

**VIVIAN TAMIETTI MARTINS**

**ANTIGENICIDADE E PROTEÇÃO VACINAL DE UMA PROTEÍNA  
AMASTIGOTA-ESPECÍFICA DE *LEISHMANIA* NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

**BELO HORIZONTE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
2013**

**VIVIAN TAMIETTI MARTINS**

**ANTIGENICIDADE E PROTEÇÃO VACINAL DE UMA PROTEÍNA  
AMASTIGOTA-ESPECÍFICA DE *LEISHMANIA* NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadores: Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares  
Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho**

**BELO HORIZONTE**

**2013**

043 Martins, Vivian Tamiatti.  
Antigenicidade e proteção vacinal de uma proteína amastigota-específica de leishmania na leishmaniose visceral [manuscrito] / Vivian Tamiatti Martins. - 2013.

67 f.; il. ; 29,5 cm.

Orientadores: Carlos Alberto Pereira Tavares; Eduardo Antonio Ferraz Coelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. *Leishmania infantum*. 2. Vacinas - Teses. 3. Diagnóstico sorológico. 4. Proteínas hipotéticas. 5. Imunoproteômica. 6. Bioquímica - Teses. I. Tavares, Carlos Alberto Pereira. II. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Bioquímica e Imunologia. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais -  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VIVIAN TAMIETTI MARTINS.** Aos vinte e oito dias do mês fevereiro de 2013 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “*Antigenicidade e eficácia protetora de uma proteína amastigota-específica de Leishmania na leishmaniose visceral*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração em Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Leda Quercia Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Simone Aparecida Resende da Universidade Federal de Ouro Preto, aprovada; Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, co-orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerado APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2013.

*Simone Aparecida Resende*  
 Dra. Simone Aparecida Resende – UFOP

*Leda Quercia Vieira*  
 Dra. Leda Quercia Vieira – UFMG

*Rodolfo Cordeiro Giunchetti*  
 Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti - UFMG

*Eduardo Antonio Ferraz Coelho*  
 Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – co-orientador - UFMG

*Carlos Alberto Pereira Tavares*  
 Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares – orientador - UFMG

*Glória Regina Franco*  
 Prof. Glória Regina Franco  
 Subcoordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Eduardo Coelho, por despertar o meu espírito científico e me ensinar a trabalhar com dedicação e responsabilidade, sendo um grande exemplo de pesquisador.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Tavares, pela orientação, exemplo, ensinamentos e pela confiança.

Ao Doutor e amigo Miguel Cháves-Fumagalli por todo auxílio necessário ao desenvolvimento deste trabalho. Por todas as dicas e pela boa vontade e prontidão para ajudar quando necessário. Por tornar o ambiente do laboratório mais divertido e mais sério ao mesmo tempo!

Aos alunos Pedro, Danizão, Lulu, Bela e Dani por sempre estarem dispostos a ajudar nos experimentos e pela amizade e companheirismo! Adoro vocês!

Aos amigos Lou, Mari, Tati, Diogo e Paula pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, discussões sobre novas ideias e pelas diversões fora do ambiente de trabalho! Vocês são nota 10!

Ao Professor Doutor Ronaldo Nagem e ao Mestre Rubens Magalhães pela colaboração ao desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Paula Fernandes por abrir as portas do seu laboratório para realização de alguns experimentos e pelo auxílio e boas ideias para o trabalho.

Aos alunos da Faculdade de Farmácia Adriana, Daniel, Angela e Leopoldo pela boa recepção e boa vontade em ajudarem no que foi necessário.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser concluído, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1. Epidemiologia das leishmanioses.....	15
2.2. A etiologia e o ciclo biológico do parasito.....	15
2.3. Manifestações clínicas da doença.....	17
2.4. Diagnóstico das leishmanioses.....	19
2.5. Tratamento da doença.....	20
2.6. Medidas de controle e de prevenção contra as leishmanioses.....	21
2.7. Resposta imune na leishmaniose visceral murina.....	22
2.8. Desenvolvimento de vacinas com antígenos definidos.....	23
2.9. Proteína amastigota-específica de <i>Leishmania</i> , LiHyp1.....	24
2.10. Saponina como adjuvante de resposta imune.....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Animais de experimentação.....	29
4.2. Parasitos.....	29
4.3. Amostras de soros.....	29
4.4. Preparo do extrato proteico solúvel de <i>Leishmania infantum</i> (SLALi).....	29
4.5. Dosagem de proteínas.....	30
4.6. Análise por bioinformática.....	30
4.7. Clonagem da proteína LiHyp1.....	31
4.7.1. Extração do DNA genômico dos parasitos.....	31
4.7.2. Amplificação da sequência gênica de LiHyp1 por PCR.....	32
4.7.3. Ligação do gene da LiHyp1 em pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector Systems.....	32
4.7.4. Preparo e transformação de bactérias <i>E. coli XL1blue</i> .....	33
4.7.5. Extração do DNA plasmidial.....	33
4.7.6. Sequenciamento do gene da LiHyp1.....	33
4.7.7. Clonagem do gene da LiHyp1 em vetor de expressão pET21a.....	34
4.8. Expressão e purificação da proteína recombinante LiHyp1 (rLiHyp1).....	35

4.9. Eletroforese em gel de SDS-PAGE.....	36
4.10. Western-blot .....	37
4.11. Avaliação da antigenicidade da proteína rLiHyp1 .....	38
4.12. Imunização de camundongos BALB/c .....	38
4.13. Infecção desafio.....	39
4.14. Isolamento e cultura dos esplenócitos .....	39
4.15. Dosagem das citocinas.....	40
4.16. Avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a.....	40
4.17. Avaliação da carga parasitária.....	41
4.18. Análise estatística .....	41
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
5.1 Antigenicidade da proteína amastigota-específica inédita de <i>L. infantum</i> , LiHyp1.....	42
5.2. Imunogenicidade da proteína rLiHyp1 em camundongos BALB/c .....	44
5.3. Eficácia protetora da proteína rLiHyp1 em camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> .....	46
5.4. Resposta imune induzida após a infecção desafio com <i>L. infantum</i> .....	47
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania infantum</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Sequência de 318 aminoácidos da proteína LiHyp1. ....	25
<b>Figura 3:</b> Conversão de prolina em hidroxiprolina .....	26
<b>Figura 4:</b> Antigenicidade da proteína rLiHyp1. ....	42
<b>Figura 5:</b> Avaliação da proteína rLiHyp1 no sorodiagnóstico da LVC. ....	43
<b>Figura 6:</b> Produção de citocinas nos grupos de camundongos BALB/c controle e imunizados com a proteína rLiHyp1 e saponina. ....	45
<b>Figura 7:</b> Análise da proporção na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias.....	45
<b>Figura 8:</b> Análise da proporção da produção de imunoglobulinas do isotipo G2a/G1. ....	46
<b>Figura 9:</b> Avaliação da carga parasitária nos camundongos BALB/c vacinados com rLiHyp1/saponina contra a infecção por <i>L. infantum</i> .....	47
<b>Figura 10:</b> Produção de IFN- $\gamma$ pelos esplenócitos dos grupos avaliados e análise do envolvimento de IL-12, de LT CD4 <sup>+</sup> e LT CD8 <sup>+</sup> na produção desta citocina em camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina e desafiados com <i>L. infantum</i> .....	48
<b>Figura 11:</b> Produção de IL-12 e GM-CSF por células de baço de camundongos BALB/c após infecção com <i>L. infantum</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> Produção de IL-4 e IL-10 pelas células de baço de camundongos BALB/c após infecção de <i>L. infantum</i> .....	49
<b>Figura 13:</b> Análise da proporção na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias após a infecção com <i>L. infantum</i> .....	50
<b>Figura 14:</b> Produção de citocinas nos grupos de camundongos BALB/c após infecção com <i>L. infantum</i> .....	51
<b>Figura 15:</b> Análise da proporção da produção de imunoglobulinas do isotipo G2a/G1 após a infecção com <i>L. infantum</i> .....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sensibilidade e especificidade da proteína rLiHyp1 para o sorodiagnóstico da LVC.....	44
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**$\alpha$ R** – Receptor alfa  
**® ou <sup>TM</sup>** – *Registered trademark*  
**Abs** – Absorbância  
**ANOVA** – Análise de variância  
**APCs** – Células apresentadoras de antígenos  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**BSA** – Albumina sérica bovina  
**ConA** – Concanavalina A  
**CpG-ODN** – Oligodeoxinucleotídeos de citosina-fosfato-guanosina  
**DAT** – Teste de aglutinação direta  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
**DO** – Densidade ótica  
**DTT** – Ditioneitol  
**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético  
**ELISA** – Ensaio imunoenzimático  
**FML** – Ligante fucose-manose  
**FPLC** – Cromatografia líquida de rápida performance  
**GM-CSF** – Fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos  
**gp63** – Glicoproteína de 63 kDa  
**HASPB1** – *Hydrophilic acylated surface protein B1*  
**Hsp70** – *Heat shock protein de 70 kDa*  
**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas  
**ICT** – Teste imunocromatográfico  
**IFAT** – Ensaio de imunofluorescência indireta  
**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama  
**IgG** – Imunoglobulina G  
**IL-2** – Interleucina-2  
**IL-4** – Interleucina-4  
**IL-5** – Interleucina-5  
**IL-6** – Interleucina-6  
**IL-10** – Interleucina-10  
**IL-12** – Interleucina-12  
**IL-13** – Interleucina-13  
**IL-18** – Interleucina -18  
**iNOS** – Óxido nítrico sintetase induzido  
**IPTG** – Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo  
**KMP-11** – *Kinetoplastid membrane protein de 11 kDa*  
**KO** – *Knockout*  
**LACK** – *Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*  
**LB** – Linfócito B  
**LC** – Leishmaniose cutânea  
**LCD** – Leishmaniose cutâneo-difusa  
**LeIF-2** – Fator de alongamento 2 de *Leishmania*  
**LiHyp1** – *Leishmania infantum hypothetical protein 1*  
**LMC** – Leishmaniose muco-cutânea  
**LPG** – Lipofosfoglicano

**LT** – Leishmaniose tegumentar  
**LT** – Linfócito T  
**LV** – Leishmaniose visceral  
**LVC** – Leishmaniose visceral canina  
**Meio LB** – meio de cultura Luria Bertani  
**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade  
**n** – Número amostral  
**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*  
**NO** – Óxido nítrico  
**NK** – *Natural Killer*  
**OPD** – Orto-fenilenodiamina  
**ORF** – *Open reading frame*  
**PAMPs** – Padrões moleculares associados ao patógeno  
**pb** – Pares de bases  
**PBMC** – Células mononucleares de sangue periférico  
**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PCR *Real Time*** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**PPRs** – Receptores de reconhecimento de padrões  
**PSA** – Persulfato de amônio  
**PSA-2** – *Promastigote surface antigen 2*  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**SDS-PAGE** – Gel de poliacrilamida desnaturante  
**SLA** – Extrato antigênico de *Leishmania*  
**SLALi** – Extrato antigênico de *Leishmania infantum*  
**Syn.** – Sinônimo  
**r** – Recombinante  
**RNA<sub>m</sub>** – Ácido ribonucleico mensageiro  
**ROC** – *Receiver Operating Characteristic*  
**RPMI** – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*  
**SFB** – Soro fetal bovino  
**TAE** – Tampão Tris-HCl/Ácido acético/EDTA  
**TBE** – Tampão Tris-HCl/Ácido Bórico/EDTA  
**TE** – Tampão Tris-EDTA  
**TEMED** – N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina  
**TGF- $\beta$**  – Fator de transformação de crescimento beta  
**Th1** – Linfócitos T *helper* do tipo 1  
**Th2** – Linfócitos T *helper* do tipo 2  
**TI** – Tampão de incubação  
**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa  
**UV** – Ultra-violeta  
**X-Gal** – 5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

A aquisição de proteção contra a reinfeção por algumas espécies de *Leishmania* indica a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina profilática contra as leishmanioses. Na busca por um antígeno candidato para compor uma vacina efetiva contra a leishmaniose visceral (LV), proteínas presentes nas formas amastigotas do parasito tornam-se alvos atrativos, uma vez que tal forma é a encontrada causando a doença nos hospedeiros mamíferos. Neste trabalho, avaliamos uma proteína hipotética amastigota-específica de *Leishmania infantum*, denominada LiHyp1, identificada por meio de uma pesquisa imunoproteômica, na tentativa de selecionar um novo antígeno candidato para vacina contra a LV. Em paralelo, a proteína LiHyp1 foi também avaliada em sua antigenicidade para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Em testes de ELISA, a proteína rLiHyp1 foi reconhecida por anticorpos presentes em soros de cães com LV assintomática e sintomática e não apresentou reatividade cruzada com anticorpos presentes em soros de cães com doença de Chagas ou de cães sem leishmanioses (saudáveis) e/ou vacinados com a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>. A imunogenicidade da proteína rLiHyp1 associada a saponina foi testada em camundongos BALB/c e sua eficácia vacinal foi avaliada após o desafio com promastigotas de *L. infantum*. Os esplenócitos dos animais vacinados apresentaram uma produção elevada de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF após a estimulação *in vitro* com a proteína rLiHyp1. Após o desafio, tais animais, quando comparados aos grupos controle (salina e saponina), apresentaram uma redução significativa da carga parasitária no fígado, baço, na medula óssea e no linfonodo drenante, sendo tal proteção associada com uma produção elevada de IFN- $\gamma$ . Esta produção ocorreu principalmente devido aos LT CD4<sup>+</sup> e foi dependente da presença de IL-12. Observou-se também que houve uma redução na produção de IL-4 e IL-10. O presente trabalho demonstrou que a proteína hipotética amastigota-específica inédita de *Leishmania*, LiHyp1, pode ser utilizada para novos testes no sorodiagnóstico da LVC e, quando combinada a saponina, pode ser usada para compor uma vacina efetiva contra a LV murina.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, vacinas, diagnóstico sorológico, proteínas hipotéticas, imunoproteômica, LiHyp1.

