

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação da resposta imune e proteção induzidas pela
cepa CL-14 de *Trypanosoma cruzi*, geneticamente
modificada para expressar o antígeno A2 de
*Leishmania L. infantum***

Daniel Henrique Doro Pereira

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Ana Paula Fernandes

CO-ORIENTADORA: Dra. Caroline Junqueira

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2013

Daniel Henrique Doro Pereira

**Avaliação da resposta imune e proteção induzidas pela
cepa CL-14 de *Trypanosoma cruzi*, geneticamente
modificada para expressar o antígeno A2 de
*Leishmania L. infantum***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Fernandes

Co-orientadora: Dra. Caroline Junqueira

BELO HORIZONTE

Fevereiro - 2013

“A Ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário.”

(Albert Einstein)

“Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, companheiro fiel nas madrugadas e eterna motivação da minha carreira, sem o qual nada disso seria possível.

À minha família, meu tesouro precioso, pelo apoio incondicional e por me encorajarem diariamente a perseguir meus sonhos com responsabilidade e diligência. Espero um dia poder retribuí-los pelo amor e carinho.

Aos colegas do Centro de Pesquisas René Rachou, pela paciência em me acolher, pelas incontáveis ajudas nos procedimentos outrora desconhecidos e pelo exemplo de profissionalismo e empenho na carreira acadêmica.

Aos amigos da Biomol, pelo apoio em diversos experimentos, pelos momentos de descontração e pela amizade sempre presente, mesmo nos momentos de aflição. Nosso longo período de convivência ficará para sempre marcado em minha carreira.

Aos amigos queridos, por ajudarem a aliviar o fardo e por trazerem alegria nos momentos de preocupação. Essa conquista também é de vocês!

Ao Dr. Leonardo Damasceno pelo apoio constante no fornecimento de materiais e protocolos necessários ao estudo, pelas dicas de procedimento em diversas situações e pelo exemplo de profissional empenhado e plenamente sucedido.

Ao Prof. Dr Anderson Miyoshi, por se disponibilizar a ser avaliador do projeto, pelas críticas construtivas e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr Ricardo Gazzinelli, por disponibilizar o laboratório do Centro de Pesquisas René Rachou, por colaborar com o projeto e pelos votos de confiança.

À minha co-orientadora, Dra. Caroline Junqueira, pela paciência excepcional, pela enorme ajuda nos procedimentos, por se disponibilizar a me co-orientar nesse trabalho e pelas orientações que servirão para toda a vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Ana Paula Fernandes, pela enorme paciência que tem permanecido desde o início da minha carreira científica, pelos conselhos e orientações que durarão para a vida toda e pela agradável convivência que já dura quase 6 anos.

Aos membros da banca, por se disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética da UFMG, pela oportunidade de concretizar um sonho e pelo louvável ensino da Ciência. Que dure para sempre.

*A todos os que tornaram esse sonho possível,
Muito Obrigado!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 - Leishmanioses	15
1.1.1 - Aspectos Clínicos e Epidemiológicos	16
1.1.2 - Medidas de Controle da Leishmaniose Visceral	21
1.1.3 - Resposta Imune contra leishmaniose	24
1.1.4 - Vacinas contra leishmaniose.....	26
1.2 - Tripanosomatídeos e os antígenos comuns	27
1.2.1 - Resposta imune ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.2.2 - A cepa CL-14.....	31
1.3 - Transformação de tripanossomatídeos	32
1.4 - A proteína A2.....	33
1.4.1 - Caracterização Funcional e Estrutural.....	34
1.4.2 - Imunogenicidade da proteína A2	35
2 – JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	38
3 – OBJETIVOS	39
3.1 - Objetivo geral:	39
3.2 - Objetivos específicos:	39
3.2.1 - Construir o vetor pROCKA2Neo para transfecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> , visando a expressão endógena	39
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 - Construção do vetor pROCK A2Neo	40
4.1.1 - Liberação do sítio de clonagem do pROCKGFPNeo	41
4.1.2 - Digestão do gene A2 sintético	41
4.1.3 - Clonagem e confirmação da sequência do gene A2	43

4.2 - Transfecção da cepa CL-14 de <i>T. cruzi</i> com o plasmídeo pROCKA2Neo	43
4.2.1 - Eletroporação de parasitas	44
4.2.2 - Cultivo de parasitas	45
4.2.3 - Extração do DNA genômico da cepa CL-14 A2.....	45
4.3 - Confirmação da obtenção da cepa CL-14 expressando a proteína A2.....	46
4.3.1 - PCR convencional	46
4.3.2 - Purificação da Proteína Recombinante A2	46
4.3.3 - Western Blot	47
4.3.4 - Imunofluorescência	48
4.4 - Avaliação da resposta imune induzida pela cepa CL-14 expressando A2	49
4.4.1 - Imunização	50
4.4.2- Resposta Humoral - ELISA de anticorpos	50
4.4.3- Resposta Celular - ELISPOT	51
4.4.4- Resposta Celular - ELISA de citocinas	53
4.5 - Avaliação da proteção conferida pela cepa CL-14 expressando A2 contra infecção por <i>Leishmania infantum</i>	53
4.5.1- Desafio	53
4.5.2- Carga Parasitária - Ensaio de Diluição Limitante	54
4.6 - Plotagem de dados e estatística.....	54
5 – RESULTADOS	55
5.1 - Construção do vetor pROCKNeoA2 para expressão da proteína A2 recombinante	55
5.2 - Confirmação da transfecção da cepa CL-14 com a construção pROCKNeoA2 e análise da expressão da proteína A2	56
5.3 - Resposta humoral induzida pela imunização com CL-14 A2	57
5.4 - Avaliação da produção de IFN- γ via ELISPOT	59
5.5 - Avaliação da produção de IFN- γ por ELISA de sobrenadante	61
5.6 - Resposta protetora contra desafio por <i>Leishmania L. infantum</i>	63
6 – DISCUSSÃO	64
7 – CONCLUSÕES	73
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9 – ANEXOS.....	844

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	17
Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo.	21
Figura 3. Representação esquemática do modelo proposto para a resposta imune contra leishmaniose.	26
Figura 4. Diagrama de distribuição de genes entre os tripanosomatídeos.	29
Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos imunológicos que medeiam a resposta imune inata e adquirida	31
Figura 6. Estrutura primária da proteína A2.	36
Figura 7. Mapeamento de epítomos da proteína A2 de <i>L. donovani</i>	38
Figura 8. Representação esquemática do vetor pROCKGFPNeo para expressão de cassetes exógenos em <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
Figura 9. Representação esquemática do plasmídeo pET9a24a-A2HIS.	43
Figura 10. Cassete de inserção no genoma do parasita, linearizado com <i>NotI</i>	45
Figura 11. Representação esquemática da lâmina de Imunofluorescência.	50
Figura 12. Representação esquemática da localização dos peptídeos na proteína A2.	53
Figura 13. Construção do vetor pROCKNeoA2.	56
Figura 14. Confirmação da transfecção da cepa CL-14 e expressão da proteína A2.	58
Figura 15. Resposta humoral após primeira e segunda dose induzida pela imunização com CL-14 A2.	59
Figura 16. Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos imunizados, quando submetidos a diferentes estímulos (ELISPOT)	60
Figura 17. Comparação da produção de IFN- γ por esplenócitos de animais infectados com CL14A2 e demais grupos (ELISPOT).	61
Figura 18. Produção de IFN- γ pelos esplenócitos de camundongos imunizados, quando submetidos a diferentes estímulos (ELISA).	62
Figura 19. Comparação da produção de IFN- γ pelos esplenócitos de animais infectados por CL-14A2 e demais grupos (ELISA).	63
Figura 20. Carga parasitária do baço e fígado de camundongos desafiados com <i>Leishmania L. infantum</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da leishmaniose em humanos.....	18
Tabela 2. Sequência e localização dos peptídeos da proteína A2.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
'	minutos
''	segundos
µg	microgramas
µL	microlitros
A2	<i>amastigote-specific 2</i>
A2r	<i>recombinant Amastigote-specific 2</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
aa	aminoácidos
Abs.	absorbância
B.O.D.	<i>biochemical oxygen demand</i>
BIMAS	<i>behavior intervention monitoring assessment system</i>
BiP	<i>binding protein</i>
CaCl₂	cloreto de cálcio
K₂HPO₄	fosfato dibásico de potássio
CO₂	dióxido de carbono
CpG	<i>cytosine phosphate guanine</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DALYs	<i>disability-adjusted life years</i>
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
DCL	<i>diffuse cutaneous leishmaniasis</i>
DDT	dicloro difenil tricloroetano
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
DTT	<i>dithiothreitol</i>
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FeSO₄	sulfato de ferro II
MgSO₄	sulfato de magnésio II
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gGAPDH II	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene</i>
gp82	glicoproteína 82
h	hora
H₂O_{dd}	água destilada
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	ácido sulfúrico
HIS	histidina

HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
ICT	<i>immuno-chromatography</i>
IFAT	<i>immunofluorescence antibody test</i>
IFN	interferon
IL	interleucina
Kb	quilobase
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilo Dálton
KHCO₃	bicarbonato de potássio
kV	kilovolts
L.	<i>Leishmania</i>
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LIT	liver infusion triptose
LMC	leishmaniose mucocutânea
LPS	lipopolissacarídeo
LV	leishmaniose visceral
mA	miliampére
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
KH₂PO₄	fosfato monobásico de potássio
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
mL	mililitro
min	minuto
mM	milimolar
MnCl₂	cloreto de manganês
M	molar
mRNA	RNA mensageiro
Na₂EDTA	etileno diamino tetracetato de sódio
Neo	neomicina
MPLA	lipídio monofosforil A
ng	nanograma
NH₄Cl	cloreto de amônio
NK	células <i>natural killer</i>
Ig	imunoglobulina
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
NY-ESO	<i>New York esophageal squamous cell carcinoma</i>
°C	graus Celsius
ORF	<i>open reading frame</i>

p/v	peso por volume
pb	pares de base
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PKDL	<i>post-kala-azar dermal leishmaniasis</i>
psi	<i>pounds per square inch</i>
PVC	policloreto de vinila
qsp.	quantidade suficiente para
rA2	recombinant protein A2
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
rRNA	RNA ribossômico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-polycrilamide gel electrophoresis</i>
SFB	soro fetal bovino
SL	<i>spliced leader</i>
T.	<i>Trypanosoma</i>
TAE	<i>tris acetate-EDTA buffer</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TcP2β	<i>Trypanosoma cruzi acidic ribosomal P2 type protein</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	<i>trademark</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
U/mL	unidades enzimáticas por mililitro
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultra violeta
V	volts
v/v	volume por volume

RESUMO

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas que afetam predominantemente países subdesenvolvidos. Dentre as manifestações clínicas da doença, a leishmaniose visceral é a forma mais grave, sendo classificada como a segunda causa de mortalidade, dentre as doenças tropicais. Dada a gravidade e complexidade desse negligenciado problema de saúde pública, torna-se necessária a pesquisa de vacinas capazes de proteger as populações em risco. As vacinas desenvolvidas a partir de organismos vivos atenuados mimetizam o curso natural da infecção, oferecendo um amplo repertório antigênico ao sistema imune do hospedeiro e induzindo uma resposta duradoura e protetora. No presente estudo, a cepa não-virulenta CL-14 de *Trypanosoma cruzi* foi transfectada com o vetor integrativo pROCKNEO contendo o gene sintético da proteína A2 (729pb), cujo caráter imunogênico e capacidade protetora já haviam sido demonstrados em diversos estudos. A expressão de A2 na cepa CL-14 foi confirmada por PCR, Western Blotting e imunofluorescência. Camundongos BALB/c foram imunizados intraperitonealmente com 10^7 parasitas transgênicos por protocolo *prime-boost* homólogo. O soro e os esplenócitos dos animais foram coletados e testados por ELISA e ELISPOT, em relação à produção anticorpos anti-A2 e de IFN- γ . Os resultados foram comparados com os obtidos com proteína A2 recombinante (A2r), associada a MPL-A ou Alúmen + CpG. Os animais foram então desafiados subcutaneamente com 10^7 promastigotas de *Leishmania L. infantum* e a carga parasitária avaliada em fígado e baço, após 30 dias. A imunização com a construção CL-14 A2 potencializou a resposta celular ao antígeno A2 e peptídeos derivados, associada à células CD4 e CD8, com elevada produção de IFN- γ , e foi capaz de induzir proteção parcial em camundongos BALB/c, contra a infecção por *L. infantum*. Esses achados foram estatisticamente significativos, quando comparados aos observados para os grupos controle ou que receberam rA2 associada aos tipos diferentes de adjuvantes. Os resultados desse estudo confirmam o antígeno A2 como candidato vacinal promissor e sugerem que a estratégia utilizada representa uma abordagem capaz de promover imunogenicidade e proteção contra leishmaniose visceral, constituindo-se em estratégia alternativa para o desenvolvimento de vacinas, podendo incluir pesquisas visando testar e associar outros antígenos e protocolos de vacinação.

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a group of infectious diseases caused by protozoan parasites that affect predominantly underdeveloped countries. Among the clinical forms of the disease, visceral leishmaniasis is, certainly, the most severe, being considered the second cause of death, amongst all tropical diseases. Given the severity and complexity of this neglected public health issue, it is necessary to invest in research for vaccines capable of protecting the population under risk. Live attenuated vaccines can simulate the natural course of infection more closely, presenting a rich repertoire of antigens to the host's immune system, potentially leading to a more potent and durable immunity. In the present study, the *Trypanosoma cruzi* CL-14 non-virulent strain was transfected with the integrative pROCKNeo plasmid containing a 729bp synthetic A2 gene, which has been previously shown to be immunogenic and protective in different studies. BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 10^7 recombinant parasites through a homologous prime-boost protocol. Sera and splenocytes of mice were collected and tested in ELISA and ELISPOT and checked for anti-A2 antibodies and IFN- γ production, respectively. The results were compared with the ones obtained for the recombinant protein (rA2) associated with either MPL-A or Alúmen + CpG adjuvants. Mice were then challenged subcutaneously with 10^7 *Leishmania L. infantum* promastigotes and the parasite burden of liver and spleen was checked after 30 days. The immunization with the CL-14 A2 construct not only elicited a strong cellular CD4 and CD8 immune response, with high levels of IFN- γ , but also induced partial protection in BALB/c mice against *L. infantum* challenge. The difference among these results was significantly statistical when compared to the ones obtained with rA2, despite the use of two distinct adjuvants. Altogether, these results support the A2 antigen as a promising vaccine candidate and suggest that the expression of this protein in the CL-14 non-virulent strain may improve immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis, being an alternative in the search for new vaccines, including the association and test of different antigens and vaccination protocols.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Leishmanioses

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae). *Leishmania* spp. são parasitas de ciclo heteroxênico, que se desenvolvem como promastigotas e paramastigotas (formas flagelada), no intestino do hospedeiro invertebrado e como amastigotas intracelulares (forma sem flagelo), nos macrófagos de hospedeiros vertebrados (BARBIERI, 2006). Os hospedeiros invertebrados são fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, subfamília Phlebotominae), insetos encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais, dos quais dois gêneros são de importância médica por serem vetores de *Leishmania*: *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (DOSTALOVA; VOLF, 2012).

A transmissão da infecção ocorre quando formas promastigotas metacíclicas do parasita são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado pela fêmea do flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo. A saliva do flebotomíneo possui propriedades anticoagulantes, vasodilatadoras e imunomoduladoras, que favorecem o estabelecimento e manutenção da infecção (MCCALL et al., 2013). As promastigotas invadem, ou são fagocitadas por células do hospedeiro, imediatamente recrutadas, e dentro dos fagolisossomos de macrófagos, as promastigotas resistentes se diferenciam e replicam como amastigotas, que infectam macrófagos vizinhos, ou de tecidos remotos (MURRAY et al., 2005a; CHAPPUIS et al., 2007).

O desenvolvimento no hospedeiro invertebrado se inicia quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. Após o repasto, a mudança das condições entre os hospedeiros, como diminuição da temperatura e aumento do pH, desencadeia a diferenciação dos parasitas em promastigotas pró-cíclicas. Essas formas proliferam no interior do vetor e, após 48-72 horas, começam a se diferenciar em formas metacíclicas, que são mais infectivas (DOSTALOVA; VOLF, 2012). O ciclo do parasita encontra-se esquematizado na Figura 1.

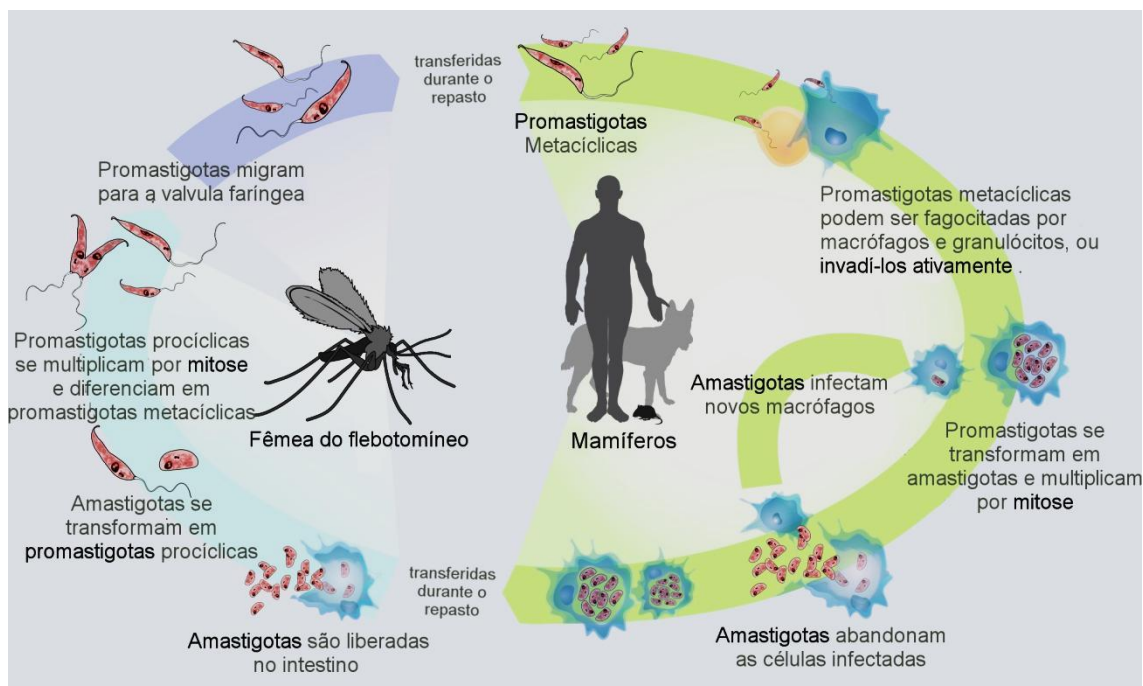


Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico da *Leishmania*.

Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons>, Adaptado por Daniel Doro.

1.1.1 - Aspectos Clínicos e Epidemiológicos

As leishmanioses afetam predominantemente países subdesenvolvidos, sendo considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo. Estima-se uma prevalência mundial de aproximadamente 12 milhões de casos, anualmente acrescidos por 2 milhões de novos casos. Tal prevalência é responsável por uma mortalidade anual de 60.000 pessoas, sendo superada dentre as doenças infecto-parasitárias apenas pela malária (DESJEUX, 1996, 2004). Um total de 98 países nos 5 continentes reportaram transmissão endêmica de leishmaniose, sendo mais de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 casos de leishmaniose cutânea por ano, colocando em risco uma população de aproximadamente 350 milhões de pessoas (ALVAR et al., 2012).

As manifestações clínicas da doença variam de acordo com a espécie de *Leishmania* causadora (Tabela 1), o estado imunológico do hospedeiro, a localização, a presença de outras doenças infecciosas e fatores genéticos também ligados ao hospedeiro (SAPORITO et al., 2013).

	Main clinical pathology	Transmission cycle	Main geographical distribution
New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Viannia) braziliensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	South America, parts of Central America, Mexico
<i>L (Viannia) panamensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	Northern South America and southern Central America
<i>L (Viannia) peruviana</i>	LCL	Zoonotic	Peru
<i>L (Viannia) guyanensis</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Viannia) lainsoni</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, DCL	Zoonotic	South America
<i>L (Leishmania) mexicana</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Central America, Mexico, USA
<i>L (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L (Leishmania) garnhami</i>	LCL	Zoonotic	South America
Old World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Ethiopia, Kenya
<i>L (Leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonotic	North Africa
<i>L (Leishmania) major</i>	LCL	Zoonotic	Central Asia, north Africa, middle east, East Africa
<i>L (Leishmania) tropica</i>	LCL	Anthroponotic	Central Asia, middle east, parts of north Africa, southeast Asia
<i>L (Leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	Anthroponotic	Africa, central Asia, southeast Asia
Old and New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Leishmania) infantum</i>	Visceral, LCL	Zoonotic	Europe, north Africa, Central America, South America
LCL=localised cutaneous leishmaniasis. DCL=diffuse cutaneous leishmaniasis. *Subgenus is given in parentheses. Southeast Asia includes the Indian subcontinent and China			

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose em humanos. Distribuição das espécies de *Leishmania* conforme localização, manifestação clínica da doença e ciclo de transmissão. Análises das sequências de DNA de *Leishmania* não puderam distinguir a espécie *L. infantum* da espécie *L. chagasi*, de maneira que o nome *L. infantum* é usado para ambas as espécies.

Fonte: REITHINGER et al., 2007

A **leishmaniose cutânea localizada (LCL)** pode se manifestar com uma ou mais lesões na pele durante várias semanas ou meses após a picada do vetor. Ocasionalmente, as lesões

podem aparecer meses ou anos depois. A lesão se inicia com uma pápula, que se desenvolve em um nódulo no local da picada. O nódulo ulcera progressivamente em um período de 2 semanas a 6 meses atingindo o seu tamanho final (PAVLI; MALTEZOU, 2010). As lesões com bordas elevadas podem regredir gradualmente em meses ou anos deixando uma cicatriz profunda de pigmentação alterada. A formação de nódulos satélites nas proximidades da lesão é comum. Fatores como tamanho da lesão, tempo de regressão e reincidência, variam conforme a espécie causadora e o estado imunológico do paciente, podendo inclusive ocorrer infecção assintomática. As principais espécies causadoras de LCL no Velho Mundo são: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. Já no Novo Mundo é causada por várias espécies dos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*, a saber: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana*, além de alguns, embora raros, casos associados a *L. infantum* (REITHINGER et al., 2007).

