que apresentaram certa redução do parasitismo, poderiam ser considerados parcialmente protegidos contra a infecção.

Segundo Kumari et al. (2008), hamster vacinados com subfrações agrupadas atingiram a inibição da infecção pelo parasito em quase 99%, apoiada por respostas linfoproliferativas baseadas em IFN- γ e IL-12, juntamente com hipersensibilidade tardia e níveis aumentados de anticorpos IgG2 específicos aos parasitos. Esses resultados sugerem que uma vacina, para ser bem sucedida contra LV, pode exigir a presença de várias proteínas imunoestimuladoras da resposta Th1 ⁵³.

Assim, muitos trabalhos, de forma a melhorar o potencial vacinal dos candidatos, têm utilizado a combinação de algumas proteínas (DUARTE *et al.*, 2016; DUARTE *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2015), peptídeos imunodominantes ^{65,97,98} ou quimeras recombinantes ^{99,100}. A maior vantagem dessa abordagem está na indução de uma resposta imune mais eficaz, ao se utilizar vários candidatos sem a necessidade de inserir uma grande carga antigênica.

Alves-Silva et al. (2017) mostraram que uma quimera recombinante induziu uma resposta Th1 mais potente e otimizada, com aumento do IFN- γ e de anticorpos IgG2a, e que essa otimização foi relacionada com a apresentação em tandem dos epitopos imunodominantes F1 e F3 da proteína NH36 de *L. amazonensis* ¹⁰¹. Isso quer dizer que quimeras também podem ser produzidas a partir da mesma proteína ao utilizar apenas regiões de domínio ou de epitopos de linfócitos T, e que não há dependência da relação dose-resposta.

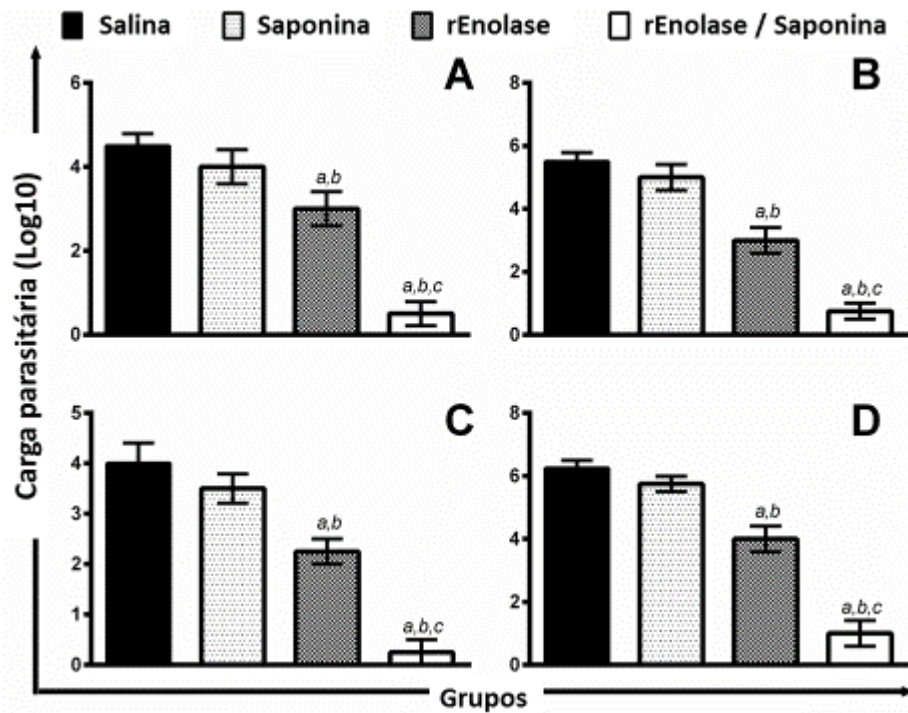


Figura 8. Avaliação da carga parasitária no baço, fígado, linfonodo e medula óssea dos animais imunizados e infectados utilizando a técnica de diluição limitante. A carga parasitária nos animais imunizados e infectados ($n=4$, em cada grupo) foi avaliada no fígado (em A), no baço (em B), na medula óssea (em C), e nos linfonodos drenantes das patas (em D) pela técnica de diluição-limitante. Em todos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. As letras a, b, e c indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos salina, saponina e rEnolase, respectivamente ($P < 0.05$).