## ABSTRACT

The acquisition of life-long immunity to the disease in recovered patients has motivated the development of studies for prophylactic vaccination against leishmaniasis. Attempting to select candidate antigens to compose a vaccine against VL, we have targeted proteins presents in the intracellular amastigote stage, which is the parasite stage that persists throughout infection with *Leishmania* in the mammal hosts. The present study aims to evaluate a non-described hypothetical *Leishmania* amastigote-specific protein, LiHyp1, which was identified by an immunoproteomic approach performed in *L. infantum*, in an attempt to select a new candidate antigen for a vaccine against LV. In addition, the protein LiHyp1 was evaluated with regard to their antigenicity for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL). In ELISA tests, the rLiHyp1 protein was recognized by antibodies present in sera samples of dogs with asymptomatic and symptomatic visceral leishmaniasis (VL), but presented no cross-reactivity when the sera from dogs with Chagas' disease or healthy and/or vaccinated animals with Leish-Tec<sup>®</sup> were used. The immunogenicity of rLiHyp1 protein plus saponin was tested in BALB/c mice and their protective efficacy was evaluated after the challenged with *L. infantum* promastigotes. Mice vaccinated with rLiHyp1 presented a high production of IFN- $\gamma$ , IL-12, and GM-CSF after in vitro stimulation with the recombinant protein. Immunized and infected mice, as compared to the control groups (saline and saponin), had a significant reduction in the number of parasites found in the liver, spleen, bone marrow, and draining lymph node in the paws. Protection was associated with an IL-12-dependent production of IFN- $\gamma$ , produced mainly by CD4 T cells. In these mice, a decrease of IL-4 and IL-10 responses could also be observed. Therefore, the present study showed that this non-described *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein can be used for new serodiagnosis tests of CVL and, when combined with a saponin adjuvant, has proven to be useful in the protection against VL murine.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, vaccine, serological diagnosis, hypothetical proteins, immunoproteomic, LiHyp1.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas durante o repasto sanguíneo de vetores dos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas. Embora a manutenção do ciclo biológico destes insetos transmissores ocorra principalmente em ambiente silvestre, atualmente, pode-se observar uma maior incidência da doença em áreas rurais e periurbanas (WHO, 2010).

As leishmanioses são endêmicas em cerca de 98 países distribuídos por todo o mundo, sendo que mais de 350 milhões de pessoas encontram-se expostas aos riscos de infecção. Estima-se que aproximadamente 2 milhões de novos casos ocorram a cada ano, sendo que 1 a 1.5 milhões sejam casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 casos sejam de leishmaniose visceral (LV), a qual ocasiona anualmente cerca de 50.000 óbitos (WHO, 2010). De acordo com Alvar *et al.* (2012), o Brasil é responsável por aproximadamente 95% dos casos registrados de LV no Continente Americano e, devido à ampla distribuição e à possibilidade da doença em assumir formas graves e letais principalmente quando associada aos quadros de má nutrição e infecções concomitantes, a LV torna-se um importante problema de Saúde Pública e requer, dessa forma, atenção especial pelas autoridades de Saúde competentes.

Algumas das medidas profiláticas e de controle da LV visam à interrupção do ciclo biológico do parasito. Entretanto, o caráter zoonótico da doença e a manutenção do parasito no ciclo silvestre dificultam a adoção de medidas eficazes de controle. A aplicação de inseticidas para eliminação dos vetores pode ser realizada em ambientes domésticos e peridomésticos, entretanto, em regiões menos povoadas, apresenta eficácia reduzida (Tesh, 1995). O cão é considerado o principal reservatório no ciclo doméstico da LV, comportando-se como um elo de transmissão do parasito entre o vetor flebotomíneo e o homem. A eutanásia de cães soropositivos constitui-se em uma medida profilática adotada pelas autoridades competentes, porém, alguns problemas são relacionados, tais como a ocorrência de resultados falso-positivos nas triagens sorológicas realizadas e a própria relação familiar do cão com seu dono, esse, que muitas vezes prefere omitir a doença às autoridades competentes (Tesh, 1995; Gontijo & Melo, 2004). A eliminação de animais reservatórios silvestres também não se apresenta como uma medida eficaz e ecologicamente correta. Soma-se a tais

fatos a possibilidade de adaptação do parasito a outros reservatórios existentes no ambiente peridoméstico (Grimaldi & Tesh, 1993; Gramiccia & Gradoni, 2005).

O diagnóstico da LV é realizado com base em evidências clínicas e epidemiológicas, associados à realização de exames laboratoriais (Tesh, 1995). O diagnóstico sorológico apresenta-se dificultado por apresentar sensibilidade e/ou especificidade variáveis dos testes utilizados, levando à ocorrência de um número elevado de resultados falseados, o que tem criado grandes dificuldades na interpretação correta dos dados obtidos e, dessa forma, uma deficiência no controle efetivo da doença. Deste modo, a busca por um teste diagnóstico para leishmaniose que seja preciso, com elevada sensibilidade e especificidade e de reduzido custo à população faz-se necessária (Gomes *et al.*, 2008).

O tratamento de primeira escolha para as leishmanioses ocorre pela utilização de antimoniais pentavalentes, entretanto, o surgimento de resistência dos parasitos aos fármacos usados e os efeitos colaterais relatados tornam tal estratégia de aplicação insatisfatória (Croft & Coombs, 2003; Minodier & Parola, 2007). Outros fármacos, como anfotericina B lipossomal e a miltefosina oral também tem sido testadas, porém, apresentam elevado custo e podem causar elevada toxicidade aos pacientes (Mondal *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir as leishmanioses, como a busca por vacinas capazes de induzir imunidade protetora, é uma prioridade, sendo considerada uma medida alternativa para o controle da doença (Grimaldi & Tesh, 1993; Gonzalo *et al.*, 2002; Sukumaran *et al.*, 2003; Ramiro *et al.*, 2003; Desjeux, 2004).

Uma vacina efetiva deve conter, preferencialmente, antígenos que sejam compartilhados por diferentes espécies de *Leishmania*, ser imunogênica contra a maioria das espécies, apresentar um baixo custo de produção e uma boa estabilidade, além de não interferir na imunogenicidade induzida por outros antígenos (Grimaldi & Tesh, 1993; Coelho *et al.*, 2003). A maioria dos estudos utilizam antígenos das formas promastigotas dos parasitos, entretanto, antígenos das formas amastigotas devem ser considerados também como alvos alternativos para o desenvolvimento de uma formulação vacinal (Fernandes *et al.*, 2012).

A utilização de novas ferramentas biotecnológicas tem levado à identificação de novos antígenos com potencial imunogênico. Através de técnicas de imunoproteômica, nosso grupo de pesquisa recentemente descreveu várias proteínas hipotéticas de *Leishmania infantum* que foram reconhecidas por anticorpos presentes em amostras de soros de cães com LV sintomática e/ou assintomática (Coelho *et al.*, 2012). Neste trabalho, uma destas proteínas,

nomeada de LiHyp1 (XP\_001468941.1) foi selecionada, clonada e purificada para experimentos de imunogenicidade e proteção vacinal frente à infecção experimental de camundongos BALB/c com a espécie *L. infantum*. Por ter sido reconhecida por anticorpos de cães com LV, a proteína recombinante LiHyp1 foi também testada como antígeno para o diagnóstico da LVC.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Epidemiologia das leishmanioses**

As leishmanioses são doenças parasitárias endêmicas em cerca de 98 países distribuídos em todo o mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se expostas aos riscos de infecção e que aproximadamente 12 milhões estejam clinicamente afetadas. Estima-se que ocorra uma incidência anual de 1 a 1.5 milhões de novos casos de LT e de cerca de 500 mil novos casos de LV (WHO, 2010). No Continente Americano, calcula-se que o Brasil seja responsável por aproximadamente 95% dos casos de LV, o que torna essa doença um importante problema de Saúde Pública e que requer, dessa forma, uma atenção especial pelas autoridades competentes (Alvar *et al.*, 2012).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença que merece atenção, uma vez que apresenta uma maior prevalência quando comparada à doença humana e pelo fato de que muitos animais assintomáticos, residentes em áreas endêmicas da doença, podem estar contaminados e transmitirem os parasitos a novos hospedeiros (Marzochi *et al.*, 1985). A migração de cães infectados para áreas não endêmicas também tem contribuído para a disseminação da doença (Arias *et al.*, 1996).

### **2.2. A etiologia e o ciclo biológico do parasito causador da Leishmaniose Visceral**

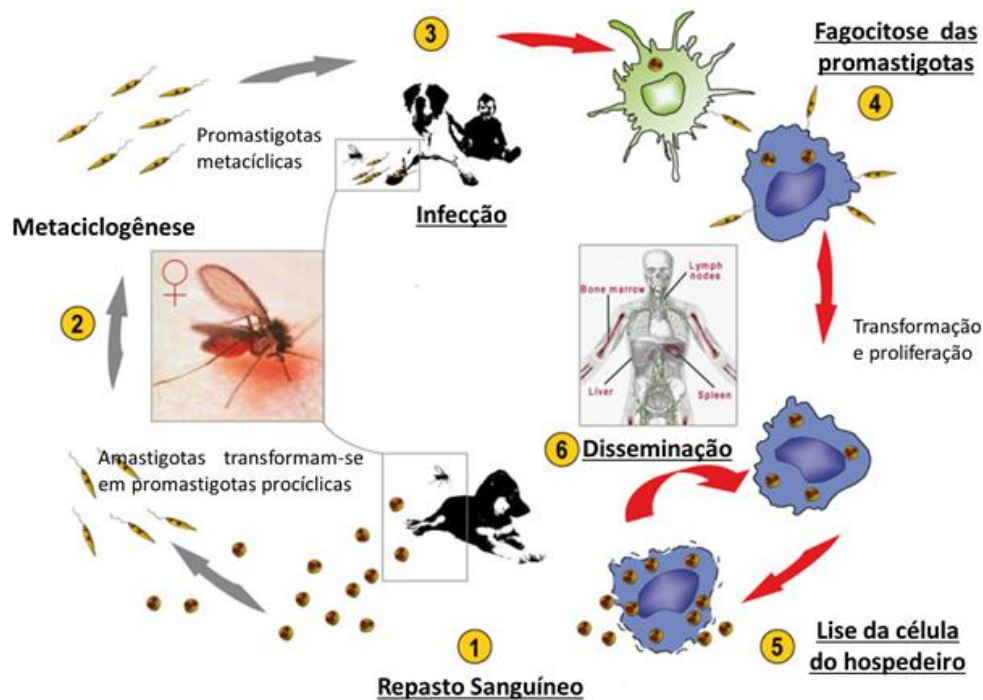
As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente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

O parasito *Leishmania* pode apresentar-se sob duas formas morfológicas principais: promastigota e amastigota. As formas promastigotas são alongadas, afiladas, com um único flagelo que lhe confere motilidade, cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo e são encontradas no vetor transmissor. As formas amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar, cinetoplasto em forma de bastão e que se multiplicam nos vacúolos fagocíticos no



interior de células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos (Sacks & Kamhawi, 2001; Sacks & Sher, 2002).