A **leishmaniose mucocutânea** (LMC) é observada no Novo Mundo, onde é causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, que devido às suas propriedades metastáticas, podem invadir a mucosa bucal e do trato respiratório superior através da disseminação pela circulação linfática ou hematogênica. As lesões nasais estão sempre presentes e 1/3 dos pacientes ainda podem desenvolver lesão em outros sítios: faringe, palato, laringe, traqueia e lábio superior. 1-10% das leishmanioses cutâneas resultam na manifestação mucocutânea 1-5 anos após a cura da lesão. A doença jamais apresenta cura espontânea, o tratamento é complicado e a ocorrência comum de infecções bacterianas secundárias a torna potencialmente fatal (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; REITHINGER et al., 2007). Fatores de risco associados à essa manifestação incluem: desnutrição, localização do sítio da lesão acima da cintura, extensão e regressão tardia da lesão primária (MURRAY et al., 2005a).

A **leishmaniose cutânea difusa** (LCD) é uma rara variante anérgica da leishmaniose cutânea, com a manifestação característica de numerosos nódulos não ulcerativos e multiparasitários especialmente nas superfícies dos membros e na face, se assemelhando à lepra lepromatosa. Nesse caso, não ocorre cura espontânea, além de ser observada frequentemente a ocorrência de recidivas (HEPBURN, 2003; SINHA et al., 2008). Essa manifestação é comumente associada às espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, no Novo Mundo e *L. aethiopica*, no Velho Mundo (REITHINGER et al., 2007).

Finalmente, a **leishmaniose visceral ou kala-azar (LV)** é causada por parasitas do complexo *L. donovani* no Leste da África e subcontinente indiano e *L. infantum* na Europa, Norte da África e América Latina. Constitui uma forma cuja manifestação geralmente ocorre após um período de incubação de 2 a 6 meses. Os sintomas mais comuns apresentados são: febre, indisposição, tremores, ou calafrios, perda de peso, anorexia e desconforto no hipocôndrio esquerdo. Os sinais observados são consequentes da invasão parasitária ao sistema sanguíneo e retículo-endotelial e se apresentam como: esplenomegalia, com ou sem hepatomegalia, desgaste e palidez de membranas mucosas. O persistente estado inflamatório pode levar ao desenvolvimento de anemia devido à esplenomegalia e consequente destruição periférica de eritrócitos. Com o avanço da doença, a esplenomegalia pode aumentar, causando distensão abdominal e dor, que pode ser agravada pela ocorrência concomitante da hepatomegalia (CHAPPUIS et al., 2007).

A manifestação clínica da leishmaniose visceral varia conforme a região endêmica. Por exemplo, os sintomas do kala-azar (febre negra), como é conhecido na Índia, ainda incluem: hiperpigmentação da superfície da face, mãos e abdome. A linfadenopatia é comumente observada no Sudão, porém é rara em outras regiões endêmicas (CHAPPUIS et al., 2007; GRIENSVEN, VAN; DIRO, 2012).

Em algumas localidades, ainda há o aparecimento de nódulos cutâneos, máculas, pápulas e/ou placas na região perinasal, podendo expandir para os ombros, tórax e extremidades. Essa manifestação é conhecida como **leishmaniose dérmica pós kala-azar (PKDL)** e aparece após o tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. donovani*. É considerada um sinal de recuperação da imunidade celular contra o parasita, embora o parasita ainda possa ser detectado nas lesões. Por esse motivo, os pacientes de pós kala-azar atuam como reservatórios e podem potencialmente participar da transmissão da doença. PKDL é comum no Sudão (50-60% dos casos), onde ocorre durante, ou após 6 meses de tratamento e menos frequentemente na Índia (5-10%), manifestando-se anos após o tratamento (GRIENSVEN, VAN; DIRO, 2012).

Embora as infecções por espécies viscerotrópicas de *Leishmania* possam ser assintomáticas, a leishmaniose visceral é fatal se não tratada. A maioria das mortes por LV passam despercebidas e mesmo com o tratamento, 10-20% dos casos podem levar à fatalidade. Além disso, fatores como desnutrição, imunossupressão, principalmente

associada a co-infecção por HIV, podem predispor à manifestação clínica da doença (BERN et al., 2005).

A leishmaniose visceral é, sem dúvida, a forma mais grave da doença, sendo classificada como a segunda em mortalidade dentre as doenças tropicais, com 20.000 a 40.000 mortes por ano, e a quarta em morbidade, com mais de 2 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs). Estima-se que 500.000 novos casos surgem anualmente e mais de 50.000 óbitos, embora este dado provavelmente esteja subestimado. Casos de LV já foram relatados em 70 países de 5 continentes, com exceção da Oceania e Antártica, conforme indicado na Figura 2. Mais de 90% desses casos, no entanto, ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia, Brasil e Índia, onde a incidência da doença é de aproximadamente 300.000 casos por ano (MATHERS et al., 2007; ALVAR et al., 2012).

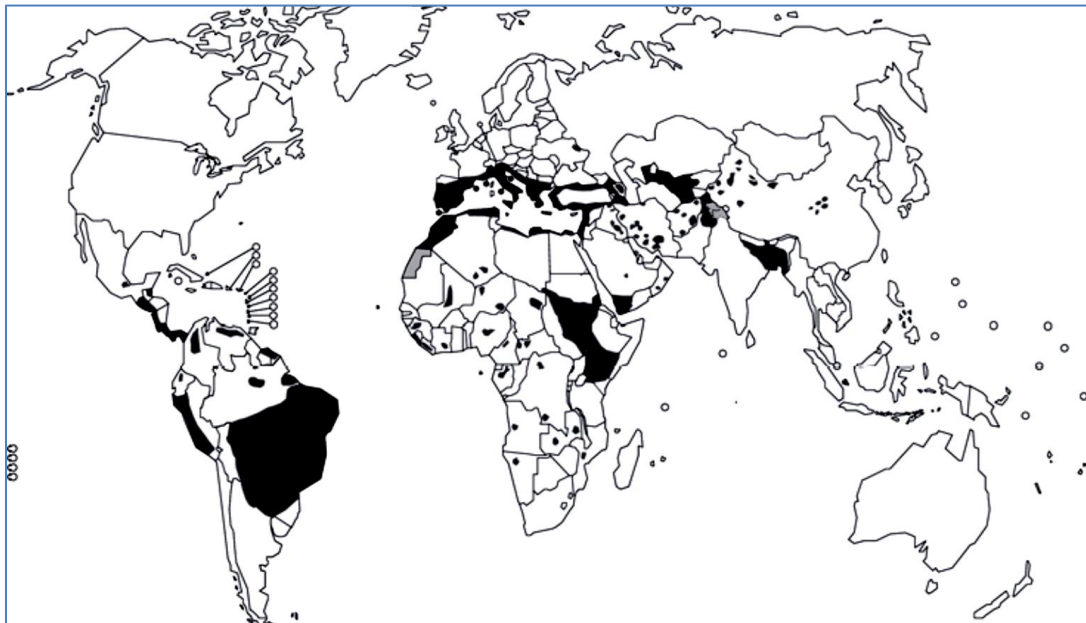


Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo. As regiões escuras no mapa representam áreas de prevalência da doença. A transmissão antroponótica no nordeste da Índia, sudeste do Nepal e centro de Bangladesh contribui para a incidência de mais de dois terços de todos os casos de LV no mundo. O Leste Africano é o segundo maior foco de LV, com a maior incidência na Etiópia e Sudão, seguido da Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Oeste Asiático e no Novo Mundo, predominantemente no Brasil.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE, 2007.

1.1.2 - Medidas de Controle da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral pode ser diferenciada segundo as características da transmissão: na LV zoonótica, a doença é transmitida do reservatório animal para o humano e na LV antroponótica a transmissão ocorre entre os humanos. No primeiro caso, os humanos são hospedeiros casuais, enquanto que os animais, principalmente os cães no meio urbano, são os reservatórios do parasita. A transmissão zoonótica é observada em áreas endêmicas de *L. infantum*, enquanto que a antroponótica é observada nas áreas endêmicas de *L. donovani* (ALVAR et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007).

As estratégias de controle da leishmaniose visceral baseam-se no controle de reservatórios e vetores, através do uso de materiais inseticidas, detecção e tratamento de casos e vacinação preventiva contra leishmaniose em animais e/ou humanos no caso das espécies antroponóticas (CHAPPUIS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2013).

O controle da população de vetores é uma alternativa que visa interromper a transmissão, principalmente no ambiente peridomiciliar, sendo necessário um estudo ecológico minucioso do comportamento dos flebotomíneos: espécie, hábitat, alcance de vôo, preferência de hospedeiro, locais de repouso, ritmo circadiano e sazonalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE, 2007). Os flebotomíneos são susceptíveis aos mesmos inseticidas que os vetores da malária, pertencentes ao gênero *Anopheles*. A ação residual nas casas pulverizadas com o inseticida DDT, mostrou-se uma estratégia eficaz na Índia, onde o vetor do gênero *Phlebotomus* é restrito ao ambiente peridomiciliar. Infelizmente, a doença re-emergiu com a descontinuidade das campanhas de pulverização. Devido à resistência apresentada por esses vetores, é improvável que a pulverização com esse agente químico volte a ser um método de controle eficiente (KAUL et al., 1994). Existem poucas evidências de que o uso de redes impregnadas com inseticidas é capaz de proteger contra a leishmaniose visceral. Dependendo dos hábitos noturnos da população e dos hábitos de repasto dos vetores, outras estratégias de prevenção devem ser avaliadas para proteção contra a transmissão da doença (REYBURN et al, 2000). O uso de coleiras, impregnadas com inseticidas, em cães é essencial e deve ser encorajado como medida de controle especialmente em áreas endêmicas (RIBEIRO et al., 2013).

O diagnóstico de cães também é de extrema importância para o controle da doença, por se tratar do principal reservatório no ambiente urbano e visto que os sinais e sintomas

por si só não são específicos o suficiente para diferenciar a patologia de outras. Portanto, o diagnóstico deve ser feito com base em sinais clínicos e confirmação parasitológica, sorológica e/ou molecular. Além disso, a padronização de testes é de extrema importância para reduzir a possibilidade de resultados falsos positivos (RIBEIRO et al., 2013). Em humanos a sintomatologia da doença também se confunde com outras como: a malária crônica, esquistossomose, entre outras infecções sistêmicas. A suspeita deve ser levantada sobre todo paciente com febre e esplenomegalia, seguida dos testes para diagnóstico confirmatório, sendo eles: parasitológico – detecção do DNA parasitário por PCR, ou microscopia de aspirados teciduais, cuja especificidade varia conforme o tecido; e sorológico – imunofluorescência indireta (IFAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), ou imunocromatografia (ICT). Ainda assim, grande parte dos pacientes de áreas endêmicas apresentam sorologia positiva, mesmo com a ausência da infecção. Portanto, a combinação de dois testes de tipos diferentes é necessária para confirmação do diagnóstico (ROMERO; BOELAERT, 2010).

As alternativas de tratamento atualmente utilizadas na América Latina são baseadas em evidências científicas limitadas. Até hoje não foram realizados estudos randomizados de fase 3 para nenhum tipo de tratamento. Os medicamentos com propriedades antileishmaniais atualmente conhecidos são: antimonialis pentavalentes, desoxicolato de anfotericina B, formulações lipídicas de anfotericina, paromomicina, isetionato de pentamidina, miltefozina e alguns agentes anti-fúngicos azólicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE, 2007). Mesmo com essa variedade de alternativas, alguns desafios ainda precisam ser superados. São eles: a elevada toxicidade de alguns medicamentos, desenvolvimento de resistência pelo parasita para certas formulações, o alto custo de determinadas drogas e a baixa eficácia de grande parte desses tratamentos. As prioridades de pesquisa incluem o desenvolvimento de estudos clínicos com os medicamentos citados, bem como diferentes combinações, a fim de diminuir a duração e dosagem nos esquemas de tratamento, possibilitando a redução da toxicidade. Além disso, fatores clínicos associados com a falha dos tratamentos devem ser estudados para permitir intervenções que reduzam as taxas de mortalidade (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Até hoje, nem o papel dos cães na transmissão da *L. infantum* para humanos, nem os benefícios da eutanásia dos reservatórios, atingiram um consenso na literatura. Vários estudos realizados no decorrer das últimas décadas estabelecem uma co-relação entre a

prevalência da infecção nos cães e o aumento da incidência entre humanos. A discrepância entre os resultados sugere que as infecções entre os dois hospedeiros podem possuir dinâmicas distintas e se relacionam de maneira mais complexa do que prevista (COSTA, C. H. N., 2011). O programa de eliminação de cães infectados não apenas é eticamente controverso, como é defeituoso em sua proposta por diversos motivos: demonstrou-se teoricamente que o método de eutanásia dos animais é pouco eficiente em comparação com as estratégias de controle vetorial; outros reservatórios podem ser fontes de infecção por *L. infantum*, como canídeos silvestres e roedores; a população canina é rapidamente reposta, exigindo uma frequência de retirada de cães soropositivos impraticável; existe uma baixa eficiência dos testes sorológicos em detectar infecção canina; utiliza-se um único método para a triagem e para a confirmação da infecção por *L. infantum*, de maneira que observa-se grande ocorrência de resultados falso-positivos, quando a prevalência real pode ser menor do que prevista; não existem experimentos que demonstraram vantagens exclusivas da eliminação dos cães, visto que nos relatos em que se observou vantagem, houve o uso concomitante de controle químico dos vetores (COSTA, C. H. N., 2001; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Visto que não há evidência concreta sobre a dimensão da contribuição canina na infecção humana (COSTA, C. H. N., 2008) e que existe um dilema ético óbvio sobre a estratégia, a eliminação de cães é a intervenção menos aceitável na comunidade e deve ser desencorajada como medida de controle. Por esse motivo, a prevenção através da vacinação é, sem dúvida, uma medida urgente, cujo estudo deve ser encorajado a fim de, junto com outras alternativas, superar os desafios envolvidos no controle da leishmaniose (ROMERO; BOELAERT, 2010). Dada a complexidade da doença e sua distribuição na população, é improvável que o controle seja conseguido por intervenção única. Portanto, o uso concomitante de todas as alternativas é necessário para se observar uma real diminuição da incidência (MURRAY et al., 2005; COLER; REED, STEVEN G, 2005). Os aspectos da pesquisa de vacinas contra leishmaniose serão abordados com maior detalhamento em outra seção, por constituírem o tema central do trabalho.

1.1.3 - Resposta Imune contra leishmaniose

O desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th1 é indispensável para o controle da infecção por *Leishmania*, já que a produção de IFN- γ por diferentes subtipos celulares promove o controle intracelular de amastigotas através da ativação de macrófagos e indução da produção de óxido nítrico, cuja atividade promove a morte de parasitas intracelulares no contexto da explosão oxidativa (ROBERTS, 2005). Camundongos IFN- γ *knockout* mostraram susceptibilidade à infecção por *Leishmania major* (WANG, Z. E. et al., 1994). Além disso, observam-se baixos níveis de IFN- γ produzidos por PBMCs em indivíduos com leishmaniose visceral (SCHRIEFER et al., 2008). Em concordância, observou-se experimentalmente o desenvolvimento de um perfil de resposta do tipo CD4+ helper 1 (Th1), caracterizada pela produção das citocinas IFN- γ e IL-12, em camundongos geneticamente resistentes à infecção por *Leishmania major* (SCOTT et al., 1988; HEINZEL et al., 1991). Assim também, em hamsters e humanos, observou-se uma expressão aumentada das citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-12, associadas à resposta celular do tipo 1, em fenótipos resistentes à infecção por espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (MELBY et al., 2001a).

Em contrapartida, IL-10 e TGF- β agem modulando negativamente a resposta Th1 durante a leishmaniose visceral, favorecendo a persistência do parasita. Pacientes com leishmaniose visceral ativa, possuem altos níveis de IL-10 no soro, bem como níveis elevados de mRNA de IL-10 no baço, fígado, linfonodos e medula óssea (NYLÉN et al., 2007; ANSARI et al., 2011). A inibição de IL-10 na leishmaniose visceral humana é capaz de elevar os níveis de IFN- γ produzidos por PBMCs, bem como a neutralização de IL-10 no soro inibe a replicação de parasitas da espécie *L. donovani* em macrófagos (GHALIB et al., 1995). Outro mecanismo proposto para o favorecimento da infecção pela citocina IL-10 é a inibição da resposta de macrófagos a sinais ativadores, diminuindo a produção de TNF- α e óxido nítrico (NO) (NYLEN et al., 2007).

A progressão da doença também foi caracterizada pela síntese de IL-4 nos estágios iniciais da infecção em modelo murino de leishmaniose cutânea (SCOTT, 1991). Níveis elevados de IL-4 também foram encontrados em pacientes com leishmaniose visceral (SUNDAR et al., 1997; NYLEN et al., 2007). Além disso, experimentos em camundongos *knockout* e camundongos tratados com anticorpos anti-IL-4 mostraram que esses animais são capazes de resistir à infecção por *L. major*, indicando que IL-4 teria um papel favorável

também à persistência do parasita (KOPF et al., 1996). No entanto, o papel dessa citocina ainda não está completamente esclarecido.

Estudos ainda mostraram o papel importante das células T CD8+ para o controle da leishmaniose visceral, tanto por apresentarem uma considerável atividade citotóxica contra *Leishmania infantum*, quanto pela produção de IFN- γ , cuja importância para o controle da infecção já foi mencionada (TSAGOZIS et al., 2003, 2005). Os linfócitos T CD8+ são células com atividade citotóxica capazes de lisar diretamente as células infectadas do organismo (HAFALLA et al., 2006). Além disso, já foi demonstrado que, embora em menor quantidade que as células T CD4+, os linfócitos T CD8+ também produzem quantidades significativas de IFN- γ em indivíduos infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, confirmando que a imunidade protetora também está relacionada a presença de células T CD8+ (BOTTREL et al., 2001; BACELLAR et al., 2002; ROSTAMI et al., 2010).

Embora os mecanismos envolvidos na progressão da infecção por parasitas do gênero *Leishmania* ainda não estejam plenamente esclarecidos, a sumarização do conjunto de evidências foi usada para propor o modelo esquematizado na Figura 3.

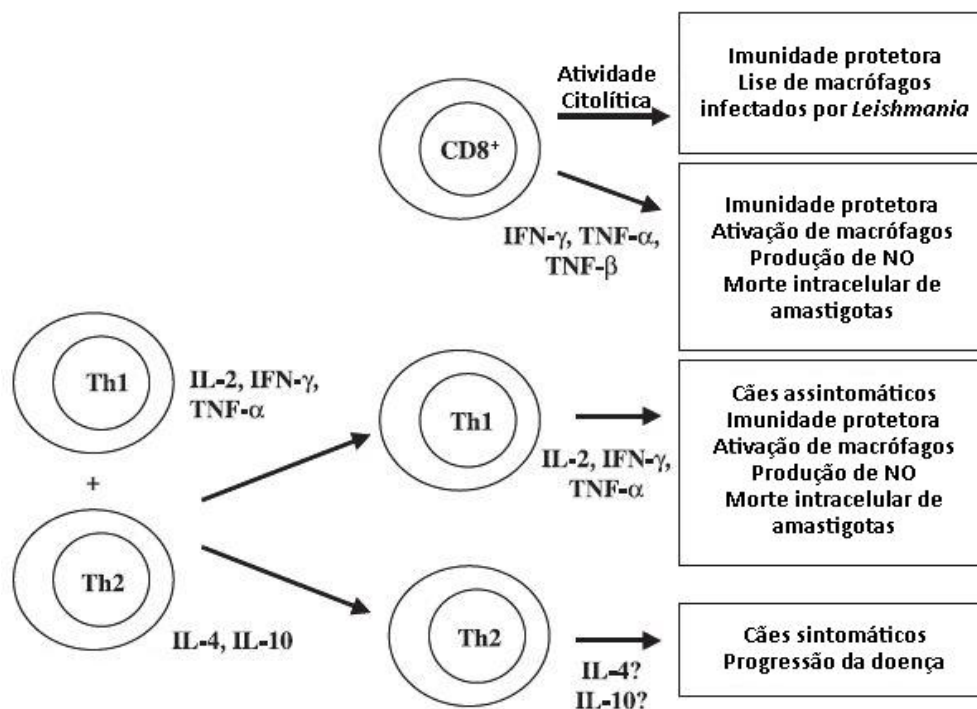


Figura 3. Representação esquemática do modelo proposto para a resposta imune contra leishmaniose. A imagem representa de maneira simplificada, os mecanismos de resposta imune estudados e os efeitos na proteção ou susceptibilidade contra a leishmaniose visceral. É possível observar que o IFN- γ é indispensável para o controle da doença tanto por sua atividade citolítica quando pela ativação de macrófagos.

Fonte: BARBIERI, 2006. Adaptado por Daniel Doro

Muito ainda se discute sobre a participação de anticorpos na infecção por *Leishmania*. Diversos estudos apontam evidências de que células B e anticorpos contribuem para a susceptibilidade à leishmaniose, pela fixação da fração C3 do complemento, aumentando o dano tecidual e outras reações inflamatórias (GHOSH et al., 1995; RNET et al., 2008; DEAK et al., 2011). Também foi demonstrado que camundongos *knockout* para a porção Fc de imunoglobulinas são resistentes à infecção por *Leishmania* (BOLAJI; BUXBAUM, 2008). Em contrapartida, outros estudos mostram a importância da presença de células B para o controle da infecção por *L. donovani* (SMELT et al., 2000) e seu efeito de diminuição da carga parasitária (BANKOTI et al., 2012).

1.1.4 - Vacinas contra leishmaniose

Ao longo dos anos, observou-se a crescente demanda pelo desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz como alternativa de controle da leishmaniose. Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre a imunobiologia do parasita, a obtenção de uma vacina ainda permanece um desafio. Problemas como o custo, a complexidade antigênica e variabilidade das espécies e a resposta mista gerada no hospedeiro, limitam o progresso no desenvolvimento de tais vacinas (SINGH, B.; SUNDAR, 2012).

As vacinas de primeira geração englobam a primeira intervenção bem sucedida, com até 100% de eficácia, um processo conhecido como leishmanização. O processo consistia na administração de parasitas viáveis do gênero *Leishmania* por via cutânea, em algum sítio discretamente localizado do corpo, formando uma lesão auto-limitante e conferindo proteção contra infecções posteriores (KHAMESIPOUR et al., 2005; NOAZIN et al., 2008). Apesar da eficácia desse método, ele foi rejeitado por diversas agências regulatórias, por ser potencialmente problemático para indivíduos imunocomprometidos, além da dificuldade de padronização da dose, visto que os parasitas perdiam a infectividade, após o cultivo prolongado. Contudo, a eficácia do método levou diversos grupos a pesquisarem alternativas para melhorar a técnica.

Parasitas mortos, porém íntegros, foram também testados com diversos adjuvantes e, embora tenha havido um ganho na segurança, a estratégia não se igualou em eficácia ao uso dos parasitas vivos (EVANS; KEDZIERSKI, 2012). Até hoje, no entanto, buscam-se alternativas de atenuação dos parasitas sem que se perca a eficácia da vacina.