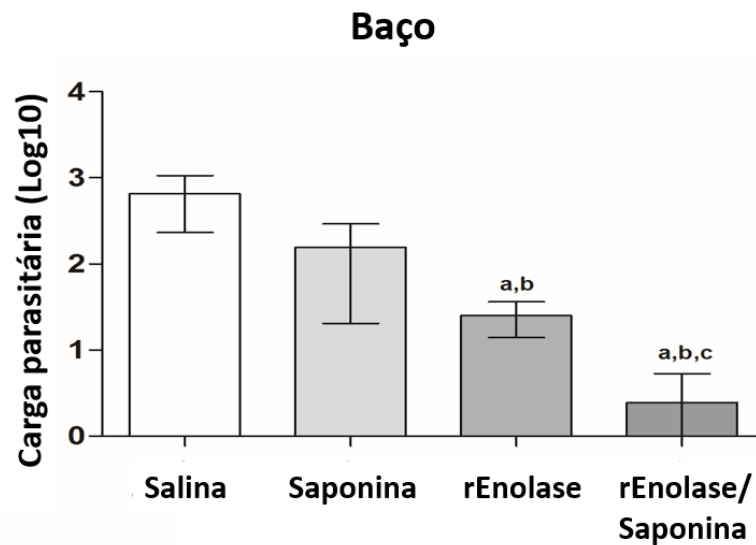


Figura 9. Avaliação da carga parasitária no baço dos animais imunizados e infectados utilizando a técnica de PCR quantitativo (qPCR). A carga parasitária do baço também foi avaliada nos animais imunizados e infectados (n=8, em cada grupo) pela técnica de qPCR. Em todos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. As letras a, b, e c indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos salina, saponina e rEnolase, respectivamente ($P < 0.05$).

O mesmo perfil verificado no gráfico da Figura 8 foi assegurado quando a carga parasitária do baço foi analisada por uma técnica quantitativa mais precisa, a PCR em Tempo Real, como visto na Figura 9.

Os resultados finais deste trabalho condizem com os dados apresentados inicialmente, no qual um aumento da produção das citocinas de perfil Th1 atua, por uma retroalimentação positiva, no aumento da atividade dos macrófagos parasitados e, conseqüentemente, na morte do parasito pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição significativa da carga parasitária.

O estudo de Gupta et al. (2014) estabelece que antígenos da *Leishmania* que estimulam respostas Th1 em células de pacientes ou roedores infectados com o parasito têm sido aceitos como potenciais candidatos para proteção e, portanto, promissores candidatos vacinais ⁴⁶. Nossos resultados são consistentes com os de outros estudos (ALVES-SILVA et al., 2017; COSTA et al., 2014; DUARTE et al., 2016; GOTO et al., 2009; GUPTA et al., 2014; KUSHAWAHA et al., 2012; MARTINS et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016; STAGER et al., 2000), nos quais o controle da infecção e da carga parasitária foi alcançado com o aumento da produção de IFN- γ e a supressão de IL-4, indicando a ocorrência de uma resposta Th1.

Como limitação do trabalho, o uso do modelo experimental que não apresenta o desenvolvimento da infecção similar como ocorre em humanos, por serem organismos diferentes e distantes filogeneticamente. E, como alternativa futura, temos a aplicação em animais mais próximos, como cães e primatas, ou até mesmo o uso de camundongos humanizados que apresentem respostas a infecções por *Leishmania* similares ao homem¹⁰³.

Há também uma grande diferença do método experimental utilizado para realizar a infecção nos animais, daquela que ocorre naturalmente com a picada de flebotômíneos vetores, que possuem na saliva componentes bioativos que modificam o ambiente imunológico local e favorecem o estabelecimento do agente etiológico¹⁰⁴. Estudos tem mostrado a grande importância da picada ao buscar proteínas importantes e únicas encontradas na saliva do inseto vetor na sua utilização como adjuvantes durante a infecção¹⁰⁴ e em conjunto aos alvos vacinais contra as leishmanioses¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Além do modelo experimental utilizado, que não mimetiza de forma similar uma resposta imunológica frente ao parasito, outra limitação seria a ausência de uma análise com tempos de intervalos maiores após as imunizações e antes da infecção⁴⁴. Pois, dessa forma, seria feito a análise não apenas do potencial de gerar uma resposta efetiva do tipo Th1, mas também da produção de um repertório de células T de memória, que são células que apresentam um reservatório expandido de linfócitos específicos e que respondem mais rapidamente e de forma mais efetiva em relação às células virgens¹⁰⁸.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através deste estudo permitem inferir que a proteína rEnolase, clonada a partir do DNA de *L. braziliensis*, foi capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1 em camundongos BALB/c imunizados. Resposta de grande importância para a proteção heteróloga de tais animais contra a infecção experimental causada por uma espécie de *Leishmania* responsável pelos casos de LV nas Américas. Dessa forma, a combinação rEnolase mais saponina se coloca como um candidato vacinal para ser utilizado em outros modelos de mamíferos e em diferentes condições experimentais para a proteção contra essa doença negligenciada.