A transmissão do parasito ocorre no momento em que o vetor flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, podendo ingerir, juntamente com a alíquota de sangue, fagócitos infectados com formas amastigotas de *Leishmania infantum*. Essas células, ao alcançarem o intestino do vetor, rompem-se e liberam os parasitos, que se transformam rapidamente em formas promastigotas procíclicas e migram para o trato digestório médio e anterior. Os parasitos iniciam um intenso processo de multiplicação e assumem a forma paramastigota, seguida por diferenciação em formas promastigotas metacíclicas e migração para a parte anterior do aparelho bucal. Quando o vetor infectado realiza um novo repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas infectivas, as quais apresentam elevada motilidade e capacidade migratória, juntamente com a saliva, são transferidas para o mamífero não infectado. Em seguida, as células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, dentre as quais se destacam os macrófagos, podem fagocitar as formas promastigotas do parasito, que, no interior dos fagolisossomos formados, se diferenciam nas formas amastigotas. Os parasitos passam a se multiplicar e ao ocorrer a lise da célula, há liberação das formas amastigotas no organismo do hospedeiro. Os parasitos liberados podem ser fagocitados por novas células, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero, tornando-o doente. Um novo vetor, não infectado, pode então ingerir as células fagocíticas parasitadas do hospedeiro mamífero infectado, completando assim, o ciclo biológico do parasito (Pessoa & Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005).



**Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania infantum*.** 1. Infecção do vetor no momento em que realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (ingestão de amastigotas). 2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas metacíclicas no interior do vetor. 3. Inoculação das formas promastigotas metacíclicas e infecção no hospedeiro mamífero. 4. Fagocitose dos parasitos por macrófagos, transformação em amastigotas e proliferação. 5. Lise da célula hospedeira com liberação de amastigotas. 6. Disseminação dos parasitos para órgãos e tecidos do hospedeiro mamífero. Adaptado de Nieto *et al.* (2011).

### 2.3. Manifestações clínicas da doença

A patogenia das leishmanioses é determinada por fatores relacionados ao hospedeiro, como características genéticas e resposta imunológica, por fatores relacionados ao parasito, como a virulência da espécie infectante e por fatores relacionados ao vetor. O resultado desta interação pode levar desde ao desenvolvimento de uma forma assintomática da doença até as mais variadas manifestações clínicas. Dessa forma, as leishmanioses podem ser classificadas em duas grandes categorias clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT), que compreende as formas cutânea, muco-cutânea e cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral (LV) (Kane & Mosser, 2000).

A leishmaniose cutânea (LC) manifesta-se com um nódulo no local da inoculação e evolui lentamente formando uma crosta central que se solta e expõe uma úlcera granulosa contornada por uma borda elevada. Normalmente, a lesão é indolor e única, mas nódulos satélites podem ocorrer nas proximidades da lesão inicial. Lesões vegetantes, verrucosas e infiltrantes são menos frequentes. As principais espécies que causam LC são: *L. braziliensis*,

*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. shawi* e *L. naiffi* nas Américas; e *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* em países do Velho Mundo (Marzochi & Marzochi, 1994; Desjeux, 2004; Silveira *et al.*, 2004).

Casos de leishmaniose muco-cutânea (LMC) ocorrem em diversos países pela infecção com as espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. A LMC manifesta-se com lesões que apresentam caráter infiltrante, podendo ulcerar e sangrar. A mucosa das cavidades nasal, da boca, faringe, laringe e traquéia são as mais afetadas e podem levar à lesões mutilantes no paciente. Embora a forma muco-cutânea seja mais frequentemente relatada em países do Novo Mundo, casos de LMC têm sido relacionados à infecção com *L. major* e *L. donovani* em países do Velho Mundo (Desjeux, 2004).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) ocorre principalmente pela infecção com a espécie *L. aethiopica* na África ou pelas espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* nas Américas. É uma forma em que as lesões apresentam-se como nódulos, de forma anérgica e que raramente ulceram. As lesões espalham-se por todo o corpo e este quadro pode estar relacionado com a ineficiência ou ausência de resposta celular por parte do hospedeiro (Weigle & Saraiva, 1996; Desjeux, 2004). A LCD, embora rara, não apresenta cura espontânea. Devido às frequentes recidivas, tornou-se um grave problema de Saúde Pública, juntamente com as demais formas clínicas de LT, pois além da ampla distribuição geográfica, o hospedeiro infectado pode apresentar lesões desfigurantes e incapacitantes, excluindo-o do seu meio de vida social, causando sua morbidade (Gontijo & Carvalho, 2003; Desjeux, 2004).

A LV ocorre pela infecção com *L. donovani* e *L. infantum* em países do Velho Mundo e por *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) nas Américas (WHO, 2010). Nos casos da LV clássica, a infecção crônica pode causar febre irregular de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema generalizado, debilidade progressiva, caquexia acentuada, dispnéia, cefaléia, dores musculares, perturbações digestivas e epistaxes, podendo levar ao óbito na ausência de tratamento. A intensidade das manifestações clínicas é variável e indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, embora cerca de 20% dos pacientes infectados desenvolvam a forma aguda da doença. Os sintomas são progressivos e as complicações decorrentes da evolução da infecção são responsáveis pelos óbitos (Badaró *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

Na LVC o hospedeiro infectado pode ser classificado de acordo com as manifestações clínicas que apresenta, podendo ser assintomáticos, quando não apresentam sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomáticos, quando há presença de linfadenopatia, leve perda

de peso e alterações dermatológicas; e sintomáticos, onde alguns ou todos os sinais comuns da doença são evidentes, como: alterações dermatológicas (alopecia, descamação, hiperqueratose, espessamento e nódulos intradérmicos sobre o focinho, as orelhas externas e coxins), bem como linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento acentuado, uveíte e ceratoconjuntivite (Ettinger & Feldman, 2004).

A susceptibilidade ou a resistência à LVC é dependente da resposta imune do cão após a infecção. Parâmetros como carga parasitária, expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ , imunodepressão de células específicas à *Leishmania* sp. (LT CD4 e LT CD8) ou a presença de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE específicos à *Leishmania* sp. encontram-se relacionados com a progressão clínica da doença. Em contrapartida, parâmetros relacionados ao aumento da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após o estímulo com antígenos de *Leishmania* sp., a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ou a proliferação de LT CD4, LT CD8 e LB encontram-se relacionados a resistência à LVC (Reis *et al.*, 2010).

Normalmente, cães assintomáticos apresentam resposta imune celular predominante, com a presença de elevados níveis de IL-2 e TNF- $\alpha$  e uma resposta mista Th1/Th2, com prevalência de Th1 e mediada principalmente por IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$ . Em contrapartida, animais sintomáticos apresentam uma resposta celular reduzida, com baixos níveis de IFN- $\gamma$  e uma resposta humoral específica elevada (Palatnik de Sousa, 2012).

#### **2.4. Diagnóstico das leishmanioses**

O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base em evidências clínicas e epidemiológicas, associados à realização de exames laboratoriais (Tesh, 1995).

O diagnóstico laboratorial da LT é realizado após a detecção das formas amastigotas do parasito, por meio de análises de materiais coletados em amostras de lesão, por raspagem ou aspirados, seguido pelas análises microscópicas e/ou cultura *in vitro* do material coletado (Reithinger *et al.*, 2007). O diagnóstico imunológico pode ser realizado através do teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM), o qual avalia a reação de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania* e por meio de testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT) (Marzochi & Marzochi, 1994; Tavares *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico da LV é dificultado pela semelhança dos sintomas clínicos com outras doenças, como a malária, tuberculose, doença de Chagas, toxoplasmose, dentre outras (Rees & Kager, 1987; Kemp, 1997). O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção de

anticorpos e/ou antígenos específicos aos parasitos em amostras de soros dos pacientes (Tavares *et al.*, 2003). Nestes casos, as técnicas de ELISA, IFAT, o Teste de Aglutinação Direta (DAT), Western-Blot e o Teste Imunocromatográfico (ICT) podem ser utilizados. Testes parasitológicos podem ser realizados através de aspirados do baço, linfonodos ou da medula óssea e, embora invasivos, mostram-se definitivos na identificação do parasito. Ensaio utilizando métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR *Real Time* também têm sido utilizados, embora necessitem de treinamento técnico especializado e têm custo elevado (Srivastava *et al.*, 2011; Sundar & Rai, 2002).

## 2.5. Tratamento da doença

O tratamento das leishmanioses é baseado inicialmente no uso dos antimoniais pentavalentes. O antimoniato de N-metil meglumina, produzido com o nome comercial de Glucantime<sup>®</sup> pela empresa Rhône Poulenc Rorer (França) e o estibogluconato de sódio, produzido com o nome comercial de Pentostan<sup>®</sup>, fabricado pela Wellcome Foundation (Inglaterra), são os fármacos mais utilizados, entretanto, causam vários efeitos colaterais e tóxicos aos pacientes (Figueiredo *et al.*, 1999; Balasegaram *et al.*, 2012). Doses diárias elevadas, necessárias ao curso do tratamento, podem causar fadiga, artralguas, mialgias, além de toxicidade renal, hepática e cardíaca. A dificuldade no transporte até os centros especializados para a administração dos medicamentos, o período relativamente longo de tratamento (20 a 40 dias) e a via de administração dolorosa, acabam por dificultar a adesão dos pacientes ao tratamento, podendo ocasionar a resistência dos parasitos aos produtos utilizados (Grogl *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2003).

A anfotericina B aparece como um tratamento alternativo para a LV, entretanto, causa nefrotoxicidade, hipocalcemia e calafrios durante a administração. Com o intuito de reduzir estes efeitos colaterais, a anfotericina B lipossomal (AmBisome<sup>TM</sup>) foi desenvolvida. A formulação é capaz de reduzir a toxicidade do produto, entretanto, é um medicamento de custo elevado para o agente financiador e que necessita ser administrado em ambiente hospitalar (Balasegaram *et al.*, 2012).

A miltefosina foi o primeiro medicamento oral utilizado no tratamento da LV, entretanto, pode causar distúrbios gastrointestinais, nefro e hepatotoxicidade e possível teratogenicidade, além de apresentar custo relativamente elevado (Balasegaram *et al.*, 2012).

A LC pode ser tratada com a aplicação local de pomadas à base de paramomicina ou de antimoniais pentavalentes. A opção de tratamento sistêmico é recomendada apenas em casos mais severos da doença devido aos efeitos colaterais gerados (WHO, 2010).

Desta forma, a busca por medidas de controle mais eficazes e profiláticas contra as leishmanioses tornam-se necessárias.

## **2.6. Medidas de controle e de prevenção contra as leishmanioses**

As medidas de controle e prevenção podem objetivar a interrupção do ciclo biológico do parasito, entretanto, o número elevado de espécies de *Leishmania*, o caráter zoonótico da doença e a manutenção do seu ciclo silvestre dificultam a adoção de medidas eficazes de controle (Tesh, 1995).

O controle do inseto vetor pode ser feito através da administração de inseticidas em ambientes domésticos, entretanto, a eficácia depende da classe de inseticida utilizada, da susceptibilidade do inseto vetor, do tipo de superfície ao qual é aplicado e da dosagem e método de aplicação. Para que esta medida de controle seja eficiente, é necessário que se tenha procedimentos operacionais padrão, gerenciamento, logística, supervisão, monitoramento e avaliação da eficácia em determinados períodos de tempo. Algumas classes de inseticidas utilizadas são os organoclorados, organofosfatados, carbamatos e piretróides, e estes devem ser trocados em determinados períodos de tempo para que se evite o aparecimento de insetos vetores resistentes (WHO, 2010). No Brasil, os produtos mais utilizados são as cipermitrinas e deltamitrinas, pertencentes à classe dos piretróides, os quais apresentam eficácia durante 3 meses após aplicação (Brasil, 2006).