A segunda geração de vacinas são compostas de antígenos purificados, ou subfrações de parasitas incluindo, as proteínas recombinantes, poliproteínas, formulações lipossomais e sistemas de veiculação de antígenos por células dendríticas (EVANS; KEDZIERSKI, 2012). Nesse caso, induz-se resposta imune contra um ou poucos componentes protéicos do patógeno, sem haver a ameaça da presença do parasita íntegro. Embora essa alternativa apresente maior segurança, é pouco provável que um único antígeno confira total proteção contra um parasita complexo como a *Leishmania* (COLER; REED, STEVEN G, 2005).

Ultimamente, tem havido um grande investimento em uma nova geração de vacinas. Juntamente com as proteínas recombinantes, o DNA tem sido frequentemente testado como vetor vacinal. A indução de respostas Th1 levando a uma potente imunidade de células T citotóxicas é uma propriedade geral das vacinas de DNA (RODRIGUES, MAURICIO M et al., 2003).

Historicamente, as vacinas desenvolvidas a partir de organismos vivos atenuados têm provado ser mais eficazes do que as tradicionais vacinas de subunidades (RIVIER et al., 1999). O uso desse tipo de estratégia para produção de vacinas contra *Leishmania* é interessante por mimetizar o curso natural da infecção, podendo promover uma resposta imune protetora (UZONNA et al., 2001; BELKAID et al., 2002). Além disso, as “vacinas vivas” oferecem um repertório antigênico completo ao sistema imune do hospedeiro, juntamente com o padrão de reconhecimento apropriado, veiculando antígenos para os compartimentos celulares adequados ao processamento dos mesmos e a apresentação desses ao sistema imune, aumentando, assim, a capacidade de promoção de uma resposta duradoura e protetora (EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

1.2 - Tripanosomatídeos e os antígenos comuns

Organismos da família *Trypanosomatidae* guardam entre si semelhanças não apenas estruturais, como a presença de cinetoplasto e glicossomos, mas também se observa uma arquitetura genômica e conteúdo gênico similar entre as espécies desse grupo. Embora possuam ciclos de vida diferentes e causem patologias diferentes, os organismos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* compartilham um core genômico codificado por

aproximadamente 6.200 genes, organizados em clusters sintênicos policistrônicos (EL-SAYED et al., 2005). Ver figura 4.

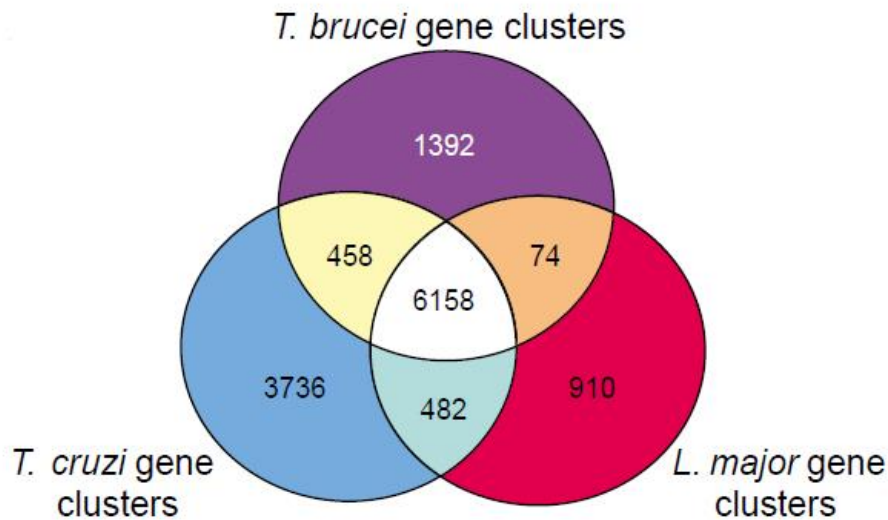


Figura 4. Diagrama de distribuição de genes entre os tripanosomatídeos.

Gráfico de conjuntos evidenciando a intersecção entre os clusters gênicos de três espécies diferentes de tripanosomatídeos.

Fonte: EL-SAYED et al., 2005. Adaptado por Daniel Doro

Além desses dados, estudos anteriores já mostraram um grau significativo de reatividade cruzada entre esses organismos em testes sorológicos, quando utilizado antígeno bruto. Pacientes chagásicos mostraram 98 a 100% de soropositividade pelo ELISA, quando antígenos de *L. braziliensis* e de *L. infantum*, respectivamente, foram usados. Assim também, os anticorpos nos soros de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa apresentaram 100% de resultados positivos pelo ELISA com antígenos de *T. cruzi* ou de *L. chagasi*. Análises de Western Blotting mostraram que os soros chagásicos que reconheceram pelo menos 24 bandas com antígeno bruto de *T. cruzi*, também reconheceram 13 bandas com antígeno de *L. chagasi* e 17 bandas com *L. braziliensis*. Os resultados indicam a presença de determinantes antigênicos comuns em várias proteínas desses protozoários (VEXENAT et al., 1996).

1.2.1 - Resposta Imune ao *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, pertencente também à família *Trypanosomatidae*. Diferentemente da *Leishmania*, o *T. cruzi* apresenta 4 formas distintas: epimastigota (intestino do vetor), tripomastigota metacíclica (infectiva), tripomastigota sanguínea e amastigota - a forma intracelular (TYLER; ENGMAN, 2001). A doença se manifesta em duas fases diferentes: fase aguda - com duração de 2-4 meses, onde se observa alta carga parasitária e parasitemia; e fase crônica - podendo durar a vida toda, com baixo número de parasitas circulantes (GOLGHER, D.; GAZZINELLI, RICARDO T, 2004).

Nos momentos iniciais da infecção por *T. cruzi*, observa-se uma elevada ativação policlonal inespecífica de células T e B, responsável pelo aumento da população de células secretoras de imunoglobulinas, levando à elevação do nível de anticorpos no soro de animais infectados. Esse perfil inicial coincide com a susceptibilidade do hospedeiro e progressão da doença. Foi proposto que essa ativação policlonal inicial do sistema imune serve como mecanismo de evasão do parasita, dispersando a resposta imune e evitando o desenvolvimento de uma potente resposta adquirida contra antígenos específicos do parasita.

Ainda durante a primeira semana da fase aguda da doença, ocorre a ativação de componentes da imunidade inata, com produção sistêmica, por células dendríticas e macrófagos, das citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-12, cuja atividade favorece a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ virgens para a subpopulação Th1 (GOLGHER, D.; GAZZINELLI, RICARDO T, 2004). Tais citocinas, ainda promovem um aumento da atividade de células *Natural Killers* (NK), em conjunto com a expansão policlonal de linfócitos T. A produção de IFN- γ pelas células NK é responsável pela ativação de macrófagos, aumentando sua atividade fagocítica, principalmente através da indução da síntese de Óxido Nítrico (NO), contribuindo para o controle da replicação parasitária e conferindo resistência ao camundongo (SOARES et al., 2003). Além disso, o IFN- γ desencadeia os mecanismos de células efetoras do tipo T CD8⁺ citotóxicas que exercem papel importante no controle da replicação parasitária no tecido cardíaco (TSAGOZIS et al., 2003, 2005).

Após o controle da parasitemia e parasitismo tecidual, mecanismos imunoregulatórios agem no sentido de controlar a resposta imune exacerbada, evitando efeitos deletérios do sistema imune (GOLGHER, D.; GAZZINELLI, RICARDO T, 2004).

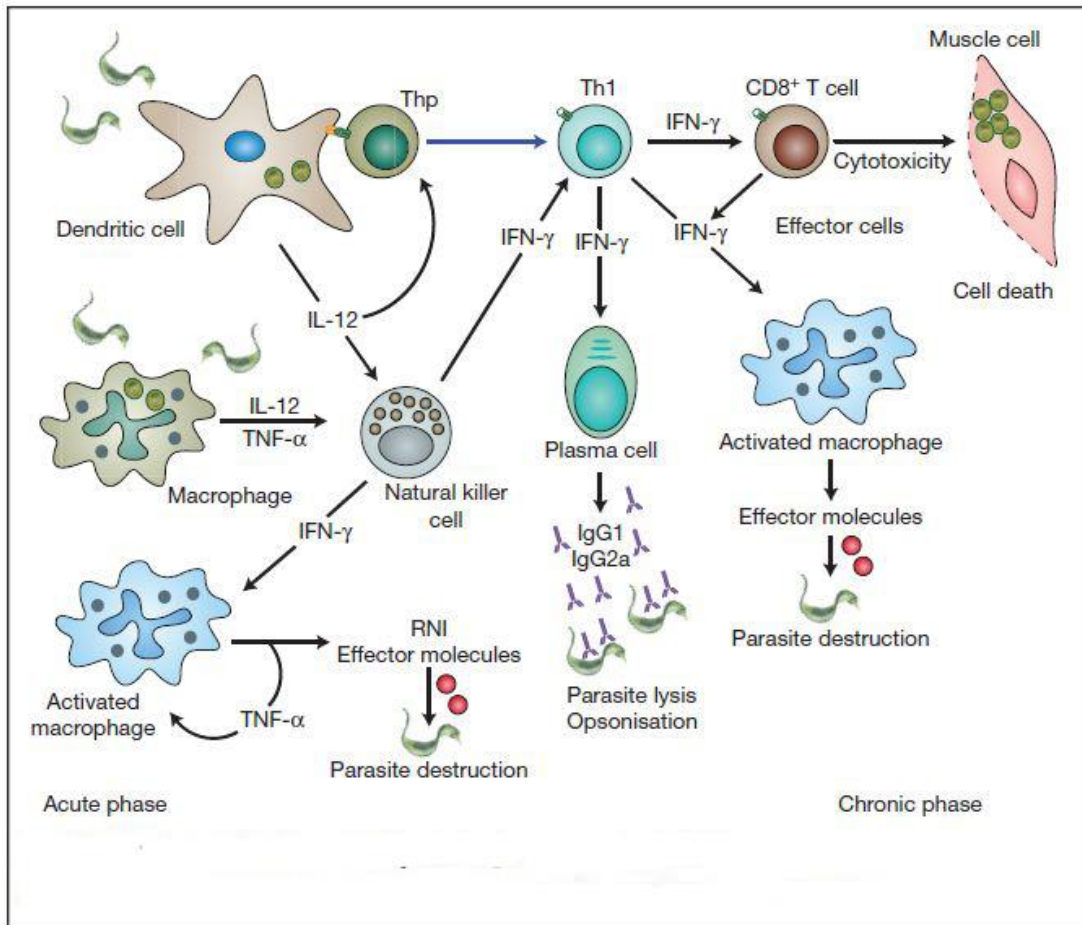


Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos imunológicos que medeiam a resposta imune inata e adquirida. Nos estágios iniciais da invasão de *T. cruzi* a imunidade inata participa crucialmente na resistência do hospedeiro à infecção, agindo como uma primeira linha de defesa, as células do sistema imune inato (Macrófagos, Células NK e Células Dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e células efetoras intermediárias reativas de Nitrogênio (RNIs) e GTPases induzíveis por IFN que controlam a replicação parasitária. Ao mesmo tempo, as células da imunidade inata, particularmente as células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas IL-12 necessárias para a diferenciação e expansão clonal de linfócitos T helper 1 (Th1) CD4+, bem como células T CD8+ e plasmócitos B. O IFN- γ produzido por Th1 CD4+ ou T CD8+ ativa mecanismos efetores em macrófagos para destruir amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, ao passo que a atividade citotóxica apresentada por células T CD8+ destrói células contendo amastigotas intracelulares. Anticorpos produzidos por células B lisam as formas tripomastigotas extracelulares, ou facilitam a fagocitose de parasitas opsonizados com IgG. Abreviações: IFN, interferon; IL, interleucina; NK, natural killer; Thp, Th precursor cell; TNF, tumour necrosis factor.

Fonte: JUNQUEIRA et al., 2010

1.2.2 - A cepa CL-14

Em 1981, o Dr. Egler Chiari isolou um clone não infectivo a partir de culturas da cepa CL, uma cepa de *T. cruzi* altamente infectiva, com tropismo muscular, isolada em 1963 por Brener e Egler. As tripomastigotas metacíclicas do clone 14, apesar de serem capazes de infectar macrófagos *in vitro*, não obtiveram sucesso na infecção *in vivo* nem de modelos mais suscetíveis, como camundongos BALB/c recém nascidos (1-2 dias), (LIMA et al., 1990). Dessa maneira, não se observou parasitismo em nenhum tecido do corpo do animal, mesmo após profunda investigação sistêmica via análises histopatológicas (LIMA et al., 1995).

Além da não-virulência observada nesse clone, foi mostrado que uma única dose foi suficiente para proteger camundongos BALB/c (1-2 dias) contra um desafio letal de tripomastigotas sanguíneos da cepa Y, uma cepa altamente virulenta (LIMA et al., 1990).

Embora não se tenha ainda pleno conhecimento do perfil citocínético capaz de conferir proteção contra a infecção por *T. cruzi*, sabe-se da importância de algumas células, citocinas e imunoglobulinas para essa condição. Alguns trabalhos já avaliaram as respostas imunes envolvidas na proteção conferida pela cepa CL-14 e embora alguns estudos apontem a baixa produção de IFN- γ (PAIVA et al., 2003; SOARES et al., 2003), outros mostraram que a vacinação com CL-14 foi capaz de induzir uma potente imunidade mediada por células T, com produção de altos níveis de IFN- γ , bem como o aumento da resposta proliferativa de esplenócitos, com expansão transiente da população de células T CD8⁺ (PAIVA et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2011). Altos níveis de IgG2a, IgG2b e IgG1 também foram observados após imunização com a cepa CL-14 (PYRRHO et al., 1998). Portanto, esses fatores podem caracterizar, ainda que grosseiramente, o perfil imunológico misto responsável pela proteção conferida pela cepa CL-14.

Os mecanismos moleculares envolvidos na não-virulência da cepa CL-14 ainda permanecem pouco esclarecidos. Todavia, já foi descrito que a expressão da glicoproteína de membrana gp82 está significativamente diminuída na superfície do clone CL-14, quando comparada com a cepa CL. Essa proteína é responsável por estabelecer inicialmente a interação parasita-hospedeiro e promover a invasão, através de uma cascata de sinalização que mobiliza o Ca²⁺, essencial para a internalização do parasita (ATAYDE et al., 2004).

Curiosamente, a infectividade *in vitro* à células Vero foi afetada a 37°C, visto que a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas foi inibida. Esses são dados sugerem que o

ambiente do hospedeiro vertebrado e sua alta temperatura (37°C) podem ser os fatores responsáveis pela avirulência da cepa CL-14 (BRENER et al., 1976).

As propriedades imunogênicas da cepa CL-14 levaram à escolha da mesma como vetor vacinal de um antígeno antitumoral. Esse organismo atenuado possui agonistas de receptores toll-like, que favorecem a indução de uma potente e persistente resposta celular mediada por células T helper do tipo 1 (Th1). Além disso, o parasito possui a capacidade de sobreviver nos tecidos do hospedeiro estimulando continuamente a resposta imune e a habilidade de replicar-se no citoplasma da célula hospedeira, induzindo a apresentação de antígenos a células T CD8. A vacinação com a cepa CL-14 carregando o antígeno antitumoral NY-ESO, foi capaz de ativar mecanismos altamente eficazes na morte e controle de células tumorais, indicando que o uso dessa estratégia deve ser explorado em outros estudos vacinais (JUNQUEIRA et al., 2011).

1.3 - Transformação de tripanossomatídeos

Os microorganismos eucariotos têm chamado a atenção de parasitologistas não apenas pela sua relevância médica, mas também por apresentarem mecanismos distintos de controle da expressão gênica. Algumas características peculiares são encontradas nos tripanossomatídeos, incluindo: transcrição policistrônica, processamento via *trans-splicing* do pré-mRNA, edição do RNA mitocondrial e transcrição de genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase I (CLAYTON, 2002).

Os transcritos primários de tripanossomatídeos são policistrônicos, ou seja, em um único mRNA existem várias sequências codificadoras separadas por regiões intergênicas, que são sítios para duas reações de processamento: a poliadenilação do gene a montante e o *trans-splicing* de um miniéxon “encapado” a jusante. Trata-se de uma sequência de 39 nucleotídeos conhecida como *spliced leader* (SL) que, após a primeira clivagem, se torna a extremidade 5' do mRNA maduro. A segunda clivagem está associada com a poliadenilação e ocorre em um sítio a cerca de 1kb de distância do sítio acceptor de *trans-splice*, resultando na formação de um mRNA monocistrônico, contendo o 5' cap e a 3' poli(A). Esse processo ocorre simultaneamente, ou imediatamente após a transcrição (LEBOWITZ et al., 1993; DAROCHA et al., 2004).

Grande parte do conhecimento sobre expressão gênica em tripanosomatídeos foi gerado através do desenvolvimento de protocolos de transfecção e de uma nova geração de vetores plasmidiais foi obtida com a introdução de sequências derivadas de promotores de rRNA, favorecendo a expressão de genes reporter (TYLER-CROSS et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1995; MARTINEZ-CALVILLO et al., 1997). A introdução dessas sequências, junto com os segmentos de genes contendo o sítio de adição da sequência SL (*spliced-leader*) e 5'UTR, levou a um rendimento de expressão de gene repórter duas vezes maior do que os vetores tradicionais. Para aumentar ainda mais a eficiência de transfecção em *T. cruzi*, sequências capazes de influenciar o processamento correto do pré-mRNA, bem como a estabilidade do mRNA maduro, vêm sendo adicionadas a jusante do promotor de rRNA e testadas quanto a estabilidade conferida, eficiência de tradução e eficiência de *trans-splicing* (DAROCHA et al., 2004).

Da Rocha e colaboradores (2004) desenvolveram um vetor (pROCKNEO), conforme as características citadas, para integração de cassetes de expressão. no genoma do parasito A construção está esquematizada na Figura 8 em Materiais e Métodos. Após a transfecção de $0,4 \times 10^8$ epimastigotas de *T. cruzi* com esse vetor, a seleção durante 4 meses com o antibiótico G418 foi capaz de gerar 10% de parasitas resistentes expressando o gene reporter. O grupo padronizou protocolos de eletroporação de *T. cruzi* com o vetor, mostrando a expressão estável de diferentes genes nas cepas CL Brener e Tulahúan (DAROCHA et al., 2004). Com isso, foi possível adaptar a estratégia para a modificação genética da cepa CL-14, a fim de que essa expressasse constitutivamente a proteína A2, veiculando-a como antígeno vacinal às células dos animais em estudo.

1.4 - A proteína A2

O gene codificador da proteína A2 foi inicialmente identificado por Hugues Charest e Greg Matlashewski, em 1994. Através da estratégia de identificar genes constitutivamente expressos apenas em amastigotas, visava-se descobrir proteínas importantes para citodiferenciação entre os estágios promastigota e amastigota da *Leishmania donovani*. Acreditava-se que os genes expressos apenas em amastigotas estariam envolvidos com a sobrevivência do parasita no hospedeiro humano, visto que essa é a forma presente nos

fagolisossomos dentro de macrófagos. Após o screening, foi isolado um transcrito de 3,5kb presente apenas em macrófagos infectados com amastigotas e não em promastigotas, ou macrófagos não infectados. Ainda assim, foi possível estimular a expressão da proteína em promastigotas ao elevar a temperatura para 37°C e reduzir o pH para 4,5, condições que simulam o ambiente do fagolisossomo. Esses dados indicaram a relação entre a expressão da proteína e a sobrevivência do parasita no ambiente do macrófago (CHAREST, H; MATLASHEWSKI, G, 1994).

1.4.1 - Caracterização Funcional e Estrutural

Ultimamente, diversos estudos têm sido conduzidos para caracterizar a função da proteína A2. De uma maneira geral, sabe-se que A2 está envolvida na sobrevivência do parasita nos órgãos do hospedeiro (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010). O grande desafio é saber qual é o papel específico da mesma. Cada vez mais se reforça a evidência de sua correlação com situações de *stress*, seja ele oxidativo, choque térmico, dobramentos errôneos de proteínas, ou resposta a proteínas desdobradas (UPR), uma vez que todos esses estímulos induzem a expressão da proteína, até mesmo em promastigotas (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012). Inicialmente a hipótese era atribuir à proteína a função de chaperona, uma vez que a predição de sua estrutura revelou o dobramento em várias folhas-beta, conformação que costuma estar associada à interação com proteínas maldobradas e desdobradas para estabilizá-las, ou redobrá-las. De fato, mostrou-se que a proteína A2, submetida ao choque térmico, interagiu com a chaperona BiP (*Binding Protein*), colocalizando-se no retículo endoplasmático e aumentando a viabilidade do parasita submetido ao choque (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010). Entretanto, experimentos com ditioneitol (DTT), reagente responsável por simular o *stress* de resposta à proteína desdobrada (UPR), mostraram que a A2 não protegeu contra esse tipo de *stress*. Por outro lado, com a expressão de A2, houve proteção significativa contra o *stress* por choque térmico e oxidativo, bem como a diminuição de espécies reativas de oxigênio (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012).

Embora muito se tenha pesquisado a respeito da função específica da proteína A2, o mecanismo pela qual ela protege o parasita contra as situações de *stress* permanece incerto,

especialmente porque várias vias de resposta a *stress* estão intimamente ligadas, tornando extremamente difícil uma aproximação mais conclusiva de seu mecanismo bioquímico. A proteína A2 não tem homologia com nenhuma proteína de função conhecida, embora a predição de sua estrutura indique que é mais provável que ela tenha um papel estrutural do que enzimático, reforçando a hipótese de sua participação como chaperona (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010, 2012). Os genes A2 se organizam *in tandem* no cromossomo 22 de *Leishmania infantum*, com até quatro arranjos por genoma diplóide. As proteínas codificadas possuem estrutura primária relativamente simples. Em *L. donovani* constituem uma pequena sequência inicial, seguida de 40 a 90 repetições de uma unidade peptídica de dez aminoácidos, formando uma família de proteínas, cujos tamanhos variam de 42 a 100kDa (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994; ZHANG et al., 2003).

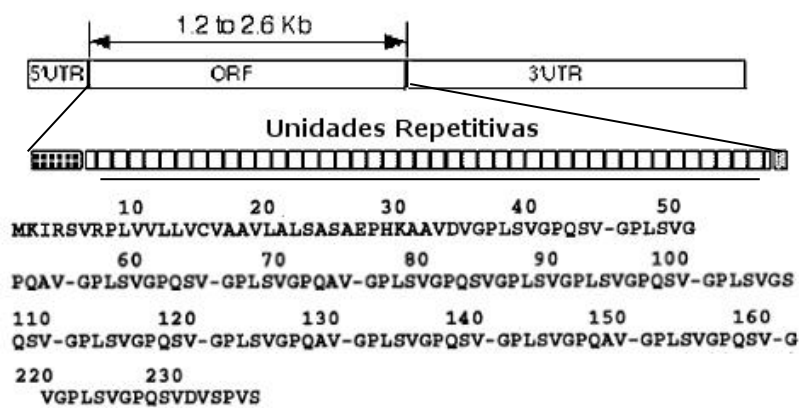


Figura 6. Estrutura primária do gene e da proteína A2. Na parte de cima está representado o gene codificador da proteína A2, cujo tamanho varia entre as espécies e dentro de uma mesma espécie. Em seguida, a representação da pequena sequência original seguida pelas unidades repetitivas, cuja quantidade de repetições também varia. Embaixo, a representação da sequência de aminoácidos. A repetição das unidades ocorre a partir do aminoácido 37.