6 PERSPECTIVAS

- ❖ Avaliar a combinação vacinal rEnolase mais saponina contra a infecção causada por outras espécies de *Leishmania* e associando a proteína recombinante a outros adjuvantes de resposta imune ou em moléculas carreadoras.

- ❖ Avaliar a proteína rEnolase em outros modelos de mamíferos, tais como hamsters, cães e primatas, e caracterizar os epitopos de linfócitos T CD4+ e T CD8+ presentes na molécula, a fim de se avaliar a viabilidade de se construir uma proteína multi-epítomos provenientes de diferentes candidatos vacinais para uma proteção mais efetiva contra as leishmanioses.

REFERÊNCIAS

1. Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1269–1281 (2000).
2. Ready, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 227–250 (2013).
3. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 305–318 (2004).
4. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, (2012).
5. WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Second WHO Rep. neglected Trop. Dis.* **3.9**, 67–71 (2013).
6. Cerf, B. J. *et al.* Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **156**, 1030–1033 (1987).
7. Pacheco, R. S. *et al.* Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, 531–537 (1998).
8. WHO, W. H. O. Leishmaniasis: Situation and trends. http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (2017).
9. WHO. WHO: Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. *World Heal. Organ. Geneva* **21**, 421–428 (2016).
10. Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**, 239–243 (2001).
11. Lainson, R. & Rangel, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100**, 811–827 (2005).
12. Overath, P., Haag, J., Lischke, A. & O'hUigin, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **31**, 468–471 (2001).
13. Lainson, R., Ward, R. D. & Shaw, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* **266**, 628–630 (1977).
14. Grimaldi, G. & Schottelius, J. Leishmaniasis--their relationships to monoxenous and dioxenous trypanosomatids. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**, 3–8 (2001).
15. Lipoldová, M. & Demant, P. Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 294–305 (2006).
16. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 22–26 (2010) doi:10.1038/nrmicro1766.
17. WHO, W. H. O. Leishmaniasis: The vector. (2017).

18. Neves, D. P., Melo, A. L. de;, Linardi, P. M. & Vitor, R. W. A. Gênero *Leishmania*. in *Parasitologia Humana* (eds. Michalik, M. S. M. & Ribeiro, R.) 41–48 (2011).
19. Who, W. H. O. Leishmaniasis: Key facts. (2017).
20. Neves, D. P., Melo, A. L. de;, Linardi, P. M. & Vitor, R. W. A. *Parasitologia Humana*. (2011).
21. Mauricio, I. L., Howard, M. K., Stothard, J. R. & Miles, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* **119** (Pt 3, 237–246 (1999).
22. Chaves, L. F., Cohen, J. M., Pascual, M. & Wilson, M. L. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, 1–8 (2008).
23. Melo, M. A. . *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. in *Canine Medicine - Recent Topics and Advanced Research* (ed. Kaoud, P. H.) (2016). doi:10.5772/65956.
24. Sherlock, I. A., Miranda, J. C., Sadigursky, M. & Grimaldi Júnior, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* vol. 79 511 (1984).
25. Silveira, F. T., Lainson, R., Shaw, J. J. & Povoas, M. M. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**, 830–832 (1982).
26. Santini, M. S., Salomon, O. D., Acardi, S. A., Sandoval, E. A. & Tartaglino, L. *Lutzomyia longipalpis* behavior and control at an urban visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **52**, 187–191 (2010).
27. Gontijo, C. M. F. & Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* **7**, 338–349 (2004).
28. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 873–882 (2007).
29. Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**, 566–567 (1988).
30. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **57**, 1–88 (2004).
31. Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G. & Baneth, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* **24**, 371–377 (2008).
32. Lima, M. P. *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol. Res.* **116**, 1197–1206 (2017).
33. Menezes-Souza, D. *et al.* Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One* **9**, (2014).