No que se refere à LV, o cão, como um importante hospedeiro reservatório do parasito, representa uma considerável fonte de infecção para o vetor transmissor, agindo como um elo na manutenção da transmissão entre o mesmo e o homem. A eliminação de cães infectados constitui-se em uma medida adotada por órgãos de Saúde Pública, como uma tentativa de controle da disseminação do parasito (Tesh, 1995; Gontijo & Melo, 2004).

Em relação à LT, a eliminação de marsupiais e roedores silvestres não é uma medida executável ou ecologicamente correta. Além disso, existe a possibilidade de adaptação do parasito a outros reservatórios existentes em ambiente rural (Grimaldi & Tesh, 1993; Gramiccia & Gradoni, 2005).

O tratamento de casos humanos e a utilização de repelentes individuais também não apresentam impacto na redução da incidência das leishmanioses (Grimaldi & Tesh, 1993).

Devido a tais fatos, o desenvolvimento de novas medidas profiláticas, tais como as vacinas, torna-se uma alternativa atrativa e vem sendo pesquisada por diversos grupos de pesquisadores; entretanto, essa é uma tarefa complexa, embora seja considerada uma solução real para o controle efetivo da doença (Grimaldi & Tesh, 1993; Gonzalo *et al.*, 2002; Sukumaran *et al.*, 2003; Ramiro *et al.*, 2003; Desjeux, 2004).

## **2.7. Resposta imune na leishmaniose visceral murina**

Dentre os vários modelos experimentais animais, o modelo murino utilizando camundongos BALB/c e o modelo utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) são aqueles mais estudados para a investigação da eficácia de antígenos vacinais e de novos medicamentos para a LV. A ausência do locus *Sc11 Ia1* em camundongos BALB/c e C57BL/6 torna-os susceptíveis à infecção por *L. donovani*, sendo que a presença deste gene funcional em camundongos CBA confere a resistência à infecção contra o parasito (Bradley, 1974; Blackwell, 1996). Ao contrário da infecção por *L. major*, a resposta dicotômica de Th1/Th2 não é claramente observada na LV causada por *L. donovani* e *L. infantum*. A resposta protetora na LV murina depende, principalmente, da indução de uma resposta do tipo Th1, mediada pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12. A ativação da enzima iNOS pela indução de sua expressão por IFN- $\gamma$  leva à produção de NO nos macrófagos do baço e fígado, aos quais reduzem a multiplicação dos parasitos nestes órgãos (Green *et al.*, 1990; Blackwell, 1996).

Elevadas concentrações de citocinas TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4 e IL-13, normalmente encontram-se relacionadas à supressão da resposta Th1, direcionando para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (Wilson *et al.*, 2005), entretanto, baixas concentrações de IL-4 melhoram a proteção induzida por uma vacina, aumentando indiretamente a produção de IFN- $\gamma$  por LT CD8<sup>+</sup> e impedindo uma exacerbação da infecção por *L. donovani* (Stager *et al.*, 2003).

Em camundongos, a depuração de carga parasitária hepática ocorre cerca de duas semanas após a infecção, devido à formação de granulomas resultantes da interação de células T com células dendríticas e macrófagos parasitados por *Leishmania*. A eficácia de uma vacina ou a progressão da doença pode ser predita, baseando-se no grau de maturação dos granulomas hepáticos juntamente com a imunidade mediada por células nos animais desafiados (Murray *et al.*, 1992; Carrión *et al.*, 2006). Em contraste com a resposta ocorrida no fígado, o baço e a medula óssea agem como locais de persistência dos parasitos, resultando

em infecção crônica. A ausência de reação granulomatosa no baço e a produção reduzida de IL-12 pelos macrófagos locais direcionam para um aumento da carga parasitária neste órgão (Nieto *et al.*, 2011).

Apesar de modelos murinos para estudos vacinais na LV não se assemelham clinicamente com a LV humana, a utilização de inóculos contendo um elevado número de parasitos pode gerar alterações patológicas que aumentam a semelhança da doença entre os dois mamíferos (Carrión *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que camundongos BALB/c inoculados com uma cepa de *L. donovani* apresentaram manifestações clínicas como hepatoesplenomegalia, observada até seis meses após a infecção (Mazumder *et al.*, 2004; Bhowmick *et al.*, 2009). A progressão da doença neste modelo encontra-se associada a uma supressão da resposta Th1 devido à produção reduzida de IFN- $\gamma$  e IL-12 pelos esplenócitos dos animais, sendo também observado um aumento na produção de IL-4 e IL-10 por tais células. Camundongos infectados apresentaram níveis elevados de TGF- $\beta$  e níveis reduzidos de TNF- $\alpha$ , quatro meses após a infecção, apresentando também uma redução na produção de NO mediado por macrófagos, o que resultou na progressão da doença (Bhowmick *et al.*, 2009; Das & Ali, 2012).

## **2.8. Desenvolvimento de vacinas com antígenos definidos**

A pesquisa por vacinas contra as leishmanioses provém do fato de que indivíduos curados de lesões cutâneas causadas por espécies como *L. major* desenvolviam uma resposta imune protetora e tornavam-se protegidos contra reinfecções com a espécie infectante (Grimaldi & Tesh, 1993; Handman, 2001; Ghosh e Bandyopadhyay, 2003). Ao longo dos anos, diversas preparações foram propostas e estudos têm sido conduzidos com a finalidade de se desenvolver uma vacina que apresente resultados satisfatórios na proteção contra a infecção por *Leishmania*.

Vários antígenos, na sua forma nativa ou de proteínas recombinantes, foram e vêm sendo testados como candidatos a vacinas contra a infecção por algumas espécies de *Leishmania*. Nesse sentido, a glicoproteína de 63 kDa (gp63) foi eficaz na prevenção tanto da LC (Kahl *et al.*, 1990) quanto para LV murina (Bhowmick *et al.*, 2008). Sua forma recombinante (rgp63), quando utilizada em sistema de transporte lipossomal, foi também capaz de induzir proteção contra *L. major* (Jaafari *et al.*, 2006, 2007) e *L. donovani* (Mazumder *et al.*, 2011b). A proteína H2B, uma histona conservada em algumas espécies de *Leishmania*, conferiu proteção contra mais de uma espécie do parasito, fato considerado



importante no contexto do desenvolvimento de uma vacina multi-efetiva (Soto *et al.*, 1999; Chenik *et al.*, 2006). A proteína recombinante ORFF foi parcialmente protetora contra *L. donovani* (Tewary *et al.*, 2004b) e quando expressa na forma quimérica, conjugada à ubiquitina, apresentou uma melhor proteção contra a LV murina (Sharma & Madhubala, 2009). Nos estudos de vacinas, as proteínas dp72 (Jaffe *et al.*, 1990; Aguilar-Be *et al.*, 2005), proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs) (Iborra *et al.*, 2005; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2010), o fator de alongamento 2 de *Leishmania* (LelF-2) (Kushawaha *et al.*, 2011), as cisteinoproteases de amastigotas (Zadeh-Vakili *et al.*, 2004), F14 (Bhardwaj *et al.*, 2009), a proteína de superfície hidrofílica acilada B1 (HASP B1) (Stager *et al.*, 2000), o antígeno de superfície do parasito 2 (PSA-2) (Handman *et al.*, 1995; Sjölander *et al.*, 1998), a proteína de membrana kinetoplasto 11 (KMP-11) (Tolson *et al.*, 1994), a proteína A2 (Fernandes *et al.*, 2008), dentre outras, podem ser citadas.

A observação de que alguns indivíduos não infectados com *Leishmania*, mas expostos ao inseto vetor, apresentaram uma resposta protetora contra o parasito, conduziu à tentativas de vacinas utilizando proteínas salivares e/ou antígenos do intestino do vetor (Morris *et al.*, 2001). Recentemente, hamsters imunizados com LMJ 19, uma proteína de 11 kDa da saliva do *Lutzomyia longipalpis*, demonstraram proteção contra a LV (Gomes *et al.*, 2008).

A escolha de um antígeno para utilização em uma vacina recombinante é regida, principalmente, pela imunogenicidade da proteína e dos epitopos que a constituem, podendo servir ou não como fatores protetores ou, ao contrário, ser um mecanismo para evadir à resposta imune do hospedeiro. O desenvolvimento de vacinas recombinantes ou mesmo as vacinas de peptídeos sintéticos apresentam a vantagem de permitir a utilização de epitopos determinados e já caracterizados, uma vez que é possível modificar tais moléculas e evitar os inconvenientes de epitopos desnecessários para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (HANDMAN, 2001; SKEIKY *et al.*, 2002). A obtenção e purificação destes antígenos, bem como a caracterização da resposta imune induzida por eles, constitui objetivo de diversos estudos. Desta forma, antígenos recombinantes têm sido avaliados através de diferentes protocolos e preenchem parcialmente os requisitos para serem empregados como vacinas contra as leishmanioses.

## **2.9. Proteína amastigota-específica de *Leishmania*, LiHyp1**

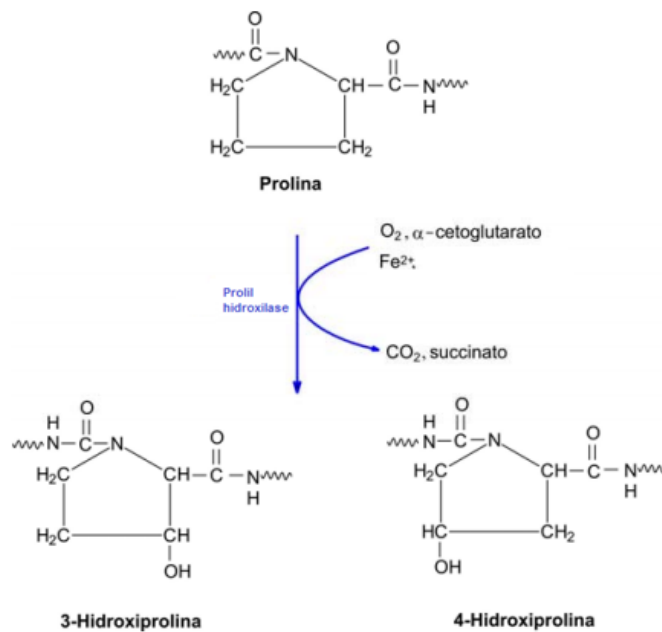
A proteína LiHyp1 (XP\_001468941.1) foi recentemente identificada por Coelho *et al.* (2012), como uma proteína amastigota-específica de *L. infantum*. Através da técnica de

imunoproteômica, a proteína LiHyp1 foi reconhecida por anticorpos presentes em soros de cães com LV sintomática e assintomática, demonstrando que tal proteína é expressa pelo parasito em animais doentes (Coelho *et al.*, 2012). O gene responsável pela codificação da proteína encontra-se no cromossomo 35 e apresenta 957 pares de bases (pb). A sequência de aminoácidos contém 318 resíduos linearizados, os quais conferem solubilidade à proteína (Figura 2). É uma proteína que não apresenta peptídeo sinal e que é expressa de forma que 73,9% é citoplasmática, 13,1% mitocondrial, 8,7% nuclear e 4,3% presente no sistema de vesículas secretoras. A proteína apresenta dois epitopos específicos para LT CD8<sup>+</sup> nas posições 166 e 256, respectivamente, e um epitopo específico para LB murino, na posição 262.

```
MSIVSRFIGGAKHLLKGGSMKYLAAGEPYCPFGEAFGLTILPEYILEDDASNL  
RKG YVDVYTRASDRIILNDGRFQLPPLPPASFMPLLERLEQDNVVPKNWLNN  
QTANLYEPGDFIRAHIDNLFVYDDIFAICSLGSNCLLRFVHVQNGEELDVMVP  
DRSVYIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSLVFRRSIMESDGGFRPVKTPFKEI  
MPYRATQILNALYSKQVGGVRVSVDDDFLESANIGAFDTSRWVKRLHPLRD  
WSLLRQLDEDEARVEELREKRFIDVDFSWRYRELRSSYKAMEESLVSPHVA  
HVTPQA
```

**Figura 2: Sequência de 318 aminoácidos da proteína LiHyp1.**

A proteína pertence à superfamília da  $\alpha$ -cetoglutarato-Fe<sup>+2</sup> oxigenase e apresenta duas subunidades alfa, com a presença de um grupo prolil 4-hidroxilase em cada porção C-terminal e de duas subunidades beta. A holoenzima é capaz de catalisar a seguinte reação de oxido-redução: prolina +  $\alpha$ -cetoglutarato + O<sub>2</sub>  $\leftrightarrow$  4-hidroxiprolina + succinato + CO<sub>2</sub> (Figura 3), além de participar de reações de transferência para reparo de DNA. A superfamília das oxigenases também inclui lisina hidrolase, isopenicilina sintases e AlkB.