Fonte: CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994; ZHANG et al., 2003. Adaptado por Daniel Doro

1.4.2 – Imunogenicidade da proteína A2

Já foi demonstrado que soros de cães e humanos, infectados com espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e do Velho Mundo, associadas à leishmaniose visceral reconhecem o antígeno A2 no diagnóstico por ELISA (CARVALHO et al., 2002). Além disso, a

comparação entre diferentes antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina, demonstrou que A2 apresenta os melhores resultados de ELISA na identificação de cães assintomáticos, reforçando a evidência de seu potencial antigênico (PORROZZI et al., 2007).

Desde que a proteína A2 começou a ser cogitada como antígeno vacinal, vários vetores, protocolos vacinais e adjuvantes já foram testados. Formulações proteicas e vacinas de DNA veiculando A2 foram capazes de proteger camundongos contra desafios por *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (GHOSH et al., 2001a; GHOSH et al., 2001b; COELHO et al., 2003; ZANIN et al., 2007). Também já foi demonstrado que a imunização passiva de camundongos com esplenócitos de animais previamente vacinados com A2 foi capaz de conferir proteção em camundongos BALB/c e C57BL/6 contra desafio por *L. donovani* (GHOSH et al., 2001a). Em geral, essa proteção sempre esteve associada a altos níveis de IFN- γ produzidos após a vacinação. Essa característica está de acordo com o que se espera de vacinas eficazes contra leishmaniose visceral, que devem ser capazes de induzir respostas celulares via linfócitos T CD4+ e T CD8+, com produção de altos níveis IFN- γ (TSAGOZIS et al., 2003; ROBERTS, 2005).

Atualmente, a proteína A2 recombinante está presente na formulação de uma vacina comercialmente disponível contra a leishmaniose visceral canina. A vacina LeishTec[®], em estudo clínico de fase II, mostrou ser capaz de induzir uma resposta do tipo Th1, com níveis elevados de IFN- γ , em cães da raça beagle. Além disso, a vacinação com LeishTec[®] foi capaz de proteger os cães, reduzindo a carga parasitária na cultura de medula óssea e sangue periférico e evitando, ou retardando a manifestação de sintomas. Finalmente, a vacinação com LeishTec[®] não induziu soroconversão nos animais avaliados com o teste utilizando antígeno total de promastigotas, permitindo a diferenciação entre animais infectados e vacinados (FERNANDES et al., 2008). Recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde aprovaram o estudo de fase III da vacina LeishTec[®], confirmando que 96,5% dos animais devidamente vacinados responderam a vacina e foram protegidos contra a leishmaniose visceral.

Tendo em vista a proteção conferida por A2 em diversos ensaios, RESENDE et al. (2008) caracterizaram a estrutura do epítipo de célula B presente na estrutura da proteína e mapearam, através de ferramentas de bioinformática, os peptídeos reconhecidos pelos complexos principais de histocompatibilidade (MHC) do tipo I, que apresenta antígenos para células T CD8+ e do tipo II, que apresenta para células T CD4+.

A predição *in silico* indicou a presença de peptídeos de alto *score* de afinidade para o haplótipo D^d de MHC-I (CD8) e um epítipo para células B, denominado B-1. Além disso, duas sequências para ligação no MHC-II (CD4-1 e CD4-2) foram geradas conforme mostra a Figura 7. O epítipo B-1 foi reconhecido pelo soro de camundongos vacinados com A2 recombinante e com o anticorpo monoclonal anti-A2, mostrando a mesma reatividade que a proteína inteira. O peptídeo VG PQSVGPL presente na porção repetitiva da proteína A2, foi caracterizado como imunodominante para células T CD8+, ao estimular intensamente e especificamente esplenócitos CD8+ para a produção de IFN- γ , além de induzir atividade citotóxica em camundongos imunizados com a construção Adenovírus A2. Da mesma forma, o peptídeo CD4-2 SASAEPHKA AVDVGPL foi reconhecido por células CD4+ produtoras de IFN- γ , através de ELISPOT.

Os resultados apresentados nesse estudo mostraram o caráter imunogênico da proteína A2 em camundongos BALB/c, além de corroborar o seu potencial de gerar uma resposta Th1 protetora contra *L. infantum*, dessa vez veiculada pelo Adenovírus. O estudo em geral evidencia a utilidade da proteína A2 como antígeno vacinal e diagnóstico (RESENDE et al., 2008).

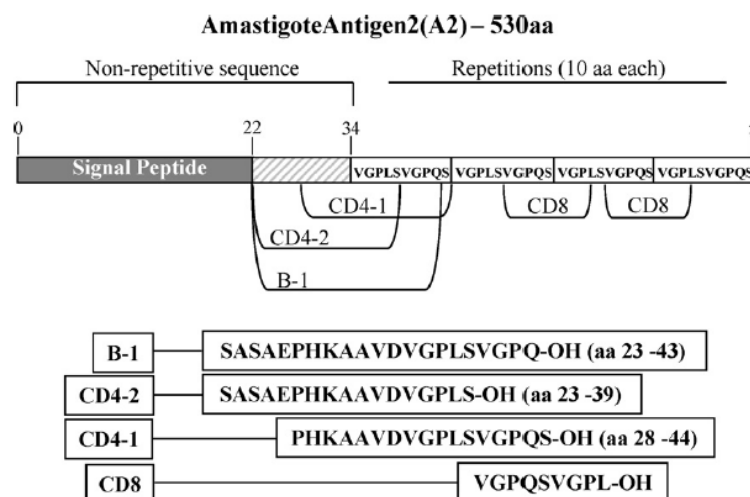


Figura 7. Mapeamento de epítipos da proteína A2 de *L. donovani*. Um epítipo de 9 aminoácidos apresentando alto *score* de ligação ao haplótipo D^d do MHC classe I foi encontrado entre as unidades repetitivas. O epítipo de 21 aminoácidos com afinidade ao receptor de células B foi encontrado na porção não repetitiva e mais uma repetição. E duas outras sequências, de 17 aminoácidos cada, foram artificialmente geradas pela análise da porção N-terminal da proteína para ligação ao complexo MHC classe II.

Fonte: RESENDE et al., 2008

2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os aspectos epidemiológicos, clínicos e os riscos associados à leishmaniose visceral tornam evidente a gravidade deste negligenciado problema de saúde pública, que se expande e atinge diversas regiões do mundo. Dada à complexidade desse problema, é improvável que uma única intervenção seja capaz de controlar plenamente a incidência da leishmaniose visceral. Uma das alternativas em que se deve investir é a prevenção através da vacinação. Para isso, é necessária a pesquisa exaustiva a fim de encontrar formulações capazes de proteger as populações em risco.

A resposta imune e proteção vacinal do antígeno A2 já foram caracterizadas em diversas formulações (vacinas de DNA, recombinantes, veiculadas por organismos atenuados) e modelos animais (camundongos, cães, primatas não-humanos, etc.), resultando na obtenção de uma vacina comercial contra a leishmaniose visceral canina, atualmente presente no mercado. No entanto, ainda é possível aprimorar as formulações existentes.

Baseado nessas necessidades e desafios, o nosso grupo decidiu caracterizar a resposta imune e avaliar a proteção em camundongos contra infecção por *Leishmania L. infantum*, quando inoculados pela cepa CL-14 não-patogênica de *T. cruzi* expressando o gene A2 de *Leishmania L. infantum*, cujo repertório antigênico guarda semelhança com o de *T. cruzi*.

Alguns aspectos que motivaram a escolha dessa abordagem foram: a probabilidade de que um conjunto, e não um antígeno isolado, seja capaz de induzir a resposta ideal; a evidência crescente de que o uso de vacinas vivas atenuadas pode conferir uma resposta imune potente e duradoura; a relação entre o perfil da resposta imune celular e de citocinas, com alta produção de IFN- γ , induzidas pela vacinação com a cepa CL-14 e a proteção contra leishmaniose visceral; o amplo repertório antigênico compartilhado entre os tripanosomatídeos e o vasto conhecimento já acumulado pelo nosso grupo sobre o antígeno A2, facilitando estudos futuros.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Caracterizar a resposta imune e avaliar a proteção contra leishmaniose visceral em camundongos BALB/c, induzida pela cepa não-patogênica de *T. cruzi* (CL-14), modificada geneticamente para expressar o antígeno A2 de *Leishmania L. infantum*.

3.2 - Objetivos específicos:

3.2.1 - Construir o vetor pROCKA2Neo para transfecção de *T. cruzi*, visando a expressão endógena do gene A2 sintético;

3.2.2 - Modificar geneticamente a cepa CL-14 de *T. cruzi*, tornando-a capaz de expressar o gene A2 sintético;

3.2.3 - Caracterizar o perfil de expressão de A2 nas cepas transgênicas obtidas, através de Western Blot e Imunofluorescência;

3.2.4 - Caracterizar a resposta imune celular e humoral em camundongos, avaliando o perfil de citocinas induzido pela cepa geneticamente modificada, bem como a produção de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos contra o antígeno A2;

3.2.5 - Avaliar os níveis de proteção induzidos em camundongos, pela vacinação com o organismo geneticamente modificado e quantificação da carga parasitária em fígado e baço pós-desafio;

3.2.7 – Comparar os resultados obtidos por meio da vacinação com o organismo geneticamente modificado com aqueles obtidos em animais vacinados com a proteína recombinante A2 sintética, associada ao MPLA e CPG/Alumen.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Construção do vetor pROCK A2Neo

Para a transfecção da cepa CL-14 de *T. cruzi*, foi utilizado o plasmídeo pROCKGFPNeo, desenvolvido por DaRocha et al., (2003). Neste plasmídeo, o sítio de inserção para o gene exógeno está contido entre os sítios *Xba*I e *Xho*I, conforme a representação esquemática abaixo. Esse plasmídeo, quando linearizado pela enzima *Not*I (New England Biolabs - Brasil), permite a integração do cassete de expressão no locus multigênico da β -tubulina de *T. cruzi*.

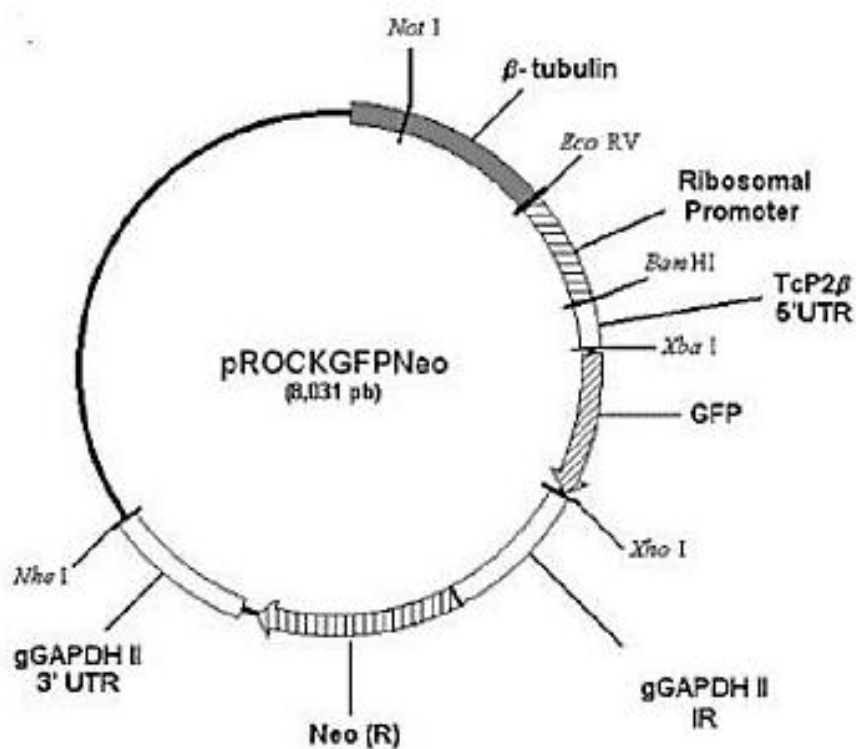


Figura 8. Representação esquemática do vetor pROCKGFPNeo para expressão de genes exógenos em *Trypanosoma cruzi*. O plasmídeo é composto por: promotor ribossomal de *T. cruzi*; a região intergênica da proteína ribossomal TcP2β 50 (HX1), que contém o sítio de adição da sequência *splice leader* para o *trans-splicing* do gene exógeno; um trecho da região intergênica do gene gGAPDH II que contém o sinal de poliadenilação do gene exógeno e os sinais para trans-splicing do marcador de seleção (gene de resistência a neomicina); a 3'UTR do gene gGAPDH II, contendo o sinal de poliadenilação para o marcador de seleção; e o gene reporter GFP (green fluorescent protein) entre sítios de clonagem (*Xba*I/*Xho*I) para o gene exógeno. O cassete de expressão, quando linearizado, torna-se flanqueado por sequências que direcionam a integração para o locus multigênico da β -tubulina por recombinação homóloga.

Extraído de DAROCHA, 2004

4.1.1 - Liberação do sítio de clonagem do pROCKGFPNeo

Para a liberação do sítio de clonagem, 60 µg do plasmídeo pROCKGFPNeo foram simultaneamente digeridos com 10 unidades das enzimas *XbaI* e *XhoI* (Promega) e o produto da digestão foi resolvido em gel de agarose a 1,0%, marcado com 0,5mg/mL de brometo de etídeo e imerso em tampão TAE, submetido à uma corrente de 100V. Para a comparação do tamanho dos fragmentos, o padrão de peso molecular utilizado foi o GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas/Thermo Scientific). A banda correspondente ao plasmídeo linearizado foi extraída com o auxílio de um bisturi e dissolvida a 60°C em tampão contendo 40-50% de tiocianato de guanidina (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit - Promega), o fragmento foi purificado em coluna de sílica e eluído com água deionizada estéril.

4.1.2 - Digestão do gene A2 sintético

O gene sintético codificador da proteína A2 foi obtido a partir do plasmídeo pET9a24a-A2HIS. Essa construção sintética foi delineada, conforme representado na figura 9, e gentilmente cedida pelo Dr. Leonardo Damasceno (Pesquisador visitante, Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG). Inicialmente, foi necessária a destruição do sítio *NotI*, presente na sequência do gene, visto que, posteriormente esse sítio seria utilizado para a linearização do cassete de expressão, antes de realizar a transfecção. Para isso 1 µg do plasmídeo foi linearizado com a enzima *NotI* e submetido à purificação em gel de agarose com o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O fragmento linear teve as extremidades coesivas preenchidas pela Reação de Klenow (Promega) e re-ligadas a 4°C “overnight”, com a enzima T4 DNA Ligase (Promega).

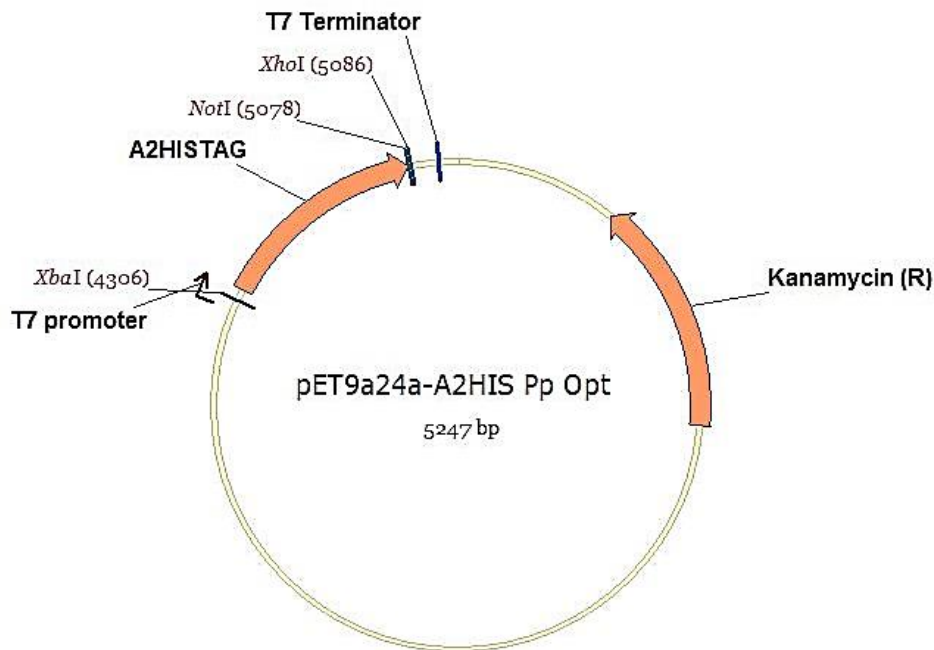


Figura 9. Representação esquemática do plasmídeo pET9a24a-A2HIS. O plasmídeo contendo o gene sintético A2 foi previamente delineado pelo Dr. Leonardo Damasceno e gentilmente cedido ao nosso grupo. A sequência do gene A2 foi modificada para evitar as repetições de sequências nucleotídicas (presentes no gene original), porém mantendo a sequência de aminoácidos da proteína codificada. Ao contrário da proteína original, foram colocadas apenas 10 repetições na sequência final da proteína sintética, reduzindo o tamanho do gene a 729pb, incluindo a cauda de histidina. Além disso, a sequência foi otimizada para expressão em *Pichia pastoris*, observando-se os códons mais utilizados por esse organismo.

Após a ligação, 50µL de uma cultura quimiocompetente de *E. coli* XL1-Blue foi transformada com 2µL do sistema da ligação. Após 30' de incubação em gelo, as culturas foram submetidas a choque térmico de 1' a 42°C e retornadas ao banho de gelo por 2'. Em seguida, foram plaqueadas em Ágar Luria Bertani (LB) contendo 50µg/mL de Kanamicina para a seleção das colônias resistentes. As colônias selecionadas tiveram o plasmídeo extraído por Mini-prep (Qiagen) e submetidas ao teste de digestão com a enzima *NotI* para verificar a destruição do sítio.

Após a confirmação da destruição do sítio *NotI*, 10µg do plasmídeo foram duplamente digeridos com as enzimas *XbaI* e *XhoI* para liberação do gene A2 sintético. A resolução em gel de agarose e purificação foi realizada a exemplo do plasmídeo já mencionado.

4.1.3 - Clonagem e confirmação da sequência do gene A2

Após obtenção dos fragmentos pROCKNeo e A2 purificados, a ligação foi realizada overnight a 4°C e o produto foi usado na transformação de bactérias *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes, conforme exemplo já descrito. O plasmídeo resultante extraído das colônias selecionadas foi submetido a testes para confirmação da ligação bem sucedida.

Óligonucleotídeos foram desenhados flanqueando a região TcP2β - *HX1FW* (5'-TTCTTCAAATATGCAGCAGCGGATT-3') e o gene A2 - *A2NOTRV* (5'-TACCGCGGCCGCCTAGTGGTGATGG-3'). Esses óligos foram usados para confirmação da inserção através de PCR convencional, amplificando o fragmento de 963pb, e sequenciamento automatizado pelo sistema MEGABACE 1000 (GE Healthcare Life Sciences).

Além dessas, ainda foi feita a confirmação através de digestão simultânea com as enzimas *XbaI* e *XhoI* e resolução em gel de agarose, esperando-se em caso confirmatório, a presença das bandas de 7.331pb, correspondente ao plasmídeo pROCKNeo, e 729pb, correspondente ao gene A2 sintético.

4.2 - Transfecção da cepa CL-14 de *T. cruzi* com o plasmídeo pROCKA2Neo

Após a confirmação da construção, 60µg do vetor pROCKA2Neo foram linearizados por digestão única com a enzima *NotI*, linearizando o cassete de expressão apresentado na figura 10. O produto foi então resolvido em gel de agarose e purificado, conforme protocolo anteriormente citado.

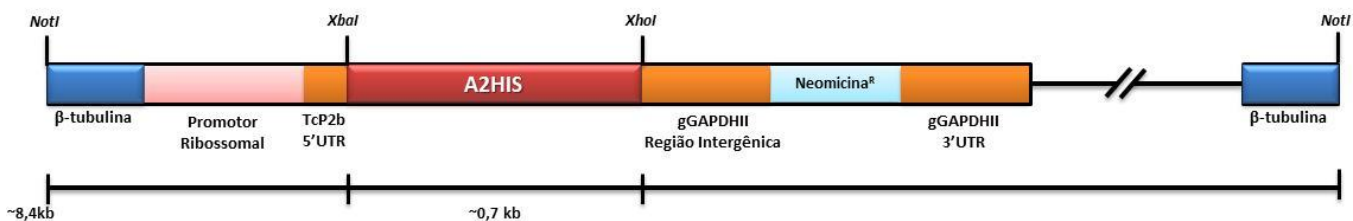


Figura 10. Cassete de inserção no genoma do parasita, linearizado com *NotI*. Plasmídeo pROCKA2Neo linearizado por digestão simples, com enzima *NotI*. O fragmento foi posteriormente purificado e quantificado por espectrofotometria UV no Nanodrop®. O cassete é composto por: promotor ribossomal de *T. cruzi*; a região intergênica da proteína ribossomal TcP2β 50 (HX1), que contém o sítio de adição da sequência *splice leader* para o *trans-splicing* do gene exógeno; um trecho da região intergênica do gene gGAPDH II que contém o sinal de poliadenilação do gene exógeno e os sinais para *trans-splicing* do marcador de seleção (gene de resistência a neomicina); a 3'UTR do gene gGAPDH II, contendo o sinal de poliadenilação para o marcador de seleção; e o gene reporter GFP (green fluorescent protein) entre sítios de clonagem (*XbaI/XhoI*) para o gene exógeno. O cassete de expressão, quando linearizado, torna-se flanqueado por sequências que direcionam a integração para o locus multigênico da β-tubulina por recombinação homóloga. (Thermo Scientific).

4.2.1 - Eletroporação de parasitas

Epimastigotas de *T. cruzi* CL-14 ($2,0 \times 10^7$) em fase exponencial (3-4 dias) foram centrifugadas a 3.000rpm/10' e lavadas com PBS. Foram então, ressuspendidas em tampão de eletroporação (75% CITOMIX - KCl 120mM, CaCl₂ 0,15mM, K₂HPO₄ 10mM, EDTA 2mM, MgCl₂ 5mM, Hepes 25mM, pH 7,6 + 25% Tampão Sacarose - Sacarose 277mM, KH₂PO₄ 7mM, MgCl₂ 1mM, pH 7,4). Os parasitas foram delicadamente homogeneizados nas cubetas de eletroporação, sendo em uma com 50μL (50μg) do plasmídeo pROCKA2Neo linearizado e na outra com o mesmo volume de tampão de eletroporação (MOCK). Após 15' de incubação no gelo, os parasitas foram submetidos a 2 pulsos de 0,3kV e 500μF, intervalados por 10 segundos no sistema Gene Pulser Xcell™ (BioRad). Após mais 10' de incubação à temperatura ambiente, cada cultura foi transferida para uma garrafa de meio de cultura contendo 5mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), penicilina a 100 U/ml, estreptomicina a 100 μg/ml e incubada a 28°C em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.). Após 24h de incubação, adicionou-se a cada cultura 30μL de Geneticina (50μg/μL) para uma concentração final de 300μg/mL. A seleção completa se deu

25 dias após a eletroporação, quando se observou a morte completa dos parasitas da cultura MOCK.