34. el Amin, E. R. *et al.* Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 271–274 (1986).
35. Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M. A. & Molina, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit. Vectors* **4**, 52 (2011).
36. Oliveira, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* **118**, 87–96 (2011).
37. Mcgwire, B. S. & Satoskar, A. R. Leishmaniasis : clinical syndromes and treatment. *QJM* 7–14 (2014) doi:10.1093/qjmed/hct116.
38. Brasil. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde* vol. 1ª edição (2006).
39. Who, W. H. O. Neglected tropical diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (2017).
40. Oliva, G. *et al.* A Randomised , Double-Blind , Controlled Efficacy Trial of " ve Dogs Exposed to Two the LiESP / QA-21 Vaccine in Nai *Leishmania infantum* Transmission Seasons. **8**, (2014).
41. Martin, V. *et al.* The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP / QA-21 vaccine (CaniLeish ®) remains effective against an experimental challenge one year later. **45**, 1–15 (2014).
42. Mendonça, L. Z. de *et al.* Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec ® and Leishmune ® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 1–12 (2016) doi:10.1186/s13071-016-1752-6.
43. Gradoni, L. Veterinary Parasitology Canine *Leishmania* vaccines : Still a long way to go. *Vet. Parasitol.* **208**, 94–100 (2015).
44. Duthie, M. S., Raman, V. S., Piazza, F. M. & Reed, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine* vol. 30 134–141 (2013).
45. Liu, L. *et al.* Identification of common immunodominant antigens of <i>Eimeria tenella</i>, <i>Eimeria acervulina</i> and <i>Eimeria maxima</i> by immunoproteomic analysis. *Oncotarget* **8**, 34935–34945 (2017).
46. Gupta, R. *et al.* Characterization of glycolytic enzymes - rAldolase and rEnolase of *Leishmania donovani*, identified as Th1 stimulatory proteins, for their immunogenicity and immunoprophylactic efficacies against experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One* **9**, (2014).
47. Xing, J. *et al.* Protective efficacy of six immunogenic recombinant proteins of *Vibrio anguillarum* and evaluation them as vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microb. Pathog.* **107**, 155–163 (2017).
48. Duarte, M. C. *et al.* Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* **22**, 1187–1196 (2015).

49. Song, H. *et al.* Potential Vaccine Targets against Rabbit Coccidiosis by Immunoproteomic Analysis. **55**, 15–20 (2017).
50. Martins, V. T. *et al.* Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
51. Duarte, M. C. *et al.* A vaccine combining two Leishmania braziliensis proteins offers heterologous protection against Leishmania infantum infection. *Mol. Immunol.* **76**, 70–79 (2016).
52. Kushawaha, P. K. *et al.* Leishmania donovani Triose Phosphate Isomerase: A Potential Vaccine Target against Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* **7**, (2012).
53. Kumari, S. *et al.* Th1-stimulatory polyproteins of soluble Leishmania donovani promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* **26**, 5700–5711 (2008).
54. Avilán, L. *et al.* Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res.* **2011**, 932549 (2011).
55. Avilan, L. *et al.* Interaction of Leishmania mexicana promastigotes with the plasminogen–plasmin system. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 183–193 (2000).
56. Maldonado, J., Marina, C., Puig, J., Maizo, Z. & Avilan, L. A study of cutaneous lesions caused by Leishmania mexicana in plasminogen-deficient mice. *Exp. Mol. Pathol.* **80**, 289–294 (2006).
57. Maia, Z. *et al.* Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
58. Garg, R. & Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **123**, 439–454 (2006).
59. Doeing, D. C., Borowicz, J. L. & Crockett, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin. Pathol.* **3**, 3 (2003).
60. Ramírez, L. *et al.* Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the Leishmania major recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **31**, 1312–1319 (2013).
61. Janeway, C. A. J. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
62. Abbas, A. K. ., Lichtman, A. H. . & Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular. Imunologia Celular e Molecular* (2012).
63. Wilson, M. E. *et al.* The TGF-beta response to Leishmania chagasi in the absence of IL-12. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3556–3565 (2002).
64. Esch, K. J., Juelsgaard, R., Martinez, P. A., Jones, D. E. & Petersen, C. A. Programmed Death 1-Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. *J. Immunol.* **191**, 5542–5550 (2013).

65. Costa, L. E. *et al.* Mimotope-based vaccines of leishmania infantum antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS One* **9**, (2014).
66. Chávez-Fumagalli, M. A. *et al.* Vaccination with the Leishmania infantum ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis challenge. *Microbes Infect.* **12**, 967–977 (2010).
67. Lage, P. S. *et al.* Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from Strychnos pseudoquina against Leishmania infantum. *Parasitol. Res.* **114**, 4625–4635 (2015).
68. Agallou, M., Athanasiou, E., Koutsoni, O., Dotsika, E. & Karagouni, E. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known Leishmania infantum proteins. *Front. Immunol.* **5**, 1–16 (2014).
69. Fernandes, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* **26**, 5888–5895 (2008).
70. Dalsgaard. A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 7–40 (1978).
71. den Brok, M. H. *et al.* Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat. Commun.* **7**, 13324 (2016).
72. Maraskovsky, E. *et al.* Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 371–376 (2009).
73. Pearse, M. J. & Drane, D. ISCOMATRIX adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **22**, 2391–2395 (2004).
74. Duarte, M. C. *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **49**, 398–407 (2016).
75. Das, A. & Ali, N. Vaccine development against Leishmania donovani. *Front. Immunol.* **3**, 1–19 (2012).
76. Chen, N. *et al.* Ascaris suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* **30**, 3478–3482 (2012).
77. Gan, W. *et al.* Reverse vaccinology approach identify an Echinococcus granulosus tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitol. Res.* **106**, 873–882 (2010).
78. Green, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138 (1982).
79. Antonio, E. *et al.* Immune Responses Induced by the. **71**, 3988–3994 (2003).
80. Duarte, M. C. *et al.* Performance of Leishmania braziliensis enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **238**, 77–81 (2017).