**Figura 3: Conversão de prolina em hidroxiprolina:** A hidroxilação de resíduos específicos de prolina pela enzima prolil hidroxilase, ocorre na presença de  $\alpha$ -cetoglutarato,  $O_2$  e  $Fe^{+2}$ . A prolil hidroxilase quebra a molécula de oxigênio e enquanto um se une à prolina, o outro se incorpora em uma molécula de succinato, a qual é formada a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato. Ao final da reação, ocorre liberação de uma molécula de  $CO_2$ .

## 2.10. Saponina como adjuvante de resposta imune

Adjuvantes são substâncias capazes de iniciar uma resposta imune em relação a um dado antígeno ou auxiliar no desenvolvimento de uma resposta já existente (Claassen & Boersma, 1992). Vacinas de subunidades, muitas vezes, necessitam de auxílio para ativarem eficientemente o sistema imune inato e adaptativo, necessitando, desta forma, da associação de adjuvantes da resposta imune (Rueckert & Guzmán, 2012). Apresentam a capacidade de aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos, reduzir a quantidade de antígenos necessária nos protocolos de imunização e o número de doses administradas, induzir a um fenótipo de citocinas favorável para uma resposta imune benéfica ao hospedeiro, além de induzirem um prolongamento da resposta imune gerada (Voguel, 1998; Vitoriano-Souza *et al.*, 2012).

As saponinas são glicosídeos tensoativos que contém um núcleo hidrofóbico de estrutura triterpenóide com cadeias de carboidratos ligadas a ele (Rajput *et al.* 2007). São obtidas da casca da árvore *Quillaja saponária* e apresentam-se ideais na utilização para experimentos vacinais contra as leishmanioses (Liu *et al.*, 2002; Ravindran & Ali, 2004). A saponina apresenta uma formulação simples, um custo reduzido e é considerada segura para o uso veterinário (Vitoriano-Souza *et al.*, 2012), entretanto, seu uso não é permitido em

pacientes humanos por possuir alguns efeitos citotóxicos, principalmente hemolíticos, que podem ser reduzidos através de remoção química de porções glicídicas da molécula (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004).

Assim como outros adjuvantes, a saponina induz a um rápido recrutamento de células inflamatórias no local da administração da vacina e esta resposta pode ser mantida por dias após o estímulo. A presença de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias cria uma resposta imune balanceada, o que é necessário para a segurança e eficiência das vacinas (Taylor, 1995). Após administrada, a saponina induz a uma migração diferencial de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o sítio de aplicação, além de induzir a produção das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-4, demonstrando uma resposta mista entre as citocinas (Vitoriano-Souza *et al.*, 2012).

Além dos estudos em modelos murinos (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004; Aguilar-Be *et al.*, 2005; Paraguai de Sousa *et al.*, 2001), a utilização da saponina na proteção contra LVC foi também avaliada. Quando a proteína A2 foi administrada em cães juntamente com a saponina, pôde-se observar uma elevação nos níveis de IFN- $\gamma$  nos animais imunizados, que se apresentaram protegidos contra a infecção por *L. chagasi* (Fernandes *et al.*, 2008).

Desta forma, o presente trabalho objetivou a utilização da proteína recombinante LiHyp1 associada ao adjuvante saponina, a fim de testar seu efeito protetor contra a infecção de camundongos BALB/c com a espécie *L. infantum*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a antigenicidade da proteína LiHyp1, na sua forma recombinante, para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e verificar a imunogenicidade e proteção vacinal em camundongos BALB/c contra a infecção experimental com *L. infantum*.

#### 3.2 Objetivos específicos

⇒ Avaliar a sequência nucleotídica e de aminoácidos da proteína LiHyp1 (XP\_001468941.1), clonar a região codificadora da proteína de *L. infantum* e purificar a proteína recombinante rLiHyp1.

⇒ Avaliar a antigenicidade da proteína rLiHyp1 utilizando amostras de soros de cães com leishmaniose visceral sintomática e assintomática; de cães saudáveis, cães vacinados com a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> e cães com doença de Chagas.

⇒ Avaliar o perfil da resposta imune gerada em camundongos BALB/c imunizados com a proteína rLiHyp1 associada à saponina.

⇒ Avaliar o grau de proteção nos animais imunizados após a infecção com *L. infantum*, por meio da avaliação da carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodo drenante da pata infectada dos animais.

⇒ Avaliar o perfil da resposta celular e humoral geradas nos animais imunizados e desafiados com *L. infantum*.

⇒ Avaliar a eficácia da vacina rLiHyp1/saponina em induzir proteção contra a LV murina.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais de experimentação**

Camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas, foram utilizados. Os animais foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos em gaiolas apropriadas no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, UFMG, sob as devidas condições de manejo. Este projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (ANEXO 1).

### **4.2. Parasitos**

Parasitos da cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *Leishmania infantum* foram cultivados em meio de cultura Schneider's (Schneider's Insect Medium, Sigma) completo, o qual foi constituído pelo meio de Schneider's acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma), 200 unidades por mililitro (U/mL) de penicilina e 100 microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ) de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24 graus *Celsius* ( $^{\circ}\text{C}$ ) e repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias, período que os parasitos apresentavam-se em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido.

### **4.3. Amostras de soros**

Para a avaliação da antigenicidade da proteína rLiHyp1, amostras de soros de cães saudáveis (n=37), de cães com LV assintomática (n=19) e sintomática (n=15) PCR positivos, de cães experimentalmente infectados com *Trypanossoma cruzi* (n=18) e de cães saudáveis e vacinados com a vacina comercial Leish-Tec<sup>®</sup> (n=12), foram utilizadas. Todas as amostras foram gentilmente cedidas pelos professores Dr. Alexandre Barbosa dos Reis (Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, UFOP), Dra. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG) e Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (Departamento de Farmacologia e Bioquímica, UFPI).

### **4.4. Preparo do extrato antigênico de *Leishmania infantum* (SLALi)**

Para tal preparo, sendo decorridos sete dias de cultivo e constatada a viabilidade e a ausência de agentes contaminantes, as formas promastigotas em fase estacionária de

crescimento foram quantificadas em câmara de Newbauer, sendo ajustadas para uma concentração de  $2 \times 10^8$  promastigotas por mL.

Para o preparo do SLALi, 5 mL do meio contendo os parasitos foi centrifugado por 15 minutos (min), a  $5000 \times g$  e a  $4^\circ\text{C}$  (modelo Z300K - Hermle Labor Technik GmbH). O *pellet* foi lavado em 5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS 1x, o qual foi constituído por 8,0 gramas (g) de NaCl; 1,16 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,2 g de KCl, para 1 litro (L) de água destilada, em pH 7,4) e centrifugado a  $5.000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de PBS 1x, sendo submetido a um processo de choque térmico em nitrogênio líquido e banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ , por 6 ciclos. Em seguida, o lisado foi sonificado com seis ciclos de 30 segundos cada, com intervalos de 30 seg e amplitude de 38 MHz. O produto foi centrifugado a  $10.000 \times g$  durante 20 min e a fração antigênica, que corresponde ao SLA, foi coletada. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as amostras foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , até o momento do uso.

#### **4.5. Dosagem de proteínas**

Para realizar a dosagem de proteínas, o método de Bradford (Bradford, 1976) foi utilizado com algumas modificações. Inicialmente, 20 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) das amostras foram diluídas em 180  $\mu\text{L}$  de água destilada. Da diluição (1:10), foram adicionados 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$ , em duplicata, em placas de microtitulação de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 15, 10 e 5  $\mu\text{L}$  de água destilada, respectivamente, e, em todos eles, 180  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford, resultando em um volume final de reação de 200  $\mu\text{L}$ . O branco foi constituído por 20  $\mu\text{L}$  de água destilada e 180  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. Após 15 min de incubação da reação ao abrigo da luz, a intensidade de cor resultante foi determinada em leitor de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Concord, Canadá), em comprimento de onda de 600 nanômetros (nm). A concentração das proteínas foi determinada pela construção de uma curva padrão, a partir de uma solução de albumina bovina na concentração de 1 miligrama por mililitro (mg/mL).

#### **4.6. Análise por bioinformática**

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína LiHyp1 (XP\_001468941.1) foram obtidas no banco de dados do *National Center of Biotechnology*

*Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para analisar a presença da LiHyp1 no genoma de outros organismos, foi realizado um alinhamento através da ferramenta de bioinformática “BLAST”. Partindo da sequência gênica codificadora da proteína LiHyp1, um par de iniciadores foi desenhado para permitir a amplificação do gene de interesse, por meio da técnica de PCR. Os *Primers Forward* (5'-GAAGGATCCAGCATGTCTATCGTGTGCGAG-3') e *Reverse* (5'-GGAAAGCTTCGCTTGCGGCGTCACGTGAGC-3') (Eurofins mwg/operon) foram desenhados de acordo com a sequência da região ORF do DNA genômico de *L. infantum* (LinJ.35.1290).

## **4.7. Clonagem da proteína LiHyp1**

### **4.7.1. Extração do DNA genômico dos parasitos**

A cepa de *L. infantum* foi utilizada para a extração do DNA genômico e clonagem da proteína LiHyp1. Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas e  $1 \times 10^9$  parasitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. Os mesmos foram centrifugados (4.000x g por 20 min) e lavados em 3 mL de PBS 1x estéril, por duas vezes. O precipitado final foi ressuscitado em tampão Tris-EDTA (TE, o qual foi constituído por Tris-HCl 10 milimolar (mM) pH 7,0 e EDTA 1 mM) e novamente centrifugado. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em solução de lise (NaCl 150 mM, EDTA 250 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, sarcosil 0,5% e RNase 10 µg/mL) e incubado por 30 min e a 50°C, seguindo de imersão em banho de gelo por 10 min, sob agitação constante. A suspensão foi submetida a duas extrações com fenol : clorofórmio na proporção de 1:1 e, em seguida, tratada com clorofórmio : álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Para a precipitação do DNA, foi adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto (Merck) resfriado e 1 mL de NaCl 2 molar (M). A suspensão foi incubada a 4°C por 16 horas (h) e, posteriormente, recuperada por centrifugação (14.000x g por 30 min). O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de etanol 70% resfriado e acetato de sódio 0,3 M, recuperado por centrifugação nas mesmas condições anteriores e seco a 37°C. O DNA foi, finalmente, ressuscitado em 50 µL de tampão TE. Para verificar a qualidade e a quantidade de material obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% peso por volume (p/v) (Sigma) em tampão TAE (constituído de Tris 40mM, Ácido Acético 20mM e EDTA 1mM). O gel foi corrido a 80 volts (V) e corado com brometo de etídio (10 µg/mL), o qual se liga aos



fragmentos de DNA e emite fluorescência quando na presença de luz ultravioleta (UV). A dosagem foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e a amostra foi armazenada a -20°C.

#### 4.7.2. Amplificação da sequência gênica de LiHyp1 por PCR

A região codificadora da proteína LiHyp1 foi amplificada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares ao fragmento, que apresenta cerca de 960 pb.

Foram inseridos sítios de restrição no fragmento amplificado para as enzimas BamHI e HindIII. Para a reação de amplificação do gene de interesse, foram utilizados aproximadamente 100 nanogramas (ng) do DNA genômico, dNTPs 0,2 mM, BSA 0,1%, 0,5 µM de cada um dos iniciadores, tampão da *Taq* DNA Polimerase 1x (Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50 mM, Invitrogen); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), em volume de reação final de 50 µL. A termociclagem foi realizada em um ciclador térmico (Tonegen Palm, Tonederm), utilizando-se o seguinte programa:

Passo 1 – desnaturação a 95°C por 5 min.

Passo 2 – desnaturação a 95°C por 45 seg;  
anelamento a 52°C por 45 seg;  
extensão a 72°C por 90 seg. } 30 ciclos

Passo 3 – extensão final a 72°C por 5 min.

Após a reação, o produto da PCR foi aplicado em um gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e o fragmento de interesse foi identificado. O produto da PCR foi dosado a 260 nm no aparelho NanoDrop<sup>®</sup> 2000 (Thermo scientific).