4.2.2 - Cultivo de parasitas

Os parasitas selecionados foram, então, cultivados em 5mL de meio LIT + 10% de SFB contendo penicilina a 100 U/ml, estreptomicina a 100 µg/ml e 300µg/mL de Geneticina, incubados em estufa B.O.D. a 28°C, com passagens semanais até que a cultura atingisse a crescimento exponencial contínuo. Epimastigotas em fase logarítmica eram coletadas com 3-4 dias de cultivo, para avaliação da expressão. Após 15 dias de cultivo, observava-se a predominância de formas tripomastigotas em fase estacionária.

4.2.3 - Extração do DNA genômico da cepa CL-14 A2

Epimastigotas (1×10^7) em fase exponencial foram centrifugados a 3.000RPM/10' e ressuspendidos em 1mL de PBS 1x. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o *pellet* foi ressuspendido em 400µL de Tampão de Lise (Tris-HCl - 10mM; EDTA - 0,1M; SDS - 0,5%; Proteinase K - 100µg/mL; RNase - 70µg/mL; pH 8) e incubado overnight a 56°C para lise completa das células. Após esse período, foi adicionado 400µL de uma solução 25:24:1 de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico e homogeneizado para captura do DNA total na fase aquosa. Após centrifugação a 14.000RPM/15', a fase aquosa foi cuidadosamente coletada, evitando-se a interface protéica e transferida para outro tubo eppendorf. O DNA foi precipitado com uma solução alcóolica (etanol 95%) de acetato de sódio 2M a -20°C durante 20 minutos para otimizar o processo. Após nova centrifugação (14.000RPM/15') para sedimentação do DNA precipitado, o sobrenadante foi descartado e o pellet submetido a duas etapas de lavagem com adição de Etanol absoluto gelado seguidas de centrifugações nas mesmas condições da etapa anterior. Após a última etapa de lavagem, o sobrenadante foi descartado e os eppendorfs incubados na posição invertida e com a tampa aberta para secagem completa do pellet. Cada pellet foi ressuspendido em 200uL de H₂O miliQ estéril e a quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria no UV, com o aparelho NanoVue. (GE Healthcare - Life Sciences)

4.3 - Confirmação da obtenção da cepa CL-14 expressando a proteína A2

Três estratégias foram utilizadas para confirmar a transfecção bem sucedida e a expressão constitutiva da proteína A2 no parasita CL-14 A2. Para os imunoenaios foi utilizado anticorpo monoclonal anti-A2 de camundongo.

4.3.1 - PCR convencional

Óligonucleotídeos foram desenhados para se anelar à região HX1 do gene TcP2β 50 (HX1FW - 5'-TTCTTCAAATATGCAGCAGCGGATT-3') e ao final do gene codificador da proteína A2 (A2NOTRV - 5'-TACCGCGGCCGCCTAGTGGTGATGG-3'). Para amplificação do fragmento de 963pb, foi utilizado o mix da reação com a enzima Taq DNA Polymerase FERMENTAS (Taq Buffer + MgCl₂ - 2mM; dNTP Mix - 0,2mM; Óligo FW - 0,5μM; Óligo RV - 0,5μM; Taq DNA Polymerase - 1,25U; DNA - 100ng; H₂O qsp. 20μL) submetido a 35 termociclagens com a temperatura de desnaturação 95°C, anelamento 72°C e extensão 60°C.

Para confirmação da transfecção, o produto de PCR foi resolvido em gel de agarose em condições já especificadas na seção 4.1.1. As bandas foram visualizadas no sistema de transiluminação UV e o perfil foi registrado fotograficamente (KODAK Gel Imaging System).

4.3.2 - Purificação da Proteína Recombinante A2

A produção da proteína recombinante foi realizada via fermentação em Biorreator (Biostat B Plus® - Sartorius). O inóculo de *E. coli* transformado com o plasmídeo pET9a24a-A2HIS foi submetido ao processo fermentativo, sob as condições previamente padronizadas e protocoladas pelo Dr. Leonardo Damasceno, até a utilização completa do suprimento de glicose (Glicose - 55% p/v; FeSO₄.7H₂O - 0,02% p/v; MgSO₄.7H₂O - 2,1% p/v; Citrato de Sódio.2H₂O - 0,52%; MnCl₂.4H₂O - 0,1M; Carbonato de Amônio - 0,6% p/v; Hexametáfosfato de sódio - 0,6% p/v; H₂O qsp. 250mL).

Para a extração da proteína recombinante da cultura bacteriana, as células foram centrifugadas durante 15 minutos a 1.000g/4°C e submetidas a etapas de lavagem com 9mL/g de Pellet de Tampão de Lavagem (Fosfato de sódio - 100mM, pH 7,2; NaCl - 0,5M; β-Mercaptoetanol - 1mM e Triton X-100 - 0,5% (v/v)). Após incubação à temperatura ambiente

durante 10 minutos, a suspensão foi novamente centrifugada a 12.000g/4°C durante 20 minutos e o sobrenadante foi removido. O pellet formado foi ressuspenso em 9mL/g_{de Pellet} de Tampão de Solubilização de corpos de inclusão (Fosfato de Sódio - 20mM, pH 7,5; NaCl - 0,5M; Imidazol - 10mM; Uréia - 8M; β-Mercaptoetanol - 1mM). O conteúdo foi então submetido à lise mecânica no homogeneizador EmulsiFlex®-C3 através de 3 passagens da cultura sob pressão de 15.000 a 20.000 psi. Após essa etapa o produto lisado foi incubado à temperatura ambiente, durante 10h para solubilização completa dos corpos de inclusão. A suspensão foi então centrifugada a 20.000g/4°C durante 30 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi recolhido para purificação em coluna de Níquel-Sefarose - HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences).

A coluna foi lavada com 10 vezes o seu volume total (5mL) de H₂Odd e equilibrada com 5 volumes de Tampão de Ligação (Fosfato de Sódio - 20mM, pH 7,5; NaCl - 0,5M; Imidazol - 10mM; Uréia - 8M). A amostra foi, então, aplicada com um fluxo de 5mL/min utilizando-se o sistema ÄKTA™ (GE Healthcare Life Sciences). A proteína retida na coluna foi eluída a 5mL/min com 5 volumes de Tampão de Eluição (Fosfato de Sódio - 20mM, pH 7,5; NaCl - 0,5M; Imidazol - 500mM) e coletada em Tubo Falcon de 50mL.

A amostra eluída da coluna HisTrap™ foi, então, submetida à nova etapa de purificação em coluna de troca aniônica HiTrap™ Sepharose™ HP Ion Exchange (GE Healthcare Life Sciences). A exemplo do procedimento anterior, a coluna foi também lavada e equilibrada com Tampão de Corrida (Tris-HCl - 50mM, pH 8; Uréia - 4M). Em seguida, a amostra foi aplicada com o fluxo de 1mL/min e essa fração foi imediatamente coletada em tubo falcon. Para as etapas de concentração e diálise da proteína, a fração coletada da última purificação foi submetida ao processo de ultrafiltração com o dispositivo Amicon® Ultra-15 (Milipore), conforme especificações do fabricante.

A preparação final da proteína teve sua concentração estimada através da reação de Bradford (Bio-Rad) e a confirmação foi feita através da resolução em gel SDS-Poliacrilamida - 12% (SDS-PAGE)

4.3.3 - Western Blotting

Para a confirmação da expressão constitutiva da proteína, 5x10⁷ parasitas foram centrifugados a 3.000RPM/10' e ressuspenso em PBS 1X. Após nova centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e os parasitas ressuspendidos em 150µL de Tampão de Amostra (Tris-HCl - 250mM; SDS - 10% p/v; Glicerol - 30% v/v; Azul de bromofenol - 0,02% p/v; β-mercaptoetanol 50µL/mL; H₂O qsp. 1mL) e submetidos a desnaturação em banho seco a 100°C durante 10'. 30µL das amostras foram resolvidos em gel SDS-Poliacrilamida - 12% (SDS-PAGE) aplicando-se uma voltagem de 80V para empilhamento das amostras e 120V para resolução. Após o final do procedimento, o perfil eletroforético foi transferido em banho de gelo para uma membrana de nitrocelulose em Tampão de Transferência (Tris Base - 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20%), aplicando-se 300mA de corrente durante 2 horas. A membrana pós-transferência, foi incubada em Tampão de Bloqueio (Leite em pó - 5%; Tween 20 - 0,01%) durante 2 horas e após 3 etapas de lavagem com PBS Tween 0,05% por 5', foi incubada com anticorpo monoclonal anti-A2 diluído 1:2000 em Tampão de Bloqueio durante 2 horas. Após mais 3 etapas de lavagem, a exemplo das anteriores, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo acoplado à peroxidase humana (HRP) em diluição 1:2000, durante 1 hora. Após 3 etapas de lavagem com PBS Tween 0,05% e outras 3 com PBS apenas, a membrana foi envolvida em material plástico, onde se aplicou solução reveladora Enhanced Chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare®), deixando-se agir por 5 minutos na ausência de luz. Após exposição de 10' ao filme fotográfico, ainda na ausência de luz, esse foi revelado em Solução Reveladora conforme instruções do fabricante.

4.3.4 - Imunofluorescência

Para confirmar a expressão citoplasmática da proteína CL-14 A2 , 1×10^7 parasitas foram centrifugados por 10' a 3.000RPM. Após 2 lavagens com PBS 1X, foram ressuspendidos em 200µL de Solução de Fixação (PBS + 2% de Paraformaldeído) e mantidos em banho de gelo durante 20 minutos. Após nova centrifugação, foram lavados mais 2 vezes com PBS 1X e ressuspendidos, após a última etapa, em 500µL de PBS 1X. 10µL foram aplicados em cada *spot* de uma lâmina de poli-L-lisina e incubados overnight à temperatura ambiente para aderência das células na lâmina. No segundo dia, as células foram reidratadas com duas etapas de incubação em 30µL de PBS durante 15 minutos. Após a reidratação, as células foram permeabilizadas com PBS + Triton X-100 - 0,2%, durante 15 minutos. Mais 3 etapas de lavagem foram realizadas e a lâmina foi, então, bloqueada com PBS + 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Difco®) inativado durante 1 hora. Os anticorpos, monoclonal anti-A2, ou anti-

cauda de Histidina (conforme Figura 11), foram utilizados como primários em diluição 1:500 e incubados durante 1 hora. Após outras 5 etapas de lavagem com Solução de Bloqueio, a lâmina foi incubada com o anticorpo Alexa Fluor® 488 anti-mouse IgG total (BD Pharmigen®), durante 1 hora. Mais 5 etapas de lavagem foram realizadas e adicionou-se o reagente Vectashield™ contendo DAPI a cada *spot*, cobrindo-se posteriormente a lâmina com uma lamínula e vedando o sistema. As lâminas foram analisadas em microscópio LSM Zeiss com laser de 358nm para o núcleo corado por DAPI e 488nm para detecção da proteína A2 e da imagem transmitida (DIC).

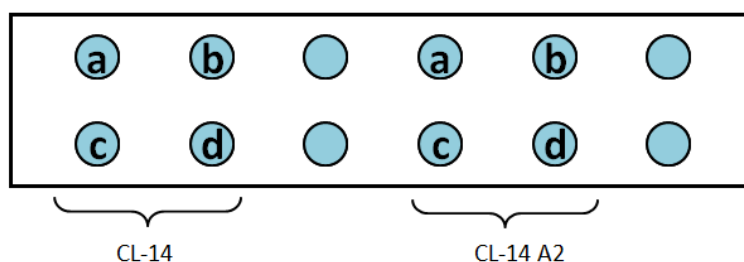


Figura 11. Representação esquemática da lâmina de Imunofluorescência. A - Controle negativo, células incubadas sem anticorpo; B - Controle de ligação inespecífica, células incubadas apenas com anticorpo secundário (Alexa Fluor® 488); C - Anticorpo primário, anti cauda de histidina e secundário Alexa Fluor® 488; D - Anticorpo primário, monoclonal anti-A2 e secundário Alexa Fluor® 488.

4.4 - Avaliação da resposta imune induzida pela cepa CL-14 expressando A2

A experimentação animal desse projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais pelo número de protocolo nº 73/2009 (anexo 1). Os animais selvagens BALB/c foram adquiridos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG e transportados para o biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG, o qual é credenciado para o nível de biossegurança NB-2. Os animais foram acondicionados em micro-isoladores, com ocupação máxima de 5 animais, maravalha, ração e água autoclavadas e manuseados de acordo com o manual de ética em experimentação animal da instituição.

4.4.1 - Imunização

Fêmeas da linhagem BALB/c (n = 10), com 6-8 semanas de vida, foram separadas em 5 grupos de 10 animais. Os grupos 1 (100µL de PBS1X estéril), 2 (Proteína A2 recombinante - 10µg, Alumen - 30% v/v, CpG (Óligonucleotídeo 6) - 18µg) e 3 (Proteína A2 recombinante - 10µg, MPLA (Biomanguinhos) - 1µg) foram inoculados por via subcutânea, na região dorso-posterior. Os grupos 4 (1×10^7 tripomastigotas metacíclicas em fase estacionária da cepa CL-14) e 5 (1×10^7 tripomastigotas metacíclicas em fase estacionária da cepa CL-14 A2) foram inoculados por via intraperitoneal. Após 30 dias, todos os animais receberam nova dose homóloga pela mesma via.

4.4.2 - Resposta Humoral - ELISA de anticorpos

Ao 15º dia após a primeira dose, 4 animais de cada grupo foram sangrados pelo plexo orbital e o sangue foi centrifugado a 5.000RPM durante 10 minutos para extração do soro. Para cada grupo foi feito um *pool* com as amostras de soro, que foi utilizado para o ELISA de anticorpos IgG em quadruplicata. Placas de 96 poços (Nunc®) foram sensibilizadas com a proteína A2 recombinante (10µg/mL), diluindo-se a proteína em Tampão Carbonato (0,1M; pH 9,6) e incubando-se a 4°C, overnight. Após a sensibilização, as placas foram lavadas uma vez com PBS + Tween 20 - 0,05% e uma vez com PBS puro. As placas foram então incubadas com Tampão de Bloqueio (PBS 1X + 3% de Leite em Pó) durante 2 horas a 37°C e submetidas a nova etapa de lavagem, semelhante à anterior. As amostras de soro foram diluídas em Tampão de Bloqueio (1:50) e aplicadas na placa, que foi novamente incubada a 37°C durante 1 hora. As etapas de lavagem foram, então, repetidas três vezes e os anticorpos secundários anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a (BD Pharmigen®) marcados com peroxidase humana (HRP) foram aplicados nos wells correspondentes, diluídos à 1:2000 em Tampão de Bloqueio. Após a incubação durante 1 hora, repetiram-se 6 vezes as etapas de lavagem e adicionou-se a Solução de Substrato ao sistema (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma®) + H₂O₂ (Farmax®) diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,0) (. A reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 1:20 e a leitura da absorbância no comprimento de onda de 450nm foi lida em espectrofotômetro de microplacas. 15 dias após a segunda dose, o mesmo procedimento foi feito para comparação dos valores.

4.4.3 - Resposta Celular - ELISPOT

No dia anterior ao processamento de esplenócitos, placas de cultivo celular MAHAS45 (Milipore) foram sensibilizadas overnight a 4°C, com solução de anticorpo de captura anti-IFN- γ a 5 μ g/mL em PBS1X. No dia seguinte, as placas foram cuidadosamente lavadas 3 vezes com PBS estéril e incubadas com meio RPMI (suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino) a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As placas ficaram em incubação até o momento do plaqueamento (aproximadamente, 2 horas), quando foi feita novamente uma etapa de lavagem, antes da adição da cultura celular.

Ao 21º dia após a segunda dose, 4 animais de cada grupo foram sacrificados, tiveram o seu baço removido e imediatamente transferido para meio de cultura RPMI suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) em banho de gelo. Os órgãos foram, então, macerados com lâminas de vidro foscas e o conteúdo foi centrifugado a 1.200RPM/10'/4°C. Após o descarte do sobrenadante, o material macerado foi ressuscitado em Tampão de Lise de Eritrócitos (NH₄Cl - 0,15M; KHCO₃ - 0,1M; Na₂EDTA - 0,1M) e incubado em gelo durante 5 minutos. 3mL de meio RPMI + 5% de SFB foram adicionados para neutralizar a lise e o conteúdo foi, então, centrifugado a 1.200RPM durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet de esplenócitos ressuscitado em 3mL de meio completo. Após remoção dos sedimentos, nova etapa de centrifugação foi realizada e o novo pellet ressuscitado em 1mL de meio de plaqueamento (RPMI; SFB - 10%; IL-2 (BD-Bioscience®) - 0,2%). As células em cultura foram diluídas 1:100 em azul de tripan e quantificadas no contador automático Countess® (Life Technologies - Invitrogen). A concentração de células foi ajustada com a adição de meio de plaqueamento e 10⁶ células foram aplicadas por poço.

Dentre os estímulos selecionados para a proliferação dos esplenócitos estão: a proteína recombinante A2; a Concanavalina A, utilizada como controle positivo da proliferação de esplenócitos; o meio RPMI, utilizado como controle negativo; os peptídeos CD-8, CD4-1 e CD4-2, obtidos sinteticamente com base em estudos de predição previamente realizados (RESENDE et al., 2008). As sequências de aminoácidos e localização dos peptídeos estão relacionados na Tabela 2 e na Figura 12.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Localização
CD8	VGPQSVGPL-OH	aa 34 -
CD4-1	PHKAAVDVGPLSVGPQS-OH	aa 28 - 44
CD4-2	SASAEPHKAAVDVGPLS-OH	aa 23 - 39

Tabela 2. Sequência e localização dos peptídeos da proteína A2.

Adaptado de RESENDE et al., 2008

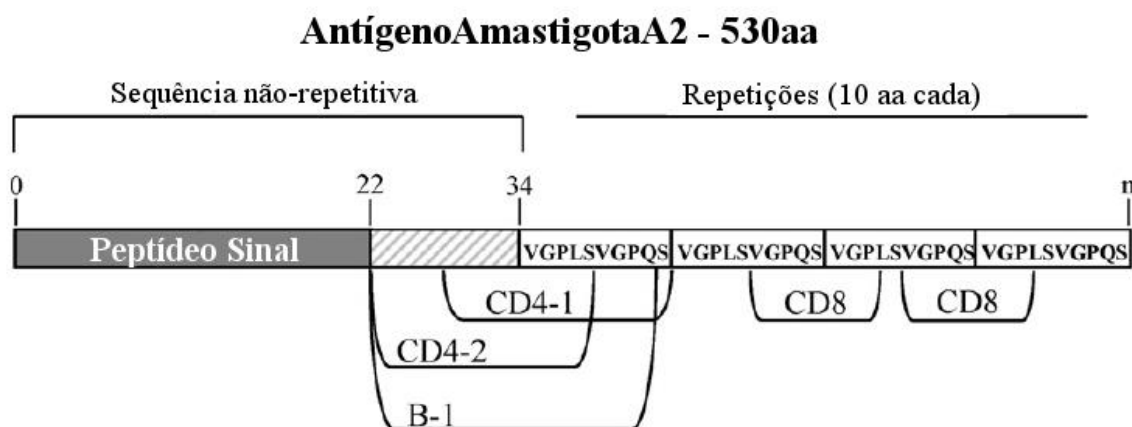


Figura 12. Representação esquemática da localização dos peptídeos na proteína A2. A quantidade de repetições de aminoácidos varia dentre os genes da família A2 entre 40 e 90 vezes. No gene sintético desse estudo, apenas 10 repetições foram incluídas.

Adaptado de RESENDE et al., 2008

Os estímulos, após diluídos em meio de plaqueamento, foram aplicados aos poços correspondentes sobre o meio de plaqueamento previamente adicionado, ficando portanto, diluídos às seguintes concentrações finais: Proteína A2 Recombinante - 10µg/mL; Concanavalina A - 5µg/mL; Peptídeos CD8, CD4-1 e CD4-2 - 10µM. As placas foram então incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, por um período de 18 horas.

Após o período de incubação, o conteúdo das placas foi descartado e as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS + Tween 20 - 0,05% e 3 vezes apenas com PBS. As placas foram, então, incubadas por 2h com anticorpo biotilado anti-IFN-γ e submetidas novamente a 4 lavagens. O conjugado streptoavidina-peroxidase, diluído 1:2000 em PBS1X, foi adicionado aos poços e, após 1h de incubação à temperatura ambiente, protegida da luz, as placas foram submetidas a novas etapas de lavagem e reveladas com Solução Reveladora (Tris-HCl -

1M(pH 7,5); 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) - 10mg; H₂O₂ - 30μL; H₂O - q.s.p. 10mL). A reação cromogênica foi interrompida com água corrente em abundância e a quantificação dos spots foi realizada em leitor de ELISPOT ImmunoSpot (CTL).

4.4.4 - Resposta Celular - ELISA de citocinas

A partir das mesmas culturas oriundas do processamento realizado para o ELISPOT, foram retiradas 10⁶ células e cultivadas com os estímulos anteriormente citados em placas de cultivo celular de poliestireno com 96 wells. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ - 5% a 37°C durante 72h e, após esse período, foram centrifugadas a 1.200RPM por 10 minutos. O sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para nova placa de cultivo celular, de onde se extraíu as amostras para o ELISA de citocinas.

Para realização do ELISA Sanduíche de citocinas, foram utilizados reagentes e especificações dos kits R&D Systems DuoSet® ELISA Mouse IFN-γ e BD OptEIA™ Set Mouse IL-10. As leituras de absorvância no comprimento de onda de 450nm foram feitas em espectrofotômetro de microplacas.

4.5 - Avaliação da proteção conferida pela cepa CL-14 expressando A2 contra infecção por *Leishmania infantum*

Os 6 camundongos restantes após o sacrifício e coleta do baço foram utilizados para o estudo da proteção conferida pelas formulações vacinais, de maneira que o início desse estudo ocorreu simultaneamente ao final da avaliação da resposta imune conferida pelas formulações.

4.5.1 - Desafio

Ao 21^o dia após a segunda dose vacinal, 6 animais de cada grupo foram desafiados pela via subcutânea, pelo dorso da pata direita, com 1x10⁷ promastigotas de *Leishmania L. Infantum* cepa BH400 em fase estacionária. A avaliação da carga parasitária foi feita no baço e fígado, 30 dias após o desafio, através do ensaio de diluição limitante.