81. Kaur, S. *et al.* Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **103**, 1413–1419 (2008).
82. Fernandes, A. P., Coelho, E. A. F., Machado-Coelho, G. L. L., Junior, G. G. & Gazzinelli, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 476–485 (2012).
83. Gannavaram, S. *et al.* miR-21 Expression Determines the Early Vaccine Immunity Induced by LdCen^{-/-} Immunization. *Front. Immunol.* **10**, 1–14 (2019).
84. Guimarães-Costa, A. B., Rochael, N. C., Oliveira, F., Echevarria-Lima, J. & Saraiva, E. M. Neutrophil extracellular traps reprogram IL-4/GM-CSF-induced monocyte differentiation to anti-inflammatory macrophages. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
85. O'Garra, A. & Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 425–428 (2007).
86. Goto, Y. *et al.* Leishmania infantum sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. *Vaccine* **27**, 2884–2890 (2009).
87. Martins, V. T. *et al.* Antigenicity , Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania infantum against Visceral Leishmaniasis. 1–25 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0137683.
88. Himmelrich, H. *et al.* In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with Leishmania major is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J. Immunol.* **164**, 4819–4825 (2000).
89. Kobayashi, M. *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**, 827–845 (1989).
90. Bhowmick, S., Mazumdar, T. & Ali, N. Vaccination route that induces transforming growth factor?? production fails to elicit protective immunity against leishmania donovani infection ??? *Infect. Immun.* **77**, 1514–1523 (2009).
91. Joshi, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches. *Front. Immunol.* **5**, 380 (2014).
92. Balaraman, S., Tewary, P., Singh, V. K. & Madhubala, R. Leishmania donovani induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 639–647 (2004).
93. Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V. & Kalangi, S. K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 670 (2019).
94. Flora Filho, R. & Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **46**, 265–271 (2000).
95. KUSHAWAHA, P. K., Gupta, R., Tripathi, C. D. P., Sundar, S. & Dube, A. Evaluation

- of leishmania donovani protein disulfide isomerase as a potential immunogenic protein/vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *PLoS One* **7**, (2012).
96. Duarte, M. C. *et al.* A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology* **222**, 251–260 (2017).
 97. Taborda, C. P. & Travassos, L. R. Peptide Vaccine Against Paracoccidioidomycosis. *Methods Mol. Biol.* **1625**, 113–128 (2017).
 98. Wang, X. *et al.* Identification and evaluation of the novel immunodominant antigen Rv2351c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e48 (2017).
 99. Martins, V. T. *et al.* A recombinant chimeric protein composed of human and cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. 1–14 (2017) doi:10.1111/pim.12359.
 100. Lee, S.-Y. *et al.* Rapid Engineering for Vaccine and Challenge Viruses against Foot-and-Mouth Disease. *J. Virol.* (2017) doi:10.1128/JVI.00155-17.
 101. Alves-Silva, M. V., Nico, D., Morrot, A., Palatnik, M. & Palatnik-de-Sousa, C. B. A chimera containing CD4+ and CD8+ T-cell epitopes of the *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase (NH36) optimizes cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 102. Stager, 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.* **165**, 7064–7071 (2000).
 103. Wege, A. K. *et al.* *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
 104. Belkaid, Y. *et al.* Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.* **188**, 1941–1953 (1998).
 105. Asojo, O. A. *et al.* Structure of SALO, a leishmaniasis vaccine candidate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–15 (2017).
 106. Fiuza, J. A. *et al.* Intradermal Immunization of *Leishmania donovani* Centrin Knock-Out Parasites in Combination with Salivary Protein LJM19 from Sand Fly Vector Induces a Durable Protective Immune Response in Hamsters. 1–17 (2016) doi:10.1371/journal.pntd.0004322.
 107. Gomes, R. *et al.* Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7845–7850 (2008).
 108. Usselman, C. W. N. S. S. J. R. B. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).