#### 4.7.3. Ligação do gene da LiHyp1 em pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems

O produto da amplificação do gene LiHyp1 foi ligado ao vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T *Easy Vector Systems* (Promega). Para realizar a ligação do gene da LiHyp1 no vetor, foram utilizados 50 ng do vetor pGEM<sup>®</sup>-T *Easy Vector*, 3 U da enzima T4 DNA ligase, 50 ng do inserto do gene da LiHyp1, 5µL de tampão de rápida ligação 1x (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, e 5% de polietilenoglicol) e água ultra pura (Milli-Q) para completar o volume final de reação para 10 µl. A ligação do inserto ao vetor ocorreu à 4°C, por 16 h.

#### **4.7.4. Preparo e transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1blue**

Células competentes *E. coli* XL1blue foram preparadas através da técnica de cloreto de cálcio, segundo Sambrook *et al.* (1989). Para a transformação de bactérias *E. coli* XL1blue com o plasmídeo pGEM-LiHyp1, foram utilizados 2 µL da reação de ligação para cada 50 µL de células competentes. O material foi incubado em gelo durante 15 min, seguindo de choque térmico a 42°C por 90 seg e nova incubação em gelo por mais 5 min. Foram adicionados 250 µL de meio de cultura Luria Bertani (LB) estéril e procedeu-se à incubação a 37°C por 1 h e 30 min, em constante agitação. Placas constituídas por 20 mL de meio de cultura LB sólido autoclavado (5 gramas (g) de extrato de levedura, 10 g de triptona bacteriológica, 5 g de NaCl e 15 g de ágar bacteriológico, para cada 1 L de solução, em pH 7,4) suplementado com 20 µL de antibiótico ampicilina (100 mg/mL), 40 µL de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, 100 mM) e 20 µL de 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal, 50 mg/mL) foram utilizadas para plaquear 150 µL das bactérias transformadas. As placas foram incubadas a 37°C por período de 16 h.

#### **4.7.5. Extração do DNA plasmidial**

Após a incubação das placas, algumas colônias brancas resistentes (possíveis clones positivos) foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. As colônias selecionadas foram colocadas individualmente em tubos estéreis contendo 5 mL de meio de cultura LB e 5 µL de ampicilina (100 mg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C por 16 h, em constante agitação. As células crescidas tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos utilizando o kit *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). A digestão do plasmídeo foi realizada utilizando-se 5 µg do mesmo, 15 U das endonucleases de restrição HindIII e BamHI (Promega), tampão específico para as endonucleases (Promega) e água Milli-Q estéril. A digestão ocorreu a 37°C durante 2 h e, em seguida, o produto foi aplicado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. As respectivas bandas obtidas foram excisadas e purificadas com o kit *Invisorb<sup>®</sup> Fragment CleanUp* (Invitek) para nova ligação do inserto em plasmídeo de expressão pET21a (Novagen).

#### **4.7.6. Sequenciamento do gene da LiHyp1**

Após a clonagem da LiHyp1 no vetor pGEM-T<sup>®</sup>, uma amostra do plasmídeo purificado foi separada para a realização do sequenciamento automático de DNA de alta qualidade e para a confirmação das identidades do inserto (LiHyp1) e do vetor (pGEM-T). O

sistema utilizado para o sequenciamento foi o *MegaBACE 1000 DNA Sequencing System* (GE Healthcare), no qual as reações de sequenciamento são feitas utilizando o *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit Cycle Sequencing* e as corridas são realizadas utilizando o *MegaBACE™ Long Read Matrix*. As sequências foram analisadas pelo software *Sequence Analyser versão 3.0*. O sequenciamento foi realizado e analisado pelo Núcleo de Análise de Genoma (NAGE), do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG.

#### 4.7.7. Clonagem do gene da LiHyp1 em vetor de expressão pET21a

O inserto da LiHyp1, digerido e purificado do vetor pGEM, foi armazenado a -20°C para realização de uma nova ligação em vetor de expressão. O plasmídeo pET21a (Novagen) foi digerido através de uma reação que continha 15 U das endonucleases de restrição HindIII e BamHI (Promega), tampão específico para as endonucleases, 5 µg do plasmídeo pET21a (Novagen) e água Milli-Q estéril. A reação ocorreu a 37°C por 2 h. Para a realização da nova ligação, foi feita uma reação contendo aproximadamente 100 ng do plasmídeo pET21a, 141 ng do gene da LiHyp1, 1 U da enzima de ligação T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão 1x (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% p/v polietilenoglicol). A concentração de DNA do inserto utilizada na reação de ligação foi calculada através da seguinte fórmula, utilizando-se uma razão de 8x1:

$$\text{ng de inserto} = \frac{(\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em Kb}) \times 8}{(\text{tamanho do vetor em Kb})} \quad 1$$

$$\text{ng de inserto} = \frac{100\text{ng do pET21a} \times 0,960\text{Kb da LiHyp1} \times 8}{5,443\text{Kb do pET21a}} \quad 1$$

$$\text{ng de inserto} = 141 \text{ ng de LiHyp1}$$

A reação de ligação ocorreu a 4°C por 16h, levando à formação do vetor de expressão pET21a-LiHyp1. Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas seguindo o mesmo protocolo citado para a transformação das células XL1blue por pGEM-LiHyp1 e plaqueadas em meio de cultura LB sólido acrescido com ampicilina (100 µg/mL). Algumas colônias crescidas na placa foram selecionadas e replicadas individualmente em 5 mL de meio de cultura LB com ampicilina (100 µg/mL). Alíquotas das bactérias transformadas foram

estocadas em glicerol 16% a -80°C. Para confirmar a presença do inserto, o plasmídeo foi extraído pelo método de lise alcalina e o DNA das colônias recombinantes foi submetido a uma nova digestão enzimática com as endonucleases HindIII e BamHI, sendo que um novo gel de agarose a 1% foi realizado para a confirmação do inserto.

#### **4.8. Expressão e purificação da proteína recombinante LiHyp1 (rLiHyp1)**

Para verificar a cinética de expressão da proteína rLiHyp1, foi realizado um experimento piloto utilizando 100 mL de cultura de bactérias BL21(DE3) transformadas. Para tal, foi preparado um pré-inóculo de um clone positivo em 5 mL de meio de cultura LB e ampicilina (100 µg/mL), o qual foi incubado a 37°C por 16 h, em constante agitação. Após, 100 mL de meio de cultura LB, acrescido de glicose (2 gramas por litro (g/L)) e ampicilina (100 µg/mL), foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo. A incubação procedeu-se a 37°C, sob constante agitação, até as células atingirem a densidade óptica (DO) de aproximadamente 0,5, em comprimento de onda de 600 nm, correspondente a cerca de  $2 \times 10^8$  células por mL. Neste ponto, uma alíquota de 10 mL, correspondente ao tempo 0 (T0), foi retirada e, em seguida, foram adicionados 0,5 mM de IPTG para a indução da expressão das proteínas. As células foram novamente incubadas a 37°C, em constante agitação, sendo retiradas alíquotas de 10 mL da cultura em 1, 2, 3 e 4 h, após a indução. As células foram recuperadas por centrifugação (10.000x g por 15 min) e ressuspensas em 200 µL de solução de lise (100 µL de Tris 1 M, pH 7,5; 200 µL de BugBuster 10X *Protein Extraction Reagent* – MERCK; 0,14 µL de β-mercaptoetanol – Sigma; 6 µL de lisozima 100 mg/mL; 4 µL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 0,5 M e 2 mL de água deionizada). Para a lise celular, as bactérias foram incubadas durante 5 min em temperatura ambiente, sob leve agitação. Após, foi adicionado 6 µL de MgSO<sub>4</sub> 1M e 0,6 µL de DNase em cada amostra e incubou-se novamente por 5 min em agitação. As amostras foram centrifugadas a 13.000x g durante 20 min e o sobrenadante, correspondente à fração proteica solúvel, foi armazenado. O precipitado, correspondente à fração insolúvel, foi lavado com 0,5 ml de uma solução de lavagem (Tris 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; β-mercaptoetanol 1 mM e Tween-20 1% v/v) e centrifugado a 14.000x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 100 µL de uma solução solubilizadora (Uréia 8 M; Tris 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM e β-mercaptoetanol 1 mM), que contém a fração proteica insolúvel. Ambas as frações, solúvel e insolúvel, foram dosadas por Bradford e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), na concentração de 12%.

A proteína rLiHyp1 foi melhor expressa após a indução das bactérias com 0,5 mM de IPTG pelo período de 4 h, em temperatura de 37°C. Para a purificação em larga escala, a expressão da proteína foi realizada nas mesmas condições, entretanto, em volume de 1 L de cultura. Para a lise, foram utilizados 40 mL de um tampão contendo solução fosfato de sódio, pH 7,4 (77,4 mL de uma solução fosfato dibásico 1 M em 22,6 mL de uma solução fosfato monobásico 1 M) 50 mM, NaCl 500 mM e uréia 8 M. O precipitado permaneceu em agitação constante com o tampão até completa homogeneização. Em seguida, foi passado no homogeneizador EmulsiFlex<sup>®</sup>-C3 por 5 passagens e centrifugado a 13.000x g por 20 min. O extrato proteico solúvel foi recuperado e centrifugado novamente a 13.000x g por mais 20 min e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45 µm para purificação por afinidade em coluna empacotada com níquel (HisTrap HP 5mL – *GE Healthcare Life Sciences*), através do sistema FPLC (cromatografia líquida de rápida performance). Para a purificação, foi utilizado o aparelho AKTAprime *Chromatography System* (*GE Healthcare Life Sciences*) e os tampões de ligação (solução fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM, uréia 8 M e imidazol 40 mM) e de eluição (solução fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM, uréia 8 M e imidazol 500 mM). Após, a proteína rLiHyp1 foi passada em uma coluna de agarose-polimixina (Sigma) para a remoção de resíduos de endotoxinas bacterianas.

A proteína purificada foi dosada pelo método de Bradford e submetida a uma eletroforese em SDS-PAGE 12%. O peso molecular da proteína, de aproximadamente 36.6 kDa, foi confirmado pela comparação com proteínas presentes no padrão de baixo peso molecular (*Low molecular weight calibration kit for electrophoresis, Pharmacia Biotech*). A proteína rLiHyp1 foi alíquotada e armazenada a -80°C, até o momento do uso.

#### **4.9. Eletroforese em gel de SDS-PAGE**

A eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada pelo sistema de Minigel da BioRad (Hercules, CA, USA) para géis de poli-acrilamida descontínuos, segundo Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8% p/v, diluída em uma concentração final de 12% v/v, sendo acrescido de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS a 10% p/v. Para o gel de concentração, a solução estoque foi diluída a 4% v/v em Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS a 0,1% p/v. A polimerização dos géis ocorreu na presença de persulfato de amônio (PSA) a 10% p/v e de N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED; Sigma) a 1:2.000 v/v.

As amostras de SLALi e da rLiHyp1 foram diluídas (na proporção de 1:1) em tampão de amostra em condições redutoras (Tris-HCl 0,7 M, pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25%, glicerol a 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol a 2,5% e SDS a 4%) e não-redutoras (Tris-HCl 0,7 M, pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25% e glicerol 10%), respectivamente. Após a diluição, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 5 min e aplicadas no gel em uma concentração de 20  $\mu$ g de SLALi e 10  $\mu$ g de rLiHyp1. A corrida eletroforética foi realizada por 2 h a 90 V em tampão de corrida TBE1x (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). O gel foi corado pelo azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R250 em etanol a 50% e ácido fosfórico a 10%) e descorado por lavagens sucessivas com solução descorante (ácido acético 10%, metanol 50% e água destilada 40%).

#### 4.10. Western-blot

Os experimentos de Western-Blot foram realizados como descrito por Towbin *et al.* (1979), com algumas modificações. Após o preparo do gel SDS-PAGE a 12% (gel de separação) e 4% (gel de concentração), 20  $\mu$ g da proteína rLiHyp1 foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi realizada a 90 V por 2 h e 30 min, em tampão de corrida TBE1x. A proteína foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose (NC, poro de 0,1 mm, Millipore), utilizando-se o aparelho de eletro-transferência *Mini Transblot* (BioRad), em tampão de transferência (glicina 0,192 M, tris 0,025 M e metanol 20%). A transferência foi realizada a 100 V por 2 h. As membranas foram coradas com Ponceau-S (Merck) a 0,2%, embebido em ácido acético a 10%, para verificação da qualidade da transferência, sendo então descoradas com água destilada.