4.5.2 - Carga Parasitária - Ensaio de Diluição Limitante

Após o desafio (30 dias), todos os animais foram sacrificados e tiveram o baço e fígado removidos em ambiente estéril e imediatamente transferidos para recipientes com a massa previamente estabelecida. Para cada mg de tecido, adicionou-se 10µL de meio Schneider completo (SFB inativado - 20%; Penicilina - 200U/mL; Estreptomicina - 100µg/mL). Os órgãos foram então macerados em seus respectivos volumes de meio, com lâminas de vidro foscas, e homogeneizados até formar uma suspensão de células. 10uL de cada suspensão foram diluídos 10 vezes em meio Schneider completo e assim seriadamente, até completar as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . As placas de 96 poços foram, então revestidas com filme plástico de PVC e incubadas em estufa B.O.D. a 24°C durante 7 dias. Após o período de incubação, as placas foram lidas em microscópio óptico e o título de cada órgão foi determinado pela última diluição positiva para a presença de parasitas viáveis.

4.6 - Plotagem de dados e estatística

Todos os gráficos foram gerados através do software GraphPad Prism 5, bem como todas as análises estatísticas dos dados, utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5 - RESULTADOS

5.1 - Construção do vetor pROCKNeoA2 para expressão da proteína A2 recombinante

A partir da digestão do plasmídeo pET9a24a-A2, confirmou-se a liberação do fragmento A2, de 729pb, flanqueado pelos sítios de restrição *Xba*I e *Xho*I (Figura 13A). A liberação do fragmento pROCKNeo de 7.331pb, também flanqueado pelas extremidades coesivas *Xba*I e *Xho*I, foi confirmada, conforme apresentado na Figura 13B.

As células transformadas, quando submetidas à PCR com os oligonucleotídeos iniciadores HX1FW e A2RV revelaram a presença do fragmento de 963pb correspondente ao gene sintético A2 (Figura 13C) e parte da região TcP2 β (Ver materiais e métodos, item 4.2). Assim também, a digestão com as enzimas *Xba*I e *Xho*I confirmaram a presença do inserto A2 (729 no plasmídeo extraído das células transformadas (Figura 13D) .

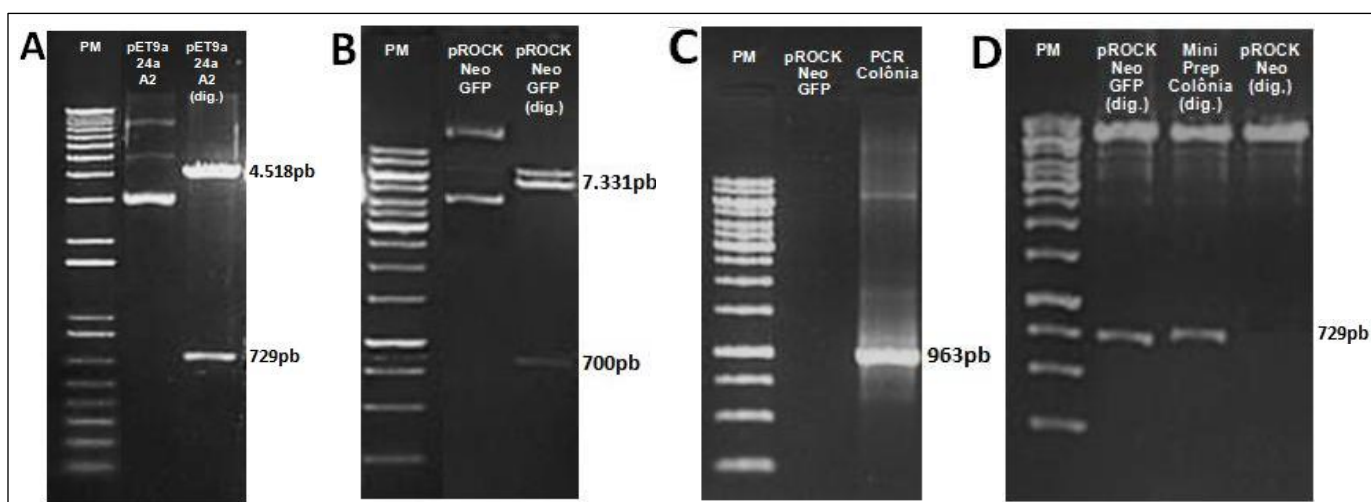


Figura 13. Construção do vetor pROCKNeoA2. O plasmídeo pET9a24a contendo o fragmento A2 (729pb) foi duplamente digerido para gerar o inserto A2 com as extremidades coesivas *Xba*I e *Xho*I(A); simultaneamente o plasmídeo pROCKNeoGFP foi digerido com as mesmas enzimas de restrição gerando o fragmento pROCKNeo de 7.331pb e o fragmento GFP de 700pb (B). Após etapas de purificação, a ligação das extremidades coesivas com T4 Ligase foi feita a 4°C e a cultura quimiocompetente de *E. Coli* XL1 Blue foi transformada com o produto. As colônias resistentes à Ampicilina foram testadas através de PCR (C) e digestão dupla com as enzimas *Xba*I e *Xho*I (D), confirmando através do aparecimento do mesmo fragmento de 729pb, que a clonagem foi bem sucedida.

5.2 - Confirmação da transfecção da cepa CL-14 com a construção pROCKNeoA2 e análise da expressão da proteína A2

A linearização completa do cassete de expressão, conforme descrito no item 4.2 de Materiais e Métodos, pode ser confirmada pela presença da banda única de tamanho 8.400pb (Figura 14A).

A Figura 14B mostra a amplificação do fragmento do gene A2 no DNA genômico de parasitas transfectados, confirmando a transfecção bem sucedida. A expressão da proteína A2 foi confirmada pela análise do Western Blot com anticorpo anti-A2, onde se observa a presença da banda de tamanho 24kDa, compatível com o valor esperado pela análise da sequência de aminoácidos (Figura 14C). Posteriormente, a confirmação da expressão foi conduzida por meio de ensaio de imunofluorescência, que evidenciou a proteína localizada no citoplasma do parasita (Figura 14D).

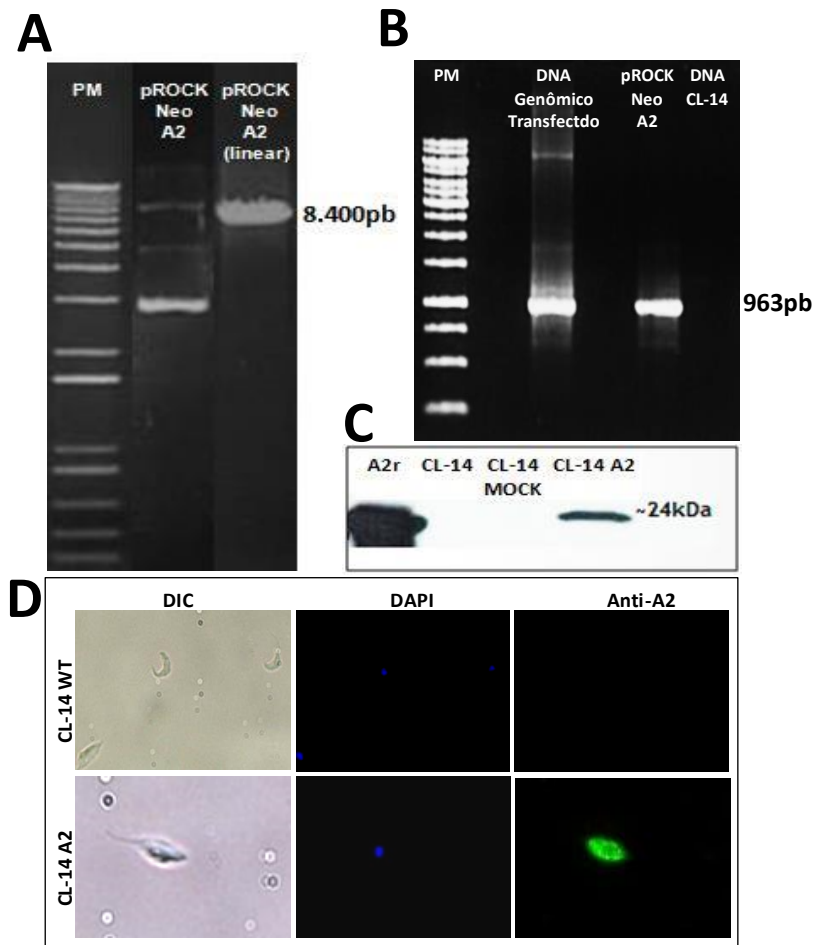


Figura 14. Confirmação da transfecção da cepa CL-14 e expressão da proteína A2. A transfecção bem sucedida foi confirmada a partir da PCR convencional de 100ng de DNA genômico extraídos a partir de 1×10^7 epimastigotas em fase exponencial (B). A expressão foi confirmada por Western Blot com anticorpo monoclonal anti-A2. Como controle positivo, utilizou-se 2 μ g de proteína A2 recombinante purificada (C). A expressão ainda foi confirmada através do ensaio de imunofluorescência, onde o anticorpo anti-IgG total de camundongo marcado com Alexa 488, ligou-se ao anticorpo anti-A2 associado à proteína A2 dentro do citoplasma do parasita.

5.3 - Resposta humoral induzida pela imunização com CL-14 A2

Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 15A e 15B correspondem à análise da produção de anticorpos anti-A2 nos animais vacinados. Observa-se que embora a produção de anticorpos anti-A2, após a primeira dose tenha sido evidente nos grupos vacinados com proteína A2 recombinante (Alúmen + CpG + A2r e MPLA + A2r), não houve

produção significativa nos grupos CL-14 e CL-14 A2 (Figura 15A). A mesma situação pode ser observada após a segunda dose, onde houve redução não significativa dos níveis de anticorpos nos grupos controle e um ligeiro aumento nos grupos CL-14 e CL-14 A2. Curiosamente, os níveis produzidos no grupo CL-14 A2 foram menores, embora sem significância estatística, quando comparado ao grupo CL-14 (Figura 15B).

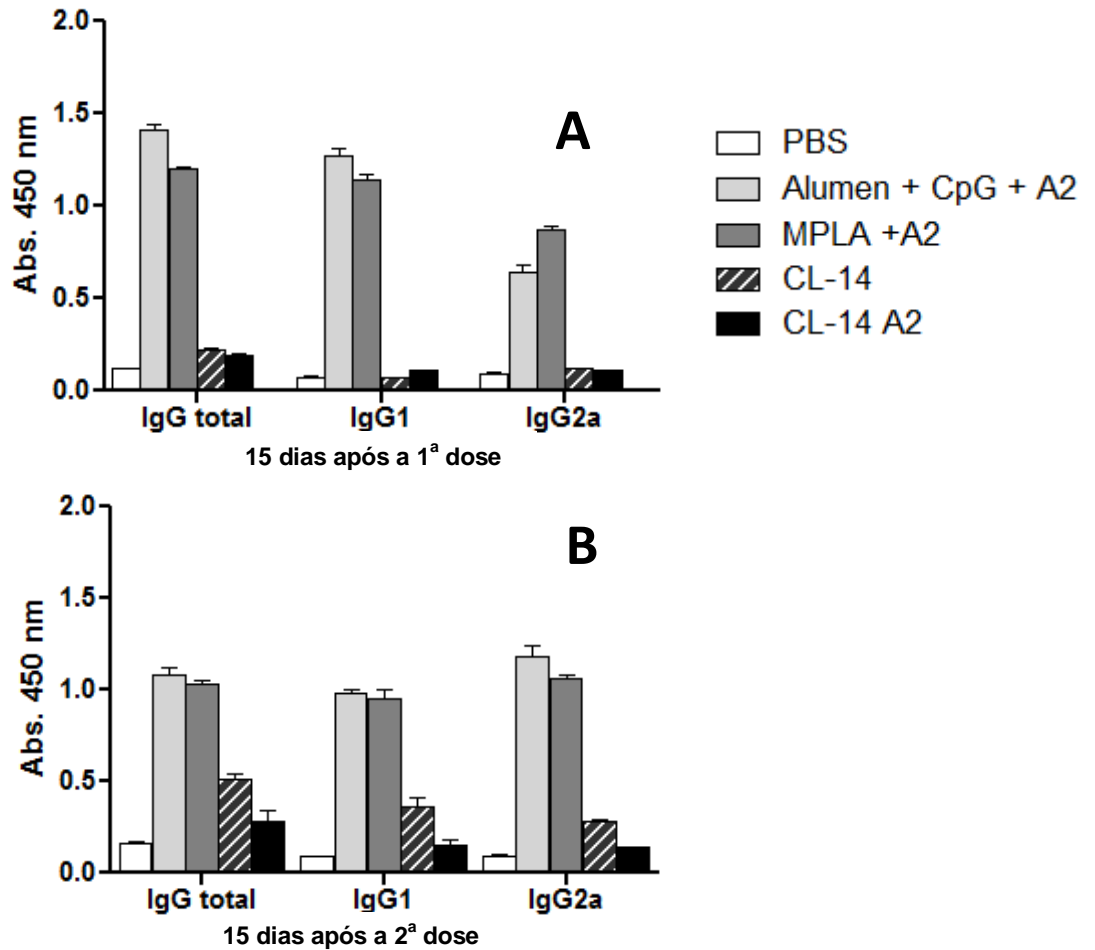


Figura 15. Resposta humoral após primeira e segunda dose induzida pela imunização com CL-14 A2.

Quinze dias após a primeira dose (Figura 15A) e quinze dias após a segunda (Figura 15B), o sangue de quatro animais de cada grupo foi coletado e o soro extraído para avaliação da produção de anticorpos específicos contra a proteína recombinante A2 através de ELISA. Além dos níveis de IgGtotal, os isotipos IgG2a e IgG1 foram avaliados como marcadores do tipo de resposta celular, Th1 ou Th2 respectivamente. As placas foram sensibilizadas com proteína A2 recombinante na concentração de 10µg/mL. n = 4 animais

5.4 - Avaliação da produção de IFN- γ via ELISPOT

Através da contagem de *spots*, observa-se uma quantidade elevada de esplenócitos produtores de IFN- γ , após re-estimulação com A2r, ou peptídeos derivados da proteína, tanto nos grupos imunizados com a proteína A2 recombinante, quanto nos que receberam o organismo transgênico CL-14 A2. Embora as células estimuladas com A2r, tenham gerado uma leitura além do esperado para o grupo CL-14, a maior parte dos peptídeos estimulou a produção de IFN- γ apenas em animais que receberam a proteína A2, seja na forma recombinante, ou expressa pela cepa CL-14 modificada (Figura 16). Além disso, conforme a análise estatística detalhada na Figura 17, o grupo imunizado com CL-14 A2, mostrou maior produção de IFN- γ com todos os estímulos, quando comparado aos organismos controle.

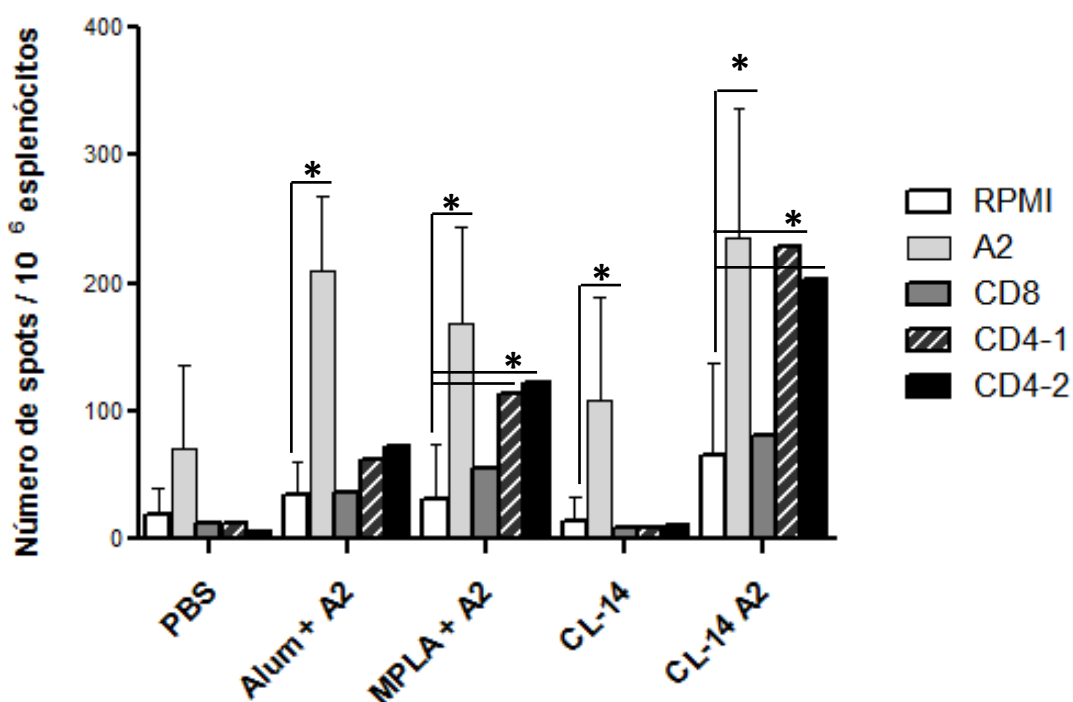


Figura 16. Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos imunizados, quando submetidos a diferentes estímulos (ELISPOT). Vinte e um dias após a segunda dose, o baço de quatro camundongos inoculados foi extraído e processado em meio de cultivo celular RPMI. Após tratamento, 10^6 células foram aplicadas em cada poço de uma placa de ELISPOT com 96 wells e submetidas aos diferentes estímulos: RPMI, A2r, peptídeos CD8, CD4-1 e CD4-2. Procedeu-se então com as etapas de incubação, lavagens, detecção e finalmente, revelação. A contagem automatizada de spots foi realizada e a produção de IFN- γ foi analisada graficamente. *, $P < 0,05$, quando comparado com o estímulo por RPMI.

n = 4 animais

Segundo as análises estatísticas detalhadas abaixo, animais infectados com o organismo modificado CL-14 A2 apresentam uma quantidade de esplenócitos produtores de IFN- γ significativamente maior que os grupos inoculados com PBS e CL-14 selvagem, quando submetidos aos estímulos A2r (Figura 17A), CD8 (Figura 17B), CD4-1 (Figura 17C) e CD4-2 (Figura 17D). Na resposta ao estímulo CD4-1, o grupo infectado com CL-14A2 também mostrou possuir quantidade de células produtoras de IFN- γ significativamente maior que o grupo controle Alumen + CpG + A2.

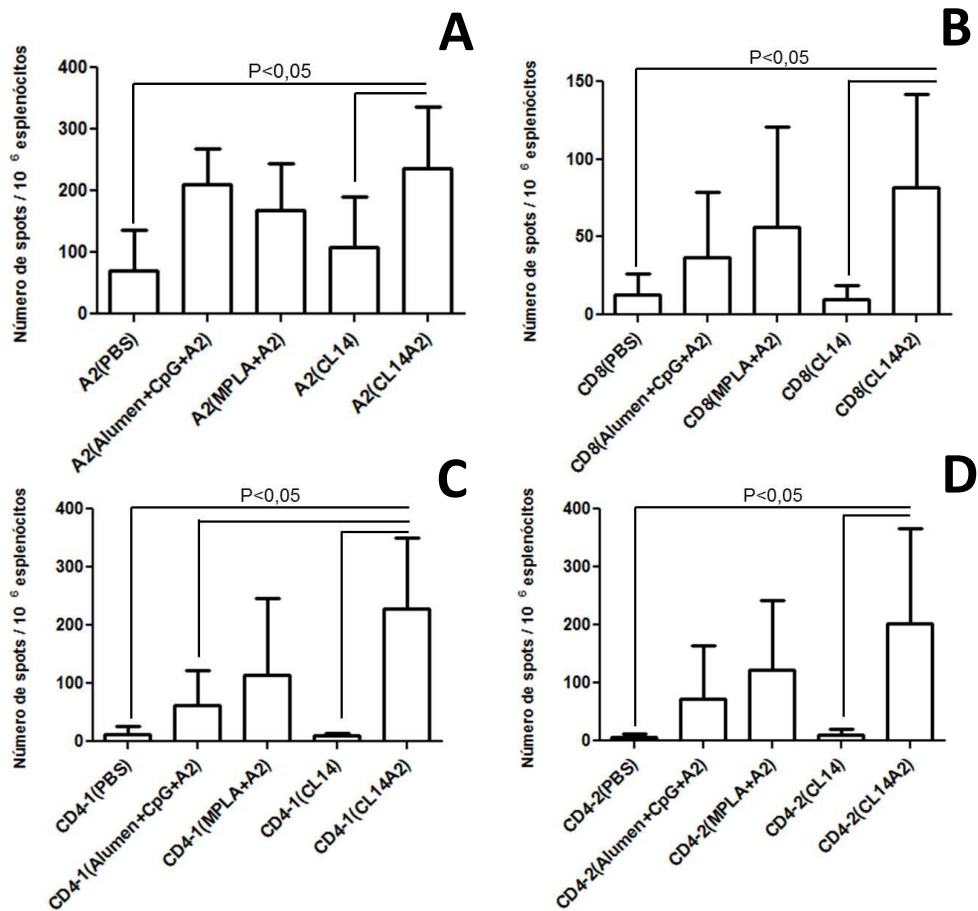


Figura 17. Comparação da produção de IFN- γ por esplenócitos de animais infectados com CL14A2 e demais grupos (ELISPOT). As quantidade de spots do grupo CL-14 A2 foi estatisticamente comparada com a dos demais grupos para todos os estímulos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado com intervalo de confiança de 95%.

n = 4 animais

5.5 - Avaliação da produção de IFN- γ por ELISA de sobrenadante

Os níveis de IFN- γ produzidos pelos esplenócitos de camundongos infectados com CL-14 A2 foram visivelmente superiores aos demais grupos, independente do estímulo fornecido (Figura 18). No entanto, curiosamente o grupo infectado com CL-14 se mostrou capaz de produzir quantidades de IFN- γ além do esperado, quando estimulados por A2r, CD8, CD4-1 e CD4-2. Apesar disso, com exceção das células estimuladas com A2r, onde se observou semelhança nos níveis de produção entre o grupo CL-14 A2 e os controles com proteína recombinante, todos os demais estímulos resultaram em maior produção de IFN- γ pelo grupo CL-14 A2. Os grupos em geral apresentaram maiores níveis de IFN- γ que o grupo inoculado com PBS. Todavia, o grupo infectado com CL-14 teve uma produção semelhante a esse grupo, quando estimulado pela proteína A2r.