APÊNDICE A - Ciclo biológico heteroxeno do protozário Leishmania

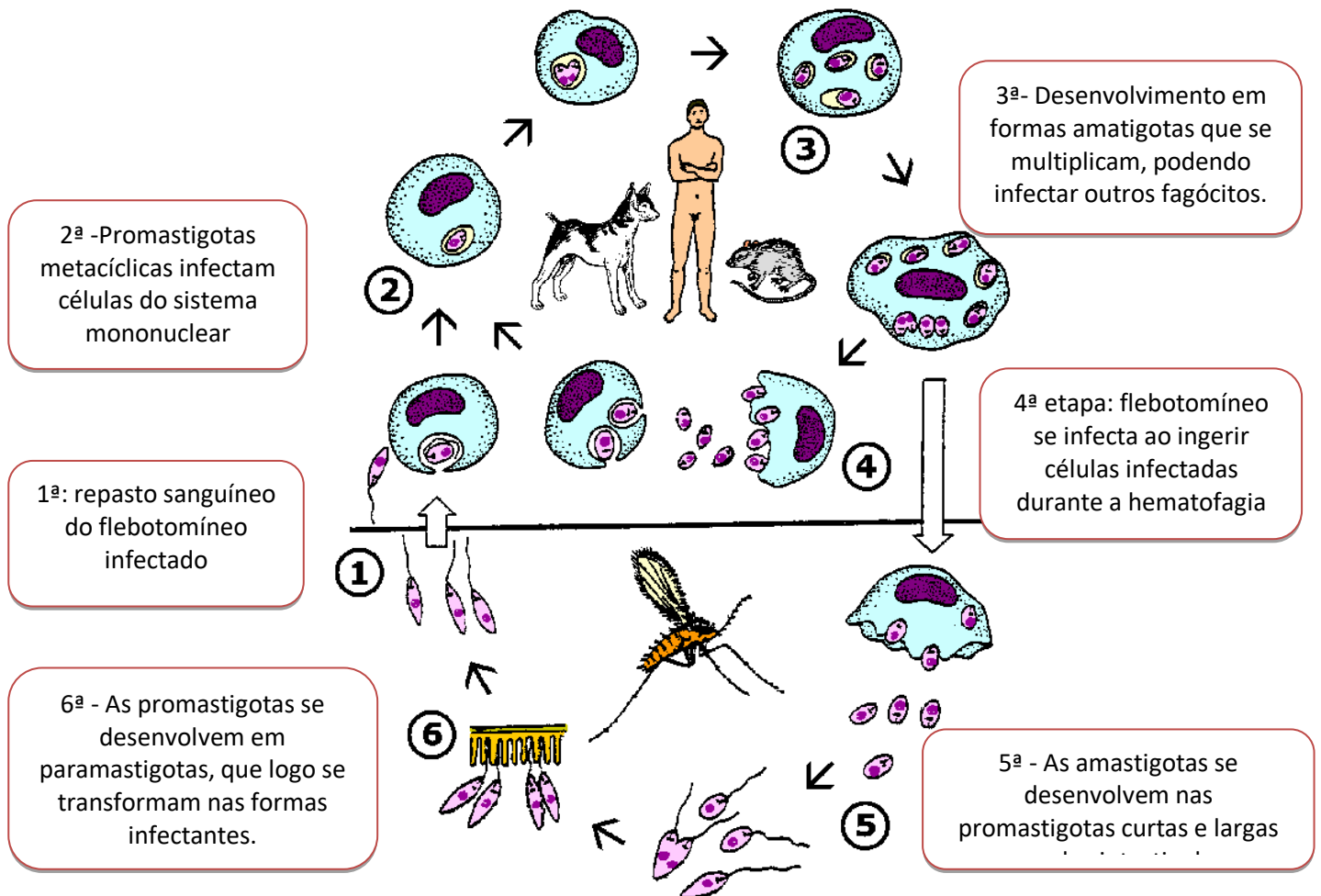

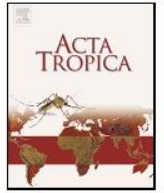
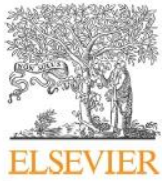


Figura 10 Ciclo biológico heteroxeno do protozário *Leishmania*. Fonte: Modificado do site - http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls_lc.html

APÊNDICE B – Comprovante de aprovação da Comissão de ética no uso de animais

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 333 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Proteínas selecionadas em Leishmania por imunoproteômica aplicadas como vacinas contra as leishmanioses tegumentar e visceral", que tem como responsável EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 333 / 2015, related to the Project entitled "Proteins selected in Leishmania by immunoproteomics applied as vaccines against tegumentary and visceral leishmaniasis", under the supervision of EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificates expires in 09/12/2020.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 09/12/2015.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