As membranas foram então bloqueadas com PBS 1x, pH 7,4 e caseína 5%, por 16 h, sob agitação constante, sendo, posteriormente, lavadas com solução de lavagem (PBS 1x, pH 7,4 e Tween 20 a 0,05% v/v) por 2 vezes, durante 10 min cada. A membrana foi incubada individualmente com um *pool de* soros de cães com LV assintomática e com um *pool de* soros de cães saudáveis (diluídos em solução de lavagem na proporção de 1:100), sendo mantida sob constante agitação durante 2 h. Em seguida, 2 lavagens foram efetuadas durante 10 min cada e procedeu-se a uma nova incubação com anticorpo anti-IgG de cão conjugado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído em solução de lavagem (1:5.000), por 2 h e sob agitação constante. Após 2 lavagens com a solução de lavagem e 2 lavagens com PBS 1x, o substrato (cloronaftol 25 mg, metanol 8,5%, diaminobenzidina 50 mg e 20  $\mu$ L de peróxido de

hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 20 vol, para 100 mL de PBS 1x) foi acrescentado para a revelação da reação. A reação foi interrompida com água destilada e seca em papel de filtro.

#### **4.11. Avaliação da antigenicidade da proteína rLiHyp1**

Para avaliar a antigenicidade da proteína rLiHyp1, curvas de titulação foram realizadas para determinar a melhor concentração da proteína recombinante LiHyp1 ou do SLALi, bem como a melhor diluição do conjugado para serem utilizados nos testes sorológicos.

Placas de microtitulação para ELISA de 96 poços (Falcon-BD) foram sensibilizadas com 1 µg de rLiHyp1 por poço, diluído em 100 µL de tampão (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) e incubadas durante 18 h a 4°C. O bloqueio foi realizado com 2% de caseína diluída em solução de lavagem, por 2 h e a 37°C. Após 3 lavagens, as placas foram incubadas com 100 µL dos soros individuais (em duplicata) a uma diluição de 1:200 em tampão de incubação (TI - solução de lavagem acrescida de 0,05% de caseína). As amostras permaneceram em incubação durante 1 h a 37°C e então as placas foram lavadas novamente por 4 vezes. O anticorpo anti IgG de cão (Sigma) conjugado à peroxidase foi utilizado em uma diluição de 1:10.000 em TI e aplicado 100 µL por poço, permanecendo em incubação a 37°C por 1 h. As placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 µL da solução reveladora (10 mL de tampão citrato-fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0); 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 30 min e ao abrigo da luz. A reação de revelação foi interrompida adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 3 M e a leitura ocorreu ao comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro. Controles positivos e negativos de áreas endêmicas para leishmaniose foram utilizados em todas as placas.

#### **4.12. Imunização de camundongos BALB/c**

Grupos de camundongos BALB/c fêmeas (n=8, por grupo) foram imunizados pela via subcutânea no coxim plantar esquerdo, com três doses em intervalos de 15 dias entre as mesmas. Os animais foram divididos em três grupos: o primeiro grupo foi imunizado com 25 µg da proteína rLiHyp1 associada à 25 µg do adjuvante saponina (*Quillaja saponaria bark saponin*, Sigma); o segundo grupo foi imunizado com 25 µg de saponina e o terceiro grupo foi inoculado com salina, em volume idêntico ao inoculado nos demais grupos. As concentrações do imunógeno e do adjuvante foram determinadas com base em experimentos vacinais padronizados por nosso grupo de pesquisas.

#### 4.13. Infecção desafio

A infecção desafio foi realizada 30 dias após a última dose da vacina, quando também foi realizada a eutanásia de 4 animais de cada grupo para realização de experimentos de imunogenicidade. Para a infecção,  $1 \times 10^7$  promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* foram inoculadas em 20  $\mu$ L de PBS 1x, no coxim plantar direito de cada animal. Os camundongos foram monitorados durante 60 dias após o desafio, como padronizado por Oliveira *et al.* (2012). Após este período foi realizada a eutanásia dos animais para os experimentos de imunogenicidade e determinação da carga parasitária.

#### 4.14. Isolamento e cultura dos esplenócitos

Camundongos apenas imunizados e camundongos imunizados e desafiados foram submetidos à eutanásia para a coleta do baço e isolamento, cultura e estimulação dos esplenócitos. Para tal, 1 dia antes e 60 dias após a infecção desafio, animais (n=4, por grupo) foram eutanasiados e o baço foi coletado para o cultivo das células esplênicas e posterior análise de citocinas presentes nos sobrenadantes das culturas das células estimuladas. Os órgãos foram macerados em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) e centrifugados a 1.200x g por 10 min. As células esplênicas, presentes no precipitado, foram ressuspensas em 3 mL de tampão de lise de hemácias (Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 e NH<sub>4</sub>Cl 144 mM) e incubadas durante 4 min. Em seguida, a reação de lise foi parada pela adição de 7 mL de meio de cultura RPMI 1640 incompleto e as células foram centrifugadas novamente a 1.200x g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 1 mL de RPMI 1640 completo, o qual foi composto por 10% de SFB inativado, 4,5 g/L de glicose, 20  $\mu$ g/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina, pH 7,4. Os esplenócitos foram ajustados para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células por mL. O cultivo dos esplenócitos foi realizado em placas de 24 poços (Nunclon, Nunc), sendo que  $5 \times 10^6$  células/mL foram incubadas apenas em meio de cultura RPMI 1640 completo (controle negativo), ou incubadas em meio de cultura RPMI 1640 completo e estimulados separadamente com rLiHyp1 (20  $\mu$ g/mL), SLALi (25  $\mu$ g/mL) ou concanavalina A (ConA, 5  $\mu$ g/mL), essa, como controle de viabilidade celular. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h a 37°C e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas.

Para avaliar a participação de LTCD4<sup>+</sup>, LTCD8<sup>+</sup> e a dependência de IL-12 na produção de IFN- $\gamma$ , os esplenócitos dos animais imunizados e desafiados foram estimulados



com o SLALi e incubados na presença de 5 µg/mL dos anticorpos monoclonais anti-CD4<sup>+</sup> (GK 1.5), anti-CD8<sup>+</sup> (53-6.7) ou anti-IL12 (C17.8) (todos da Pharmingen, San Diego, CA, USA).

#### **4.15. Dosagem das citocinas**

As citocinas IFN-γ, IL-12, GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos), IL-4 e IL-10 foram avaliadas. A dosagem das citocinas foi realizada através da técnica de ELISA de captura, utilizando-se os kits *BD OptEIA TM Set Mouse IFN-γ(AN-18)*, *IL-12* e *GM-CSF*, cat. 2661KI, 2620KI e 2760KI, respectivamente (Pharmingen, San Diego, CA, USA), e *Murine IL-4 e IL-10 ELISA development kits*, cat. 900-K49 e 900-K53, respectivamente (PeproTech<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções dos fabricantes.

#### **4.16. Avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a**

O perfil da resposta humoral nos animais apenas imunizados e nos animais imunizados e desafiados foi avaliado através da produção de anticorpos IgG total e das sub-classes IgG1 e IgG2a, específicos à proteína rLiHyp1 ou ao SLALi. Amostras de sangue dos animais foram retiradas nas mesmas datas de quando da eutanásia, por meio do plexo braquial, sendo incubadas por 10 min a 37°C e centrifugadas a 5.000x g por 10 min, para a obtenção de soro.

Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de 96 poços (Falcon-BD), utilizando-se como antígeno sensibilizador a proteína rLiHyp1 ou o SLALi. Curvas de titulação foram realizadas para se determinar a melhor concentração possível dos antígenos a serem utilizados na sensibilização das placas e dos soros testados. Dessa forma, foi determinada a concentração de 1 µg por poço de rLiHyp1 ou 2 µg de SLALi, e de 1:50 para a diluição dos soros de camundongos. As placas foram sensibilizadas com os antígenos em 100 µL de tampão, pH 9,6 (por poço) e incubadas a 4°C por 16 h. Em seguida, foram efetuadas 3 lavagens e a solução bloqueadora (PBS 1x, pH 7,4 e caseína 2%) foi acrescentada, incubando-se por 2 h a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas por 3 vezes e as amostras de soro foram acrescentadas na diluição de 1:50, em duplicata, diluídas em tampão de incubação, sendo mantidas em repouso por 1 h a 37°C. Para a determinação das absorvâncias de IgG1 e IgG2a, as placas foram lavadas 4 vezes e os conjugados anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo ligado à peroxidase (Sigma) foram acrescentados, na diluição de 1:5.000, diluídos em TI. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após 5 lavagens, a solução

reveladora foi acrescentada e as placas foram incubadas por 30 min, ao abrigo de luz. A reação foi interrompida pela adição de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA, com comprimento de onda de 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados nas placas.

#### **4.17. Avaliação da carga parasitária**

Para realizar a quantificação de parasitos, o baço, fígado, a medula óssea e linfonodo drenante da pata infectada foram removidos 60 dias após a infecção. Os órgãos foram macerados em meio de Schneider's incompleto (na proporção de 1 mL de meio de cultura a cada 100 mg de tecido) e diluições seriadas foram realizadas utilizando meio de Schneider's completo, partindo de uma diluição de 10<sup>-1</sup> até uma diluição máxima de 10<sup>-12</sup>. Placas de cultura celular de 96 poços (Nunc) foram incubadas em estufa a 24°C durante 7 dias e o resultado foi representado pela maior diluição na qual os parasitos puderam ser visualizados utilizando um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss), de acordo com Coelho *et al.* (2003).

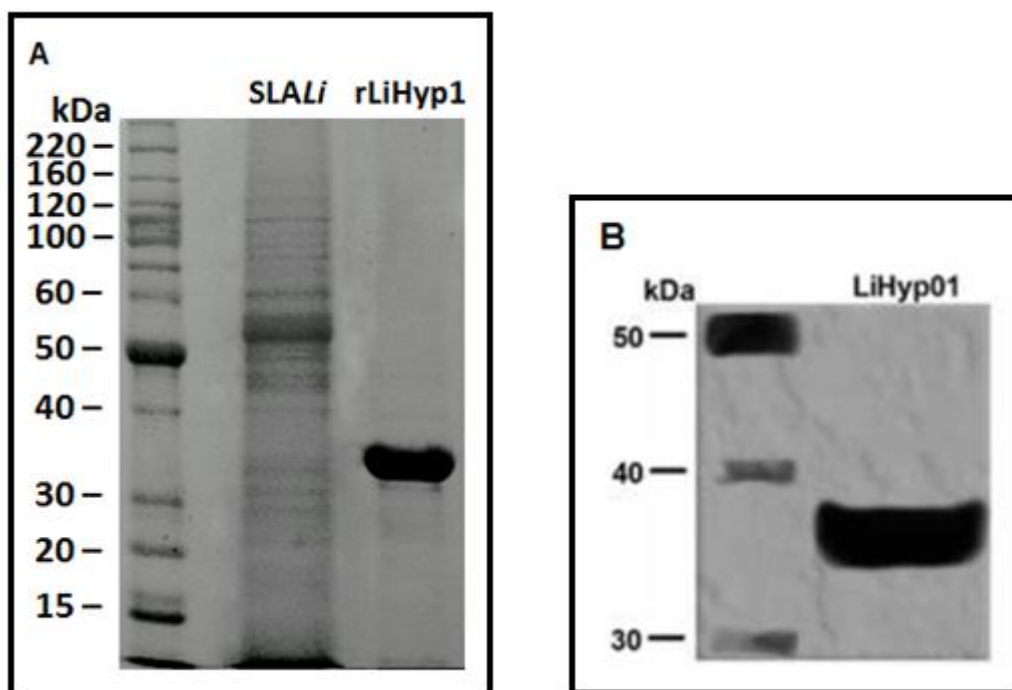
#### **4.18. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no *software* Graph Pad Prism (versão 5.0 para Windows). Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram preparadas para análise dos dados de antigenicidade. Os testes de análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni ou pelo teste t de Student não-pareado, foram utilizados para comparação múltipla entre os grupos experimentais, na avaliação da imunogenicidade antes e após o desafio. Análises estatísticas utilizando o ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, para múltipla comparação entre os grupos, foram também realizadas para antigenicidade. Diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Antigenicidade da proteína amastigota-específica inédita de *L. infantum*, LiHyp1.