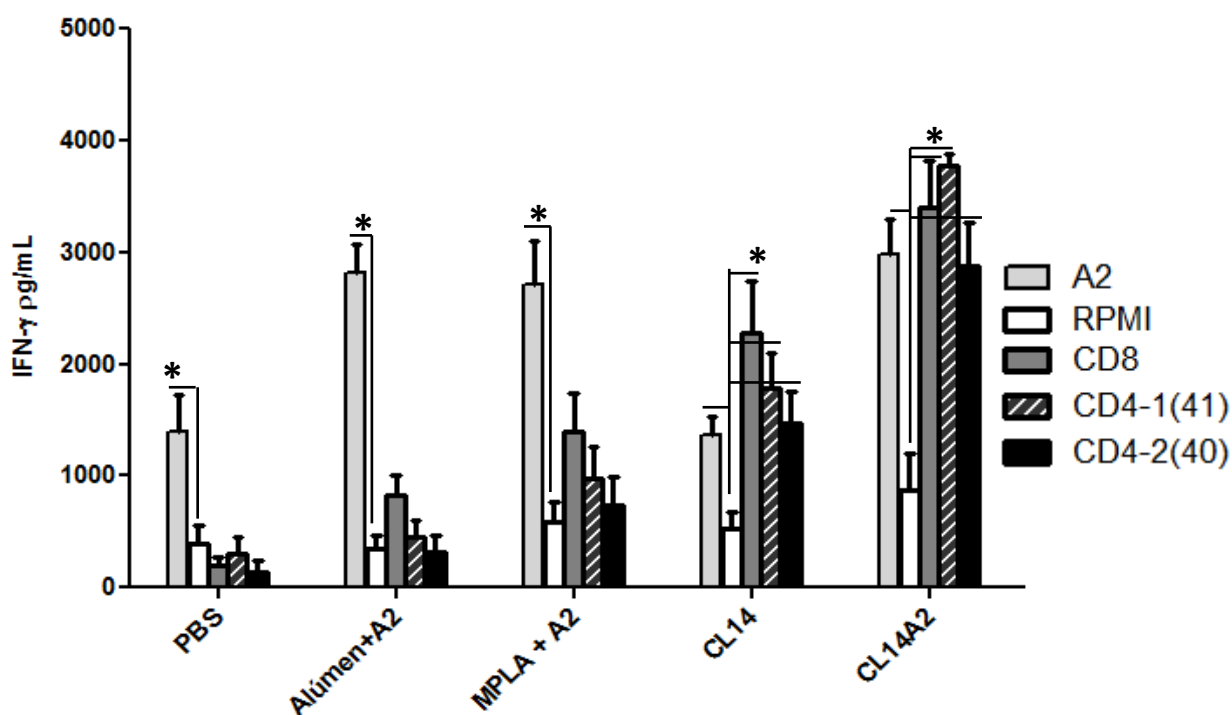


Figura 18. Produção de IFN- γ pelos esplenócitos de camundongos imunizados, quando submetidos a diferentes estímulos (ELISA). Para o preparo do ELISA de sobrenadante, 10^6 esplenócitos foram aplicados em cada poço de uma placa de 96 poços e cultivados sob diferentes estímulos durante 72 horas a 37°C, em 5% de CO₂. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1.200 RPM durante 10 minutos, e o sobrenadante coletado para a dosagem por ELISA. As placas de ELISA foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IFN- γ e após o procedimento completo, foi realizada a leitura das absorbâncias a 450nm. Os valores foram interpolados na curva padrão e utilizados no programa GraphPad Prism para a confecção dos gráficos e análises estatísticas. *, P < 0,05, quando comparado com o estímulo por RPMI. n = 4 animais

Os níveis de IFN- γ produzidos pelas células de animais do grupo CL-14 A2, quando estimuladas por A2r, foram novamente significativamente maiores que no grupo CL-14, que apresentou quantidade semelhante ao grupo PBS. Todavia, não houve diferença significativa entre esse grupo e os controles com proteína recombinante (Figura 19A). Em relação às células estimuladas pelo peptídeo CD8, a produção de IFN- γ foi significativamente maior no grupo CL-14 A2, quando comparada aos demais grupos, com exceção do grupo CL-14 (Figura 19B). Tanto nas células estimuladas pelo peptídeo CD4-1, quanto CD4-2, os níveis de IFN- γ produzidos pelas células dos animais do grupo CL-14 A2, foram significativamente maiores que todos os demais grupos (Figuras 19C e 19D).

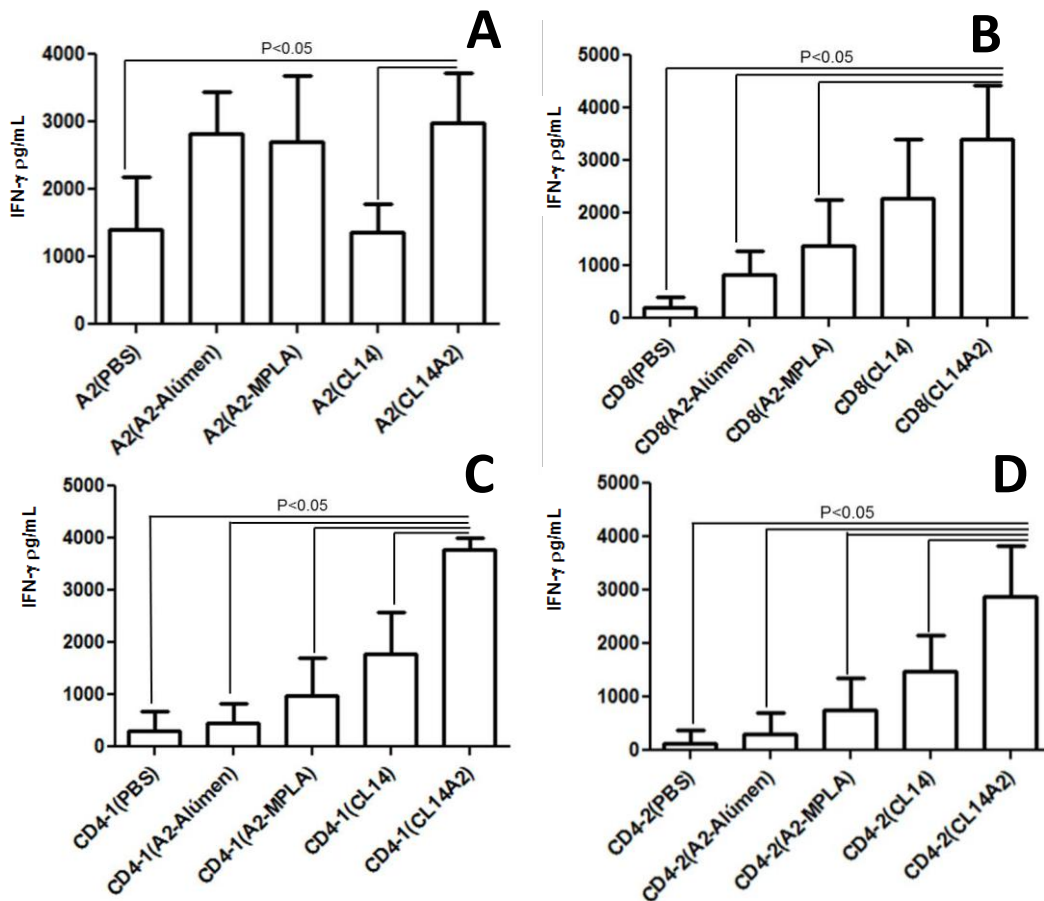


Figura 19. Comparação da produção de IFN- γ pelos esplenócitos de animais infectados por CL-14A2 e demais grupos (ELISA). Os níveis de IFN- γ relativos, produzidos pela quantidade de esplenócitos previamente determinada por ELISPOT, foram medidos conforme especificações do Kit R&D Systems DuoSet® ELISA Mouse IFN- γ . Os valores do grupo CL-14 A2 foram estatisticamente comparados com os dos demais grupos para todos os estímulos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado com intervalo de confiança de 95%. n = 4 animais

5.6 - Resposta protetora contra desafio por *Leishmania L. infantum*

A quantificação de parasitas por diluição limitante no baço e no fígado dos animais vacinados mostrou que os títulos observados nos animais do grupo infectado com CL-14A2 se mostraram menores do que os demais grupos (Figura 20). No entanto, a análise estatística apontou serem significativamente menores somente em relação aos valores apresentados pelos animais do grupo Alumen + CpG + A2r. Os valores observados também não diferiram significativamente entre os dois órgãos.

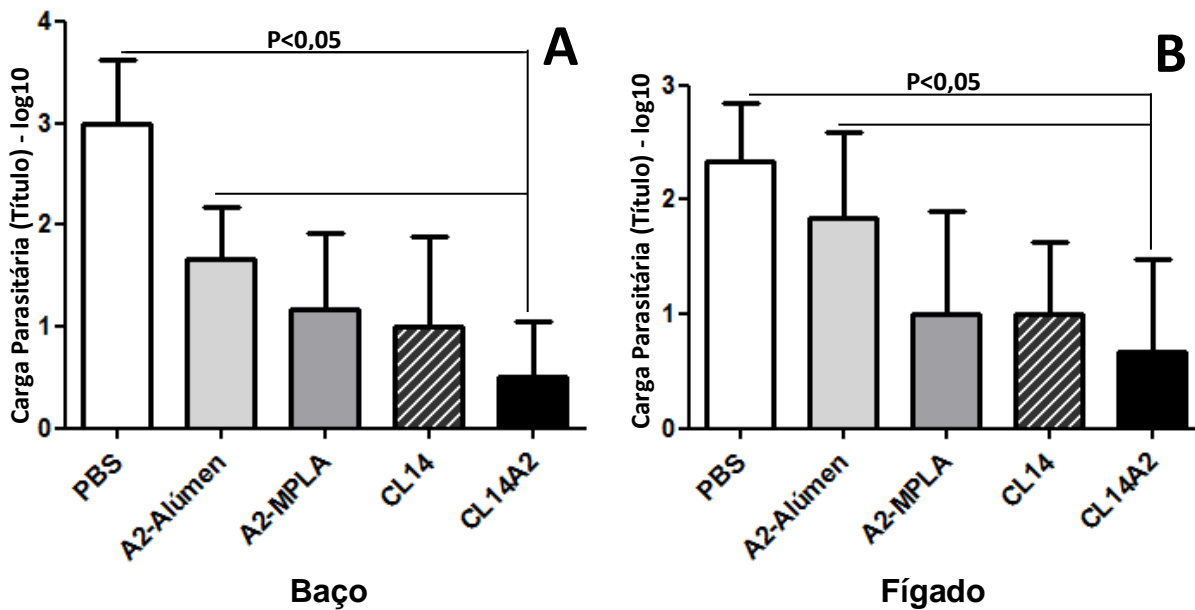


Figura 20. Carga parasitária do baço e fígado de camundongos desafiados com *Leishmania L. infantum*. Trinta dias após o desafio pelo dorso da pata direita com 1×10^7 parasitas em fase estacionária, seis animais de cada grupo foram sacrificados e tiveram fígado e baço coletados. Ambos foram processados e diluídos seriadamente em meio Schneider para realização do ensaio de diluição limitante. O título de cada órgão foi determinado pela última diluição positiva para presença de parasitas da espécie *Leishmania L. infantum* viáveis. Os resultados foram expressos em função da média entre os logaritmos negativos do título para o órgão de cada grupo. Os títulos do grupo CL-14 A2 foram estatisticamente comparados com os dos demais grupos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado com intervalo de confiança de 95%.

n = 6 animais

6 - DISCUSSÃO

Neste estudo, foi empregado um gene sintético para expressão do antígeno A2, tanto em *E. coli*, quanto na cepa CL-14 de *T. cruzi*. Optou-se pelo uso do gene sintético A2 pela dificuldade encontrada na clonagem e expressão do gene original, em contraste com a praticidade do gene sintético. Inicialmente, dispúnhamos de uma versão do gene original de tamanho 1,7kb, inserida no plasmídeo pET-16® (Novagen), entre os sítios *XhoI* e *BamHI*, o que tornou inviável a clonagem direta por ligação de extremidades coesivas, visto que os sítios de clonagem do plasmídeo pROCKNeo são *XbaI* e *XhoI*, nesse sentido. Ainda que a alternativa da ligação semi-direcionada tenha sido utilizada (resultados não mostrados), houve dificuldade no sequenciamento para confirmação da clonagem no vetor pROCKNeo. Isso ocorre, não apenas pela extensão do fragmento, mas principalmente presença das diversas repetições de nucleotídeos, que tornam praticamente impossível a sobreposição das leituras para confirmação da clonagem (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994). Além disso, a estrutura multimérica na região codificante do gene A2 original favorece a ocorrência de recombinações durante as etapas de clonagem e transfecção (ZHANG et al., 1996). Com isso, optou-se pelo uso do gene sintético, cujo tamanho (729pb) e a localização no plasmídeo pET9a24a, favoreciam, não só a clonagem por ligação direta das extremidades coesivas, mas também o sequenciamento. A sequência de nucleotídeos foi modificada, diminuindo a probabilidade de recombinações associadas à estrutura multimérica do gene, porém mantendo a sequência de aminoácidos da proteína, de maneira que a sobreposição de leituras do sequenciamento para confirmação da clonagem foi facilitada.

É importante ressaltar que, conforme explicitado em Materiais e Métodos, o gene sintético preserva toda a sequência de aminoácidos da proteína original, com exceção da porção repetitiva, onde foram reduzidas para 10 as repetições existentes. Em suma, a otimização da sequência do gene A2 original, além de facilitar etapas de clonagem, síntese e purificação da proteína, não excluiu nenhum epítipo importante, entre aqueles definidos por RESENDE et al. (2008), para a imunogenicidade da mesma. Dados obtidos pelo nosso grupo (não publicados) demonstram o reconhecimento da proteína A2 sintética por soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® (Hertape Calier), em testes de imunoblotting, confirmando a imunogenicidade da mesma e a identidade com a proteína original, presente na formulação da vacina.

Embora estudos relatem o sucesso da transfecção de vetores integrativos com expressão estável no *T. cruzi*, sabe-se da possibilidade de que a transfecção ocorra de maneira transiente, com a preservação do plasmídeo na forma episomal, ao invés da integração do cassete ao genoma do parasita (DAROCHA et al., 2004). Não foram feitos procedimentos mais específicos para confirmação da integração do cassete de expressão pROCKNeoA2 ao genoma do parasita CL-14, como Southern Blot. Também não foram realizados experimentos de localização celular precisa da proteína no organismo. Todavia, os experimentos realizados foram satisfatórios para a finalidade do estudo, já que a expressão *in vitro* da proteína pelo parasita foi repetidamente confirmada, através de Imunofluorescência e Western Blot, indicando que a apresentação do antígeno está ocorrendo por ocasião da vacinação.

Curiosamente, não se observou produção elevada de anticorpos específicos anti-A2 nos animais infectados pelo parasita recombinante CL-14 A2. Embora cães e pacientes com LV apresentem anticorpos anti-A2 e já tenha sido identificado e caracterizado um epítipo para células B reconhecido por camundongos BALB/c na proteína A2 (RESENDE et al., 2008), ainda permanece controversa a capacidade desta proteína de induzir uma resposta humoral com produção de anticorpos específicos, especialmente quando A2 é apresentado no contexto de organismos geneticamente modificados que induzem forte resposta imune celular, como por exemplo adenovirus. Dados anteriores obtidos pelos pesquisadores desse grupo indicam que macacos ou camundongos vacinados com adenovirus expressando A2 apresentam baixos títulos de anticorpos. Por outro lado, a imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com a proteína A2 recombinante, utilizando *Propianibacterium acnes* termicamente inativado como adjuvante, foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos específicos anti-A2, associados a uma resposta protetora contra desafio por *Leishmania L. donovani* (GHOSH et al., 2001a). Esses resultados sugeriram a relação da proteção com uma coexistência de respostas Th1 e Th2. Paradoxalmente, a imunização de camundongos BALB/c com a proteína A2 recombinante associada com IL-12, não mostrou produção elevada de anticorpos específicos, mas ainda assim foi capaz de conferir uma resposta protetora contra desafio por *Leishmania L. amazonensis* (COELHO et al., 2003). Da mesma forma, camundongos BALB/c imunizados com adenovirus expressando a proteína A2 não apresentaram elevada produção de anticorpos anti-A2, em contraste com os animais

imunizados com A2r + Alúmen. Todavia, estes também desenvolveram uma resposta protetora contra o desafio por *Leishmania L. infantum* (RESENDE et al., 2008).

Assim, é possível que o fato de ter sido apresentada ao sistema imune no contexto de um organismo geneticamente modificado como o *T. cruzi*, tenha influenciado a baixa produção de anticorpos anti-A2, ainda que em animais imunizados com A2r, com ambos os adjuvantes, tenham sido observados níveis elevados de anticorpos. Aliás, a discrepância dos resultados nos estudos anteriormente citados, sugere que a capacidade de induzir produção de anticorpos estaria relacionada não só à presença de epítomos imunogênicos na proteína, mas à modulação da resposta imune conferida pelo adjuvante. Dessa forma, é provável que no microambiente imunológico proporcionado pelo parasita CL-14 e o potencial de indução de produção de anticorpos pela proteína A2 não tenha sido suficiente para elevar os níveis nos animais imunizados.

Muito ainda se discute sobre os mecanismos imunológicos que levam ao desenvolvimento da leishmaniose, ou ao controle da doença. Além disso, muito se discute sobre o papel de anticorpos no desenvolvimento de uma resposta protetora contra leishmaniose visceral (KUMAR; NYLEN, 2012). Gosh et al. (1995), demonstraram que anticorpos IgG são as principais imunoglobulinas presentes no soro de pacientes com Kala-Azar e Pós-Kala-Azar. Anticorpos de classe IgG1 são conhecidos por estarem associados à altos níveis de fixação de complemento e atividade opsonizante (BURTON et al., 1986). Portanto, o aumento de anticorpos IgG1 pode ser responsável pela diminuição dos níveis da fração C3 do complemento, aumento do dano tecidual e outras reações inflamatórias. Enquanto anticorpos IgG2 fixam em menor escala o complemento e têm pouca atividade opsonizante, ou seja, teriam potencialmente menor contribuição para a susceptibilidade à infecção (GHOSH et al., 1995).

Historicamente, células B e anticorpos não têm sido considerados muito importantes na infecção por *Leishmania* (KUMAR; NYLEN, 2012), embora alguns estudos acumulem evidências de que células B e anticorpos contribuam para o desenvolvimento da leishmaniose (RONET et al., 2008; DEAK et al., 2011). Animais depletados para células B mostraram ser menos susceptíveis à infecção por *Leishmania L. donovani* (SMELT et al., 2000), além de apresentar resposta protetora de células T nos estágios iniciais da infecção, levando a uma diminuição da carga parasitária (BANKOTI et al., 2012). Em contrapartida, embora ainda não tenha sido experimentalmente demonstrado na leishmaniose visceral, a

presença de células B e anticorpos já mostrou ser capaz de facilitar a geração de uma imunidade protetora via células T na leishmaniose cutânea (SCOTT et al., 1986; WOELBING et al., 2006). Além disso, GIDWANI et al. (2011) mostraram a persistência de anticorpos contra *Leishmania* por um longo período, mesmo após a cura e suposta imunidade contra leishmaniose visceral.

O papel da dicotomia Th1/Th2 com a resistência de diversos organismos à leishmaniose visceral ainda permanece não totalmente esclarecido, visto que, embora a polarização para uma resposta Th1 tenha sido relacionada à proteção em diversos modelos, o papel de algumas citocinas Th2 ainda não foi bem definido. IL-10 tem sido correlacionada à desativação dos macrófagos e à susceptibilidade à infecção. A produção de IL-10 na infecção por *Leishmania L. chagasi* em humanos tem sido correlacionada com a manifestação da doença, mas em cães transcritos dessa citocina já foram encontrados tanto em cães assintomáticos (SANTOS-GOMES et al., 2002; CHAMIZO et al., 2005), quanto em cães com sinais clínicos (PINELLI et al., 1999). O estudo da expressão de IL-10 em humanos levou à conclusão de que a ativação de macrófagos mediada por IFN- γ é bloqueada por essa citocina. Esse dado foi corroborado pela demonstração da supressão da resposta específica de células T contra *Leishmania L. donovani* (GHALIB et al., 1993; HOLADAY et al., 1993). Assim também, os altos níveis de IL-10 produzidos por macrófagos ativados do tipo II inibiram as células vizinhas de responderem à ativação por IFN- γ e produzirem espécies reativas de nitrogênio em modelos murinos (MOSSER, 2003). Níveis acentuados de IL-10 são detectados por imunohistoquímica nos baços de camundongos BALB/c durante os estágios iniciais de infecção por *Leishmania L. donovani* (MELBY et al., 2001b). No entanto, em hamsters, a expressão de IFN- γ não foi alterada pela IL-10 até os estágios tardios da infecção, contradizendo o papel de desativação de macrófagos (MELBY et al., 2001a).

Mesmo persistindo às discussões sobre o balanço Th1/Th2 nos diversos modelos de resistência e susceptibilidade, é incontestável a importância de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- γ e IL-12, bem como a manutenção de uma potente resposta celular do tipo Th1 no controle da proliferação parasitária (GHOSH et al., 2001b; WILSON et al., 2005; BARBIERI, 2006). Demonstrou-se, nesse estudo, uma produção de IFN- γ significativamente maior pelos animais do grupo CL-14 A2, em relação aos demais grupos. A resposta aos estímulos com peptídeos CD4-2 e CD8 é compatível com os resultados observados por Resende et al. (2008). No estudo citado, a análise de ELISPOT nos

esplenócitos de camundongos seletivamente depletados, mostrou que os peptídeos CD4-2 e CD8 foram reconhecidos respectivamente por células CD4+ e CD8+ e capazes de estimulá-las.

Na leishmaniose visceral, o desenvolvimento de granulomas para controle do parasita é dependente tanto de células CD4+ quanto CD8+ (WILSON et al., 2005), embora este último grupo ainda não tenha sido bem descrito na leishmaniose visceral humana e suas funções não estejam totalmente esclarecidas, quando comparadas com as células CD4+ (KUMAR; NYLEN, 2012). A fonte principal de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , citocinas importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora, são predominantemente atribuídas aos linfócitos CD4+ (BARBIERI, 2006). Todavia, modelos experimentais de leishmaniose visceral, mostram que as células CD8+ são importantes no controle da *Leishmania L. donovani/Leishmania L. infantum*, tanto pela sua capacidade de produzir IFN- γ , quanto por sua atividade citotóxica (TSAGOZIS et al., 2003, 2005). Os linfócitos T CD8 possuem a capacidade de lisar diretamente as células infectadas por patógenos, além de serem capazes de produzir altos níveis de IFN- γ ativador de macrófagos. Além disso, junto com as células T CD4, os linfócitos T CD8 são necessários para a prevenção da reincidência da leishmaniose visceral em camundongos, provavelmente por mecanismos distintos (MURRAY, 2005b).