APÊNDICE C – Artigo publicado: “Probing the efficacy of a heterologous Leishmania/L. Vianniabraziliensis recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of L. infantum in BALB/c mice”



Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice

Thaís T.O. Santos^a, Vívian T. Martins^a, Daniela P. Lage^a, Lourena E. Costa^a, Beatriz C.S. Salles^a, Ana M.R.S. Carvalho^b, Daniel S. Dias^a, Patrícia A.F. Ribeiro^a, Miguel A. Chávez-Fumagalli^a, Ricardo A. Machado-de-Ávila^c, Bruno M. Roatt^b, Danielle F. de Magalhães-Soares^d, Daniel Menezes-Souza^{a,b}, Eduardo A.F. Coelho^{a,b,*}, Mariana C. Duarte^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^d Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2016

Received in revised form 11 February 2017

Accepted 9 March 2017

Available online 10 March 2017

Keywords:

Enolase

Vaccine

Leishmania infantum

Leishmania braziliensis

Immune response

ABSTRACT

In the present study, the *Leishmania braziliensis* enolase protein was evaluated as a vaccine candidate against visceral leishmaniasis (VL). The DNA sequence was cloned and the recombinant protein (rEnolase) was evaluated as a vaccine, associated with saponin, as an immune adjuvant. The protective efficacy of the rEnolase plus saponin combination was investigated in BALB/c mice against *Leishmania infantum* infection. The results revealed that the vaccine induced higher levels of IFN- γ , IL-12, and GM-CSF when a capture ELISA and flow cytometry were performed, as well as an antileishmanial nitrite production after using *in vitro* stimulation with rEnolase and an antigenic *Leishmania* preparation. The vaccinated animals, when compared to the control groups, showed a lower parasite burden in the liver, spleen, bone marrow, and paws' draining lymph nodes when both a limiting dilution technique and RT-PCR assay were performed. In addition, these mice showed low levels of antileishmanial IL-4, IL-10, and anti-*Leishmania* IgG1 isotype antibodies. Partial protection was associated with IFN- γ production, which was mainly mediated by CD4⁺ T cells. In conclusion, the present study's data showed that the *L. braziliensis* enolase protein could be considered a vaccine candidate that offers heterologous protection against VL.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus and is transmitted to mammalian hosts through the bite of an infected female phlebotomine sand fly (Bates et al., 2015). The disease is endemic in 98 countries, with

more than 380 million people at risk (WHO, 2016). Infections with *Leishmania donovani* or *L. (chagasi) infantum* species result in clinical outcomes that range from an asymptomatic infection to fatal visceral leishmaniasis (VL) (Gardinassi et al., 2016). The treatment of disease presents some problems (Kobets et al., 2012; Singh et al., 2012), which have made it necessary to develop alternative control measures, such as vaccinations (Kaye and Aebischer, 2011; Agallou et al., 2014).

The development of infective promastigote forms is an important prerequisite for the transmission of disease. The sand fly midgut microbiome is a critical factor for *Leishmania* growth and differentiation to its infective state prior to parasite transmission (Kelly et al., 2017). Although the development of a successful preventive vaccine for human leishmaniasis was still not achieved,

* Corresponding author at: Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Av Dr. Alfredo Balena, 30130-100, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

¹ Senior author.