Curiosamente, o grupo CL-14 mostrou produção de altos níveis de IFN- γ em resposta a vários estímulos teoricamente específicos, principalmente ao peptídeo CD8 derivado da proteína A2. Não é de todo inesperado que essa produção ocorra, dado o enorme repertório antigênico apresentado pelo parasita CL-14 e a quantidade de genes compartilhados entre as espécies de tripanosomatídeos (EL-SAYED et al., 2005), o que torna muito provável a ocorrência de resposta cruzada com os estímulos utilizados. De fato, ao utilizar a ferramenta de alinhamento (BLAST® - blastp) para averiguar a ocorrência de homologia entre o peptídeo CD8 e a cepa CL Brener de *T. cruzi*, foram encontradas proteínas hipotéticas com 100% de homologia de até 6 aminoácidos em sequência. Considerando o tamanho desse peptídeo (9 aminoácidos), é de se esperar que esplenócitos de camundongos infectados com CL-14 respondam positivamente ao estímulo com o peptídeo CD8, bem como a outros. Inclusive, a predição bioinformática (BIMAS - HLA Peptide Binding Predictions) de epítopos CD8 para o haplótipo Dd (BALB/c), utilizando a sequência do transportador ABCA1 de *T. cruzi*, destacou o peptídeo VGPDTV GAL, com o mesmo *score* de afinidade encontrado no peptídeo CD8 da

proteína A2. Esses peptídeos, guardam 67% de identidade, compartilhando 6 aminoácidos entre si.

A proteína recombinante A2 estimulou produção de IFN- γ em todos os grupos, incluindo o grupo que recebeu PBS. Esse fato pode ser atribuído à recorrente contaminação com Lipopolissacarídeo (LPS) e outras proteínas bacterianas no processo de purificação de proteínas recombinantes. Por se tratarem de proteínas que estão em constante contato com os animais do estudo, é de se esperar que o estímulo contaminado com essas proteínas promova a proliferação de esplenócitos nesses organismos e consequentemente o aumento da produção de IFN- γ .

Nesse estudo foi testada pela primeira vez a formulação da proteína A2 utilizando o Lipídio Monofosforil A (MPLA) como adjuvante. O MPLA é uma forma atóxica (quimicamente modificada) da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota*, cujas propriedades imunomodulatórias foram mantidas (WANG, 2011). Semelhantemente ao LPS, o MPLA possui ação sob receptores toll-like 4 (TLR4), induzindo a migração de células dendríticas (DC's) da periferia até os órgãos linfóides e promovendo sua maturação em células que expressam altos níveis de MHC classe II e moléculas có-estimulatórias. Muitos estudos associaram o uso de MPLA com a potencialização de uma resposta Th1 ou uma resposta mista Th1/Th2, variando de acordo com o antígeno utilizado. Hoje, sabe-se que o MPLA oferece uma combinação de eficácia e baixa toxicidade, que pode servir de modelo para o desenvolvimento futuro de outros adjuvantes (CASELLA; MITCHELL, 2009).

Outra formulação utilizada, contou com o diferencial de associar a proteína A2 com Alumen e o oligodesoxinucleotídeo CpG. Estudos já mostraram que adjuvantes a base de alumínio direcionam a diferenciação de células T CD4 para o perfil Th2 e evitam a diferenciação para o perfil Th1 (HOGENESCH, 2012). Porém, já foi mostrado que o uso de CpG associado com esses adjuvantes, modificam a resposta de Th2 para o perfil Th1 (ELIAS et al., 2005; FOGG et al., 2007). A imunomodulação dos oligonucleotídeos ocorre via ativação de TLR9, que induzem diretamente a ativação e maturação de células dendríticas, além de aumentar a diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos. Todas as classes de CpG induzem potentes respostas Th1 para diversos antígenos (WANG, 2011). Esses dados apresentados, justificam a escolha desses adjuvantes para o nosso estudo.

Através da análise dos gráficos de proteção, observa-se diminuição da carga parasitária no grupo infectado com CL-14-A2. Embora essa redução não seja

estatisticamente significativa em relação ao grupo CL-14 e ao grupo A2r + MPLA, observa-se uma tendência de aumento da proteção nesse grupo, corroborando com o perfil de resposta celular desenvolvido. Se por um lado os resultados indicam que tanto a proteína recombinante isolada, quanto o parasita CL-14 é capaz de, separadamente, conferir proteção parcial aos camundongos BALB/c, por outro, ocorre um aparente efeito sinérgico, tanto no estabelecimento de uma resposta imune celular, quanto na proteção do organismo, quando infectados com CL-14-A2.

Ainda não há um consenso sobre a melhor rota de infecção e os melhores métodos de quantificação da carga parasitária. Por exemplo, os dados mostrados por OLIVEIRA et al. (2012) onde a rota subcutânea (dorso da pata direita) induziu maior carga parasitária de *Leishmania L. infantum* em camundongos BALB/c, contrastam com os resultados apresentados por KAUR et al. (2008) que mostraram infecção máxima nesse modelo, quando inoculados pela rota intracardíaca com *Leishmania L. donovani*. Curiosamente, a infecção mais lenta observada nesse estudo se deu pela via subcutânea, mesmo quando comparada com as vias intradérmica, intraperitoneal e intracardíaca (KAUR et al., 2008). Além disso, os métodos de quantificação da carga parasitária variam entre os estudos. Tanto o ensaio de diluição limitante, quanto a determinação de Unidades de *Leishmania Donovanii* (LDU) (BRADLEY; KIRKLEY, 1977), são métodos cuja sensibilidade é menor, quando comparados com a quantificação molecular por PCR em tempo real (qPCR) (MOREIRA et al., 2012). Um recente estudo realizado em hamsters, mostrou que a infecção intracardíaca com *Leishmania L. infantum* foi, também, a que induziu maior carga parasitária, inclusive causando letalidade nos animais, fato que mostrou a importância do modelo para estudos de leishmaniose visceral. Paralelamente, as vias intradérmica e intraperitoneal, induziram baixos níveis de parasitismo tecidual, embora detectáveis pela qPCR (MOREIRA et al., 2012). Levando em conta a incerteza dos modelos e protocolos mais adequados para estudos de proteção vacinal, é possível que nossa metodologia de infecção, período de incubação e quantificação da carga parasitária estejam subestimando a eficácia protetora do candidato.

O modelo experimental de leishmaniose visceral utilizado por nosso grupo foi baseado nos estudos de Oliveira et al. (2011) sobre os parâmetros parasitológicos da infecção por *Leishmania L. chagasi* em camundongos BALB/c, que mostraram, que a infecção subcutânea pelo dorso da pata direita resultava na maior carga parasitária entre o 30^o e o 45^o dia pós-infecção. A escolha desse modelo foi motivada pela praticidade da manutenção,

disponibilidade, fácil manuseio dos animais e experiência prévia no nosso grupo. Todavia, pode-se questionar a utilidade desse modelo para essa abordagem, visto que dista consideravelmente da infecção natural pelo flebotomíneo e do contexto imunomodulatório em que esta se dá. No modelo BALB/c alguns autores observam que a carga parasitária é controlada a partir do 30º dia, vindo a reduzir naturalmente a partir de então (AHMED et al., 2003). Tal situação distancia ainda mais o modelo em questão da infecção natural por *Leishmania L. chagasi*. Tendo em vista esse modelo, torna-se importante relativizar os resultados de eficácia protetora observados. Cumpre ressaltar também, que os resultados apresentados são preliminares e apenas indicativos de uma possibilidade de estudo. A repetição dos experimentos, bem como o estudo em outros modelos, é necessária para concretizar a evidência do organismo CL-14 A2 como alternativa vacinal contra a leishmaniose visceral.

O efeito esperado com o uso da cepa CL-14 para veicular o antígeno A2 era a ocorrência de um sinergismo na indução da resposta imune celular, visto que diversos estudos já mostraram que a vacinação com CL-14 foi capaz de induzir uma potente imunidade mediada por células T, com produção de altos níveis de IFN- γ , bem como resposta de células CD8 (PAIVA et al., 1999; JUNQUEIRA et al., 2011). Portanto, os níveis de IFN- γ observados no grupo controle CL-14 e no grupo CL-14 A2 do presente estudo, concordam com os dados da literatura em suas propriedades imunogênicas. Tais propriedades, somadas ao repertório antigênico comum aos dois organismos indicam que a cepa CL-14 é uma alternativa eficaz como vetor para entrega de antígenos vacinais contra a leishmaniose visceral.

Além de possuir propriedades imunogênicas importantes e ser capaz de simular o curso da infecção, mantendo uma resposta potente e duradoura (MIZBANI et al., 2009), a cepa CL-14 é uma alternativa segura para o uso como vacina viva. O clone 14 de *T. cruzi* se mostrou incapaz de infectar, mesmo os modelos mais suscetíveis, como camundongos BALB/c recém-nascidos (1-2 dias) (LIMA et al., 1990), além de não desencadear parasitismo em nenhum dos tecidos investigados, mesmo após profunda investigação sistêmica via análises histopatológicas (LIMA et al., 1995). Não obstante, ainda é necessário investigar se a introdução do gene codificador da proteína A2 no genoma do parasita, pode alterar a sua infectividade comprometendo a segurança da formulação. Embora os mecanismos da não-virulência da cepa CL-14 ainda permaneçam pouco esclarecidos, é sabido que a infectividade

in vitro da cepa CL-14 à células Vero é afetada a 37°C, ocorrendo inibição da diferenciação de amastigotas em tripomastigotas. Esse dado sugere que um dos fatores responsáveis pela avirulência da cepa seja o ambiente do hospedeiro vertebrado e sua alta temperatura (37°C) (BRENER et al., 1976). Ao mesmo tempo, (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012) mostraram que a inibição da expressão da proteína A2 em *Leishmania L. donovani*, aumentou a sua sensibilidade a altas temperaturas e outros estresses, sugerindo que essa proteína pode estar envolvida na resistência ao ambiente intracelular de hospedeiros. Portanto, torna-se necessário investigar as alterações que a transfecção do gene A2 possam ter causado na virulência da cepa CL-14.

Os dados preliminares e a execução desse projeto apontam que outros antígenos, bem como a associação deles e o uso de outros modelos experimentais podem abrir perspectivas de uma vertente de estudos utilizando essa estratégia. A otimização dessa estratégia pode ser um caminho para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a leishmaniose visceral.

7 - CONCLUSÕES

- O organismo modificado T. CRUZICL-14 A2 mostrou-se capaz de expressar estavelmente a proteína A2 e veiculá-la como antígeno vacinal.

- A imunização com a proteína recombinante A2 associada aos adjuvantes MPLA e CPG/Alumen induziu resposta humoral, com altos títulos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a e resposta celular com produção de IFN- γ por células T CD4 e T CD8. Essa resposta foi capaz de induzir proteção parcial contra o desafio por *Leishmania L. infantum*, com redução da carga parasitária no baço e fígado.

- A imunização com a construção CL-14 A2 não apenas induziu uma potente resposta celular, associada tanto à células CD4 como CD8, com elevada produção de IFN- γ , como foi capaz de induzir proteção em camundongos BALB/c, contra a infecção por *Leishmania L. infantum*.

- O uso do organismo geneticamente modificado CL-14 A2 foi capaz de induzir uma resposta celular mais potente do que a proteína recombinante com ambos os adjuvantes, bem como promover uma maior redução na carga parasitária, após desafio com *Leishmania L. infantum*.

- A modificação de parasitas atenuados para expressão de antígenos imunogênicos contra leishmaniose visceral representa uma abordagem interessante na procura de vacinas contra essa doença. O estudo reforça a importância dessa estratégia como alternativa em busca do desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose, abrindo possibilidades de pesquisas com outros antígenos e outros protocolos de vacinação.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L. et al. Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 401–410, 2003.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, RICARDO; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, n. null, p. 1–88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANSARI, N. A.; KUMAR, R.; GAUTAM, S. et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 7, p. 3977–85, 2011.

ATAYDE, V. D.; NEIRA, I.; CORTEZ, M. et al. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 7, p. 851–60, 2004.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.

BANKOTI, R.; GUPTA, K.; LEVCHENKO, A.; STÄGER, S. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 8, p. 3961–71, 2012.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–37, 2006.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–7, 2002. Macmillian Magazines Ltd.

BERN, C.; HIGHTOWER, A. W.; CHOWDHURY, R. et al. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 655–62, 2005.

BOLAJI, T. N.; BUXBAUM, L. U. FcγIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 623–31, 2008.

BOTTREL, R. L. A.; DUTRA, W O; MARTINS, F. A. et al. Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble *Leishmania* Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 3232–3239, 2001.

BRADLEY, D. J.; KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. **Clinical and experimental immunology**, v. 30, n. 1, p. 119–129, 1977.

BRENER, Z.; GOLGHER, R.; BERTELLI, M. S.; TEIXEIRA, J. A. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. **The Journal of protozoology**, v. 23, n. 1, p. 147–50, 1976.

BURTON, D. R.; GREGORY, L.; JEFFERIS, R. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. **Monographs in allergy**, v. 19, p. 7–35, 1986.

CARVALHO, F. A. A.; CHAREST, HUGUES; TAVARES, C. A. P. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289–95, 2002.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 3231–3240, 2009.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 103, n. 1-2, p. 67–75, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–82, 2007.

CHARREST, H; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 5, p. 2975–84, 1994.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.

COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ; ALBERTO, C.; TAVARES, P. et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen , but Not by the LACK Antigen , Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.

COLER, R. N.; REED, STEVEN G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244–9, 2005.

COSTA, C. H. N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2001.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959–2963, 2008.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232–242, 2011.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A; BARTHOLOMEU, D. C. et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology research**, v. 92, n. 2, p. 113–20, 2004.

DEAK, E.; JAYAKUMAR, A.; CHO, K. W. et al. Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355–1368, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417–423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–18, 2004.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 404–9, 2005.

ELIAS, F.; FLO, J.; RODRIGUEZ, J. M. et al. PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. **Vaccine**, v. 23, n. 27, p. 3597–603, 2005.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, p. 892817, 2012.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ; et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–95, 2008.

FOGG, C. N.; AMERICO, J. L.; LUSTIG, S. et al. Adjuvant-Enhanced Antibody Responses to Recombinant Proteins Correlates with Protection of Mice and Monkeys to Orthopoxvirus Challenges. **Vaccine**, v. 25, n. 15, p. 2787–2799, 2007.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A; et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324–9, 1993.

GHALIB, HW; WHITTLE, J.; KUBIN, M. et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4623–4629, 1995.

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

GHOSH, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 3, p. 291–6, 1995.

GHOSH, A.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, GREG. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. **Vaccine**, v. 19, n. 23-24, p. 3169–3178, 2001b.

GIDWANI, K.; PICADO, A.; OSTYN, B. et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 18, n. 2, p. 346–8, 2011.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, RICARDO T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399–409, 2004.

GRIENSVEN, J. VAN; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–22, 2012. Elsevier Inc.

HAFALLA, J. C. R.; COCKBURN, I. A; ZAVALA, F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. **Parasite immunology**, v. 28, n. 1-2, p. 15–24, 2006.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7011–5, 1991.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of postgraduate medicine**, v. 49, n. 1, p. 50–4, 2003.

HOGENESCH, H. Mechanism of immunopotentialiation and safety of aluminum adjuvants. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. January, p. 406, 2012.

HOLADAY, B. J.; POMPEU, M. M.; JERONIMO, S. et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 6, p. 2626–32, 1993.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, n. September, p. e29, 2010.

- JUNQUEIRA, C.; SANTOS, L. I.; GALVÃO-FILHO, B. et al. *Trypanosoma cruzi* as an effective cancer antigen delivery vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 49, p. 19695–700, 2011.
- KAUL, S. M.; SHARMA, R. S.; DEY, K. P.; RAI, R. N.; VERGHESE, T. Impact of DDT indoor residual spraying on *Phlebotomus argentipes* in a kala-azar endemic village in eastern Uttar Pradesh. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 72, n. 1, p. 79–81, 1994.
- KAUR, S.; KAUR, T.; GARG, N. et al. Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. **Parasitology research**, v. 103, n. 6, p. 1413–9, 2008.
- KHAMESIPOUR, A.; DOWLATI, Y.; ASILIAN, A. et al. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3642–8, 2005.
- KOPF, M.; BROMBACHER, F.; KÖHLER, G. et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 1127–36, 1996.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. August, p. 251, 2012.
- LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, 1993.
- LIMA, M. T.; JANSEN, A. M.; RONDINELLI, E.; GATTASS, C R. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. **Parasitology research**, v. 77, n. 1, p. 77–81, 1990.
- LIMA, M. T.; LENZI, H. L.; GATTASS, C R. Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 81, n. 1, p. 6–12, 1995.
- MARTINEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, v. 199, n. 1-2, p. 71–76, 1997.
- MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 2, p. e114, 2007.
- MCCALL, L.-I.; MATLASHEWSKI, GREG. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 2, p. 518–30, 2010.
- MCCALL, L.-I.; MATLASHEWSKI, GREG. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 2, p. 109–15, 2012. Elsevier Inc.

MCCALL, L.-I.; ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, GREG. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, 2013.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 3, p. 1912–20, 2001a.

MELBY, P. C.; TABARES, A.; RESTREPO, B. I. et al. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, 2001b.

MIZBANI, A.; TAHERI, T.; ZAHEDIFARD, F. et al. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 53–62, 2009.

MOREIRA, N. D. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M. et al. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan units” versus real-time PCR. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47907, 2012.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209–212, 2003.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 8, p. 4916–23, 2005.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–77, 2005.

NOAZIN, S.; MODABBER, F.; KHAMESIPOUR, A. et al. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759–67, 2008.

NYLEN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–17, 2007.

OLIVEIRA, D. M.; COSTA, M. A. F.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A; et al. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. **Parasitology research**, v. 110, n. 3, p. 1277–85, 2012.

PAIVA, C N; CASTELO-BRANCO, M. T.; ROCHA, J. A; LANNES-VIEIRA, J.; GATTASS, C R. *Trypanosoma cruzi*: lack of T cell abnormalities in mice vaccinated with live trypomastigotes. **Parasitology research**, v. 85, n. 12, p. 1012–7, 1999.

PAIVA, N.; PYRRHO, A. S.; LANNES-VIEIRA, J. et al. *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant SEB-induced shock : overrelease of inflammatory cytokines and independence of Chagas disease or TCR usage. **Shock**, v. 19, n. 2, p. 163–168, 2003.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032–9, 2010. International Society for Infectious Diseases.

PINELLI, E.; KAAIJ, S. Y. VAN DER; SLAPPENDEL, R. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2-4, p. 121–126, 1999.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V; TEVA, A. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 5, p. 544–8, 2007.

PYRRHO, A S.; MORAES, J. L.; PEÇANHA, L. M.; GATTASS, C R. *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. **Parasitology research**, v. 84, n. 4, p. 333–7, 1998.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.

RESENDE, D. D. M.; CAETANO, B.; DUTRA, M. S. et al. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen - Rezende 2008.pdf. **Vaccine**, v. 26, n. 35, p. 4585–4593, 2008.

REYBURN, H.; ASHFORD, R.; MOHSEN, M.; HEWITT, S.; ROWLAND, M. A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 361–6, 2000.

RIBEIRO, V. M.; SILVA, S. M. DA; MENZ, I. et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

RIVIER, D.; BOVAY, P.; SHAH, R.; DIDISHEIM, S.; MAUËL, J. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite immunology**, v. 21, n. 9, p. 461–73, 1999.

ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British medical bulletin**, v. 75-76, p. 115–30, 2005.

RODRIGUES, MAURICIO M; BOSCARDIN, S. B.; HIYANE, M. I.; SALAY, G.; SOARES, I. S. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 443–468, 2003.

ROMERO, G. A S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

RONET, C.; VOIGT, H.; HIMMELRICH, H. et al. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to L. major LV39 in BALB/c mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 7, p. 4825–35, 2008.

ROSTAMI, M. N.; KESHAVARZ, H.; EDALAT, R. et al. CD8+ T Cells as a Source of IFN- γ Production in Human Cutaneous Leishmaniasis - Rostami (2010).pdf. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. 1–9, 2010.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p. 21–30, 2002.

SAPORITO, L.; GIAMMANCO, G. M.; GRAZIA, S. DE; COLOMBA, C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, p. 1–5, 2013. International Society for Infectious Diseases.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 147, n. 9, p. 3149–3155, 1991.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675–84, 1988.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; SHER, A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 137, n. 3, p. 1017–1021, 1986.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–42, 2012. Elsevier Ltd.

SINHA, S.; FERNÁNDEZ, G.; KAPILA, R.; LAMBERT, W. C.; SCHWARTZ, R. A. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. **International journal of dermatology**, v. 47, n. 12, p. 1263–70, 2008.

SMELT, S. C.; COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 7, p. 3681–8, 2000.

SOARES, M. B. P.; GONÇALVES, R.; PYRRHO, A. S. et al. Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 2, p. 167–72, 2003.

SUNDAR, S.; REED, STEVEN G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H. W. Circulating T Helper 1 (Th1) Cell- and Th2 Cell-Associated Cytokines in Indian Patients with Visceral Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 5, p. 522–525, 1997.

TEIXEIRA, S M; KIRCHHOFF, L. V; DONELSON, J E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 38, p. 22586–94, 1995.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8+ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis - TSAGOZIS (2003).pdf. **Parasite immunology**, v. 25, n. 11-12, p. 569–579, 2003.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 54, n. 2, p. 139–46, 2005.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 2001.

TYLER-CROSS, R. E.; SHORT, S. L.; FLOETER-WINTER, L. M.; BUCK, G. A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 72, n. 1-2, p. 23–31, 1995.

UZONNA, J. E.; WEI, G.; YURKOWSKI, D.; BRETSCHER, P. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 12, p. 6967–74, 2001.

VEXENAT, A. DE C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa. **Revista do Instituto de Medicinal Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177–185, 1996.

WANG, W. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. **World Journal of Vaccines**, v. 01, n. 02, p. 33–78, 2011.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1367–71, 1994.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, RICHARD D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–60, 2005.

WOELBING, F.; KOSTKA, S. L.; MOELLE, K. et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 1, p. 177–88, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE. Control of leishmaniasis - **WHO Technical report series**. v. 949, p. 1-186, 2010.

ZANIN, F. H. C.; COELHO, E. A F.; TAVARES, C. A P. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 9, n. 9, p. 1070–7, 2007.

ZHANG, W.; MENDEZ, S.; GHOSH, A. et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35508–15, 2003.

ZHANG, W. W.; CHAREST, H; GHEDIN, E; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 78, n. 1-2, p. 79–90, 1996.

9 - ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 73/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da imunogenicidade e da capacidade de induzir proteção de antígenos de *Leishmania chagasi* para o desenvolvimento de vacinas**", que tem como responsável(is) **Ana Paula Salles Moura Fernandes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/05/2009**.

Este certificado expira-se em **20/05/2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 73/2009**, related to the project entitled "**Evaluation of the immunogenicity and levels of protection induced by *Leishmania chagasi* proteins as antigens for vaccine development**", under the supervisors of **Ana Paula Salles Moura Fernandes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 20, 2009**.

This certificate expires in **May 20, 2014**.

Belo Horizonte, 25 de Maio de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31274-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3496-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/etica/cetea - cetea@org.ufmg.br

[Mod. Cert. 01 C]