ANEXO A - Vetor de clonagem utilizado para a obtenção da proteína recombinante

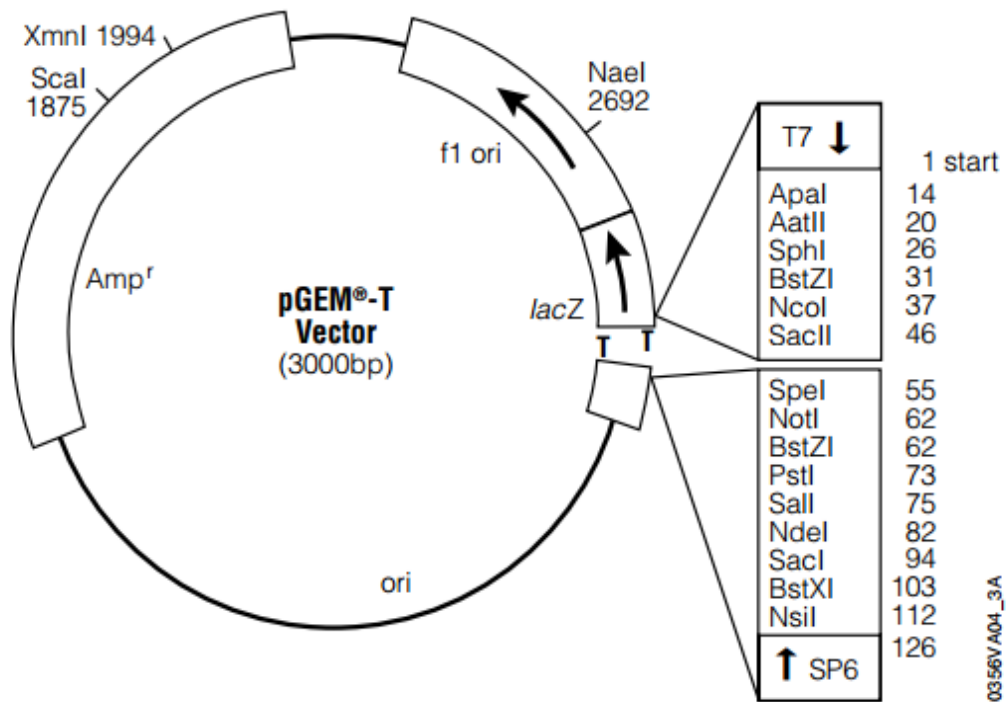


Figura 11 Vetor de clonagem utilizado para a obtenção da proteína recombinante, p-GEM-T Easy Vector Systems (Promega).

Figura 12 Vetor de expressão utilizado para a obtenção da proteína recombinante, pET28a(+) TEV.**Figura 13** Vetor de clonagem utilizado para a obtenção da proteína recombinante, p-GEM-T Easy Vector Systems (Promega).

ANEXO B - Vetor de expressão utilizado para a obtenção da proteína

pET-TEV – 5357pb

* The thrombin recognition site of PET28a (Novagen) was replaced by a TEV protease recognition site

```

XbaI                               NcoI      His tag
aattccctcctagaataaatntcgtttaactttaagaaggagatataccatgggccatcatcatcatcac
ttaaggggagatctttattanagcaaattgaaattcttctctatatggtaaccggtagtagtagtagtagt
MetGlyHisHisHisHisHisHis
  
```

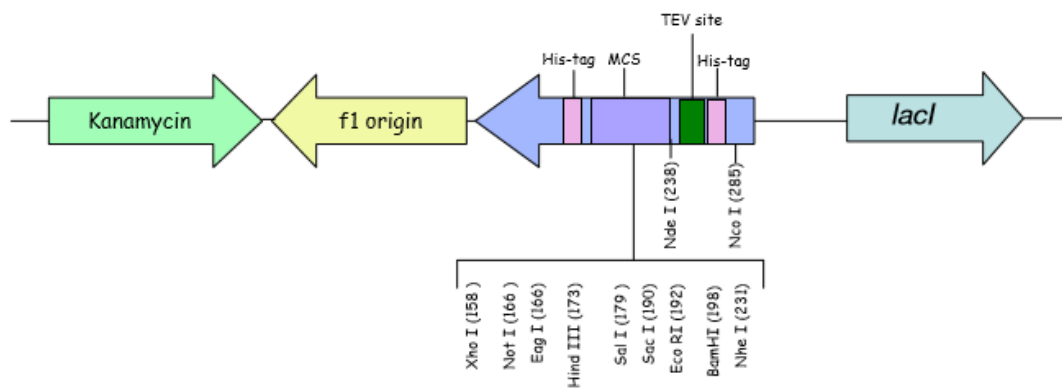
```

TEV      NdeI      T7 tag      BamHI  EcoRI  SacI
gaaaacctgtattttcagggccatatggctagcatgactggaggacagcaaatgggtcgcggatccgaattcgagctc
cttttgacataaaaagtcctcggtataccgatcgtaactgaccacctgtcgtttaccagcgcttaggcttaagctcgag
GluAsnLeuTyrPheGlnGlyHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeu
  
```

```

SalI  HindIII  Not I   XhoI      His tag
cgtcgacaagcttggggcccgaactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccga
gcagctgttcgaacgcggcggtgagctcgtgggtgggtgggtgggtgactctagccgacgattgtttcgggctt
ArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd
  
```

pET28a (+) TEV 5357 bp



His-tag coding sequence	207 - 239/265 - 282
TEV site	244 - 264
MCS	158 - 238
<i>lacI</i> coding sequence	1102 - 2181
Kan coding sequence	4376 - 5233
F1 origin	5365 - 5820

Figura 14 Vetor de expressão utilizado para a obtenção da proteína recombinante, pET28a(+) TEV.