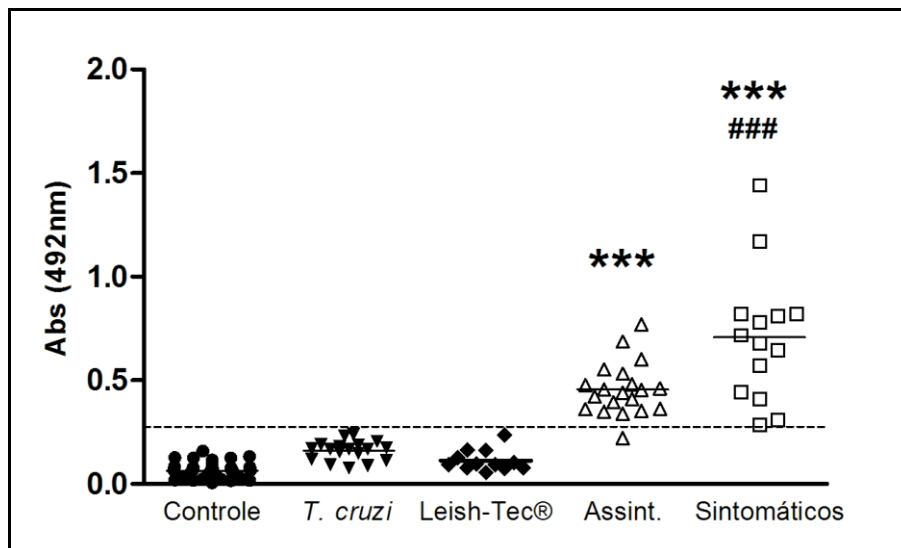
A proteína recombinante LiHyp1 foi clonada e purificada por cromatografia de afinidade (Figura 4A). Para avaliar a antigenicidade da proteína rLiHyp1 no sorodiagnóstico da LVC, 19 amostras de soros de cães com LV assintomática e 15 amostras de soros de cães com LV sintomática, todas provenientes de animais naturalmente infectados por *L. infantum*, foram utilizadas. Inicialmente, verificou-se que um *pool* contendo alíquotas dessas amostras foi capaz de reconhecer a proteína rLiHyp1 em experimentos de Western-blot, como pode ser observado na figura 4B.



**Figura 4: Antigenicidade da proteína rLiHyp1.** Vinte microgramas de SLA de *L. infantum* e 10  $\mu$ g da proteína recombinante LiHyp1 purificada, foram submetidos à eletroforese em um gel desnaturante de SDS-PAGE a 12%, corado com Coomassie brilhante blue G-250 (A). A proteína rLiHyp1 foi submetida a um Western-blot, sendo reconhecida por anticorpos presentes em um *pool* de soros de cães com LV assintomática (B).

Quando os soros foram testados individualmente em ensaios de ELISA, observou-se que a proteína rLiHyp1 foi reconhecida por anticorpos presentes em todas as amostras de soros de cães com LV sintomática e 18 das 19 amostras de animais com LV assintomática. Quando as amostras de soros de cães saudáveis, de cães experimentalmente infectados com *T. cruzi* e de cães vacinados com a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> foram testadas, houve uma reatividade

abaixo do ponto de corte dos anticorpos de tais amostras frente à proteína recombinante (Figura 5).



**Figura 5: Avaliação da proteína rLiHyp1 no sorodiagnóstico da LVC.** Ensaios de ELISA foram realizados com a proteína rLiHyp1 (1 µg/poço) frente às amostras de soros de cães saudáveis (n=37) (grupo controle), cães infectados com *T. cruzi* (n=18), cães vacinados com Leish-Tec® (n=12), e cães com LV assintomática (n=19) e sintomática (n=15). Os valores da densidade óptica (DO) de cada soro individual são mostrados. As linhas horizontais representam a média de cada grupo. O valor de corte (linha pontilhada) indica a discriminação positiva e negativa entre as amostras, por uma análise de curva ROC. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de LV e o grupo controle, e de soros de LV sintomática versus LV assintomática foram observadas (\*\*\*) e ###, respectivamente,  $P < 0,0001$ ).

As análises realizadas para avaliação da sensibilidade e especificidade da proteína rLiHyp1 demonstraram resultados bastante satisfatórios, uma vez que quando o grupo LVC sintomático foi comparado aos grupos controle, Leish-Tec® e *T. cruzi*, a sensibilidade e a especificidade do teste foram de 100%, com um intervalo de confiança de 95% (Tabela 1). Quando o grupo LVC assintomático foi comparado aos grupos controle, Leish-Tec® e *T. cruzi*, a sensibilidade do teste foi 95% e a especificidade foi de 100%, demonstrando que a proteína rLiHyp1 apresenta um potencial para ser utilizada futuramente como novo antígeno para o sorodiagnóstico da LVC.

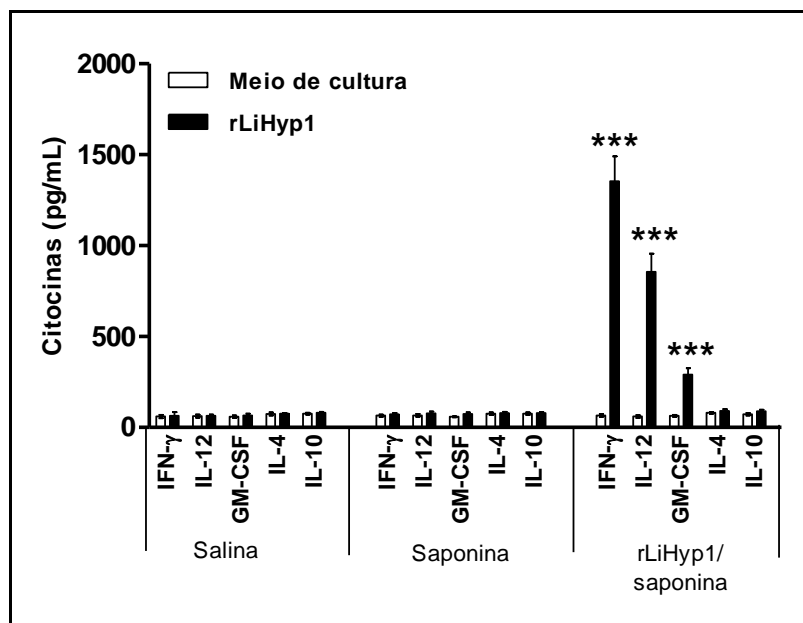
Controle x Sintomáticos				Controle x Assintomáticos			
Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%
100	76,8 - 100	100	90,5 - 100	95	75,1 - 99,9	100	90,5 - 100
Leish-Tec® x Sintomáticos				Leish-Tec® x Assintomáticos			
Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%
100	76,8 - 100	100	73,5 - 100	95	75,1 - 99,9	100	73,5 - 100
<i>T. cruzi</i> x Sintomáticos				<i>T. cruzi</i> x Assintomáticos			
Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	Sen (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%
100	76,8 - 100	100	81,4 - 100	95	75,1 - 99,9	100	81,5 - 100

**Tabela 1. Sensibilidade e especificidade da proteína rLiHyp1 para o sorodiagnóstico da LVC.**

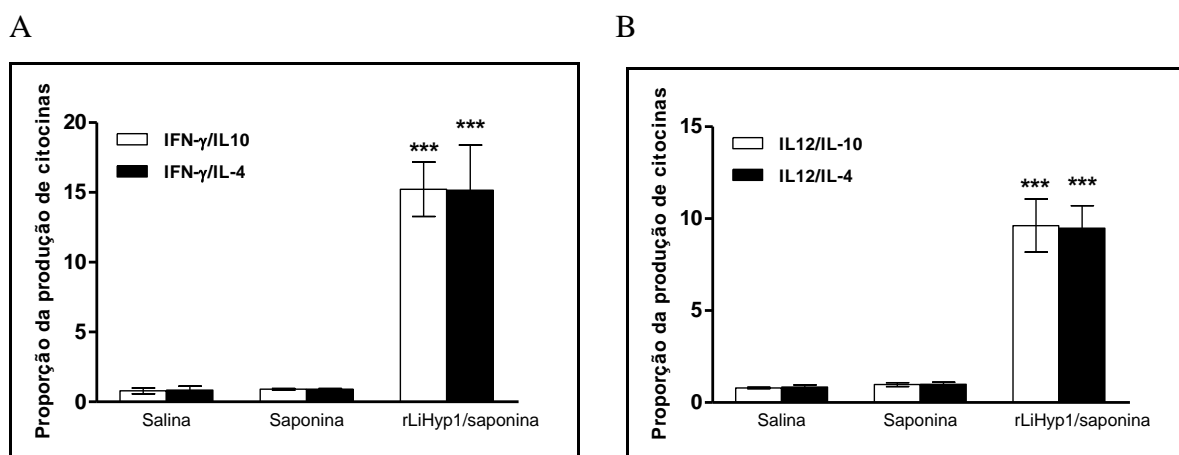
## 5.2. Imunogenicidade da proteína rLiHyp1 em camundongos BALB/c

A imunogenicidade da proteína rLiHyp1 foi avaliada através da dosagem de citocinas produzidas por esplenócitos estimulados de camundongos BALB/c 30 dias após a última dose administrada da proteína recombinante na presença do adjuvante saponina. Após o estímulo *in vitro* com a proteína rLiHyp1, observou-se a produção de níveis significativamente elevados de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF no grupo dos animais vacinados, em relação aos níveis produzidos pelos esplenócitos dos grupos controle, constituídos por animais que receberam o adjuvante sozinho (saponina) ou salina (Figura 6). Nenhum aumento na produção de IL-4 e IL-10 foi observado em qualquer dos grupos avaliados, após a estimulação com a proteína rLiHyp1.

Na análise da proporção entre IFN- $\gamma$ /IL-4 e IFN- $\gamma$ /IL-10 foi observado um predomínio de IFN- $\gamma$  produzido pelos esplenócitos do grupo vacinado com rLiHyp1/saponina, quando comparado aos grupos controle (Figura 7A). O mesmo perfil foi observado quando a proporção entre IL-12/IL-4 e IL-12/IL-10 foi realizada (Figura 7B).

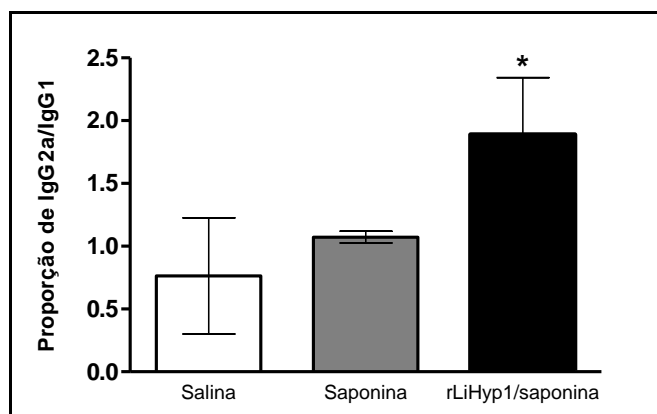


**Figura 6: Produção de citocinas nos grupos de camundongos BALB/c controle e imunizados com a proteína rLiHyp1 e saponina.** Esplenócitos dos animais foram obtidos 30 dias após a imunização dos animais. As células foram não estimuladas (meio) ou estimuladas com rLiHyp1 (20 µg/mL) por 48 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de IFN-γ, IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram dosados por ELISA de captura dos sobrenadantes da cultura. Cada barra representa a média ± desvio-padrão obtidos de 4 animais por grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IFN-γ, IL-12 e GM-CSF entre o grupo rLiHyp1/saponina e os grupos controle (salina e saponina) (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).



**Figura 7: Análise da proporção na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias.** A produção elevada de IFN-γ foi estatisticamente significativa quando comparada à produção de IL-10 e IL-4 no grupo rLiHyp1/saponina (A). Da mesma forma, a produção de IL-12 foi maior do que a produção de IL-10 e IL-4 no grupo rLiHyp1/saponina (B) (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ).

Na avaliação da produção de anticorpos (Figura 8), pôde-se verificar uma maior proporção na produção de IgG2a específica à proteína rLiHyp1 em relação à produção de anticorpos IgG1 anti-LiHyp1 nos animais imunizados, pressupondo a ocorrência de uma resposta Th1 em tais animais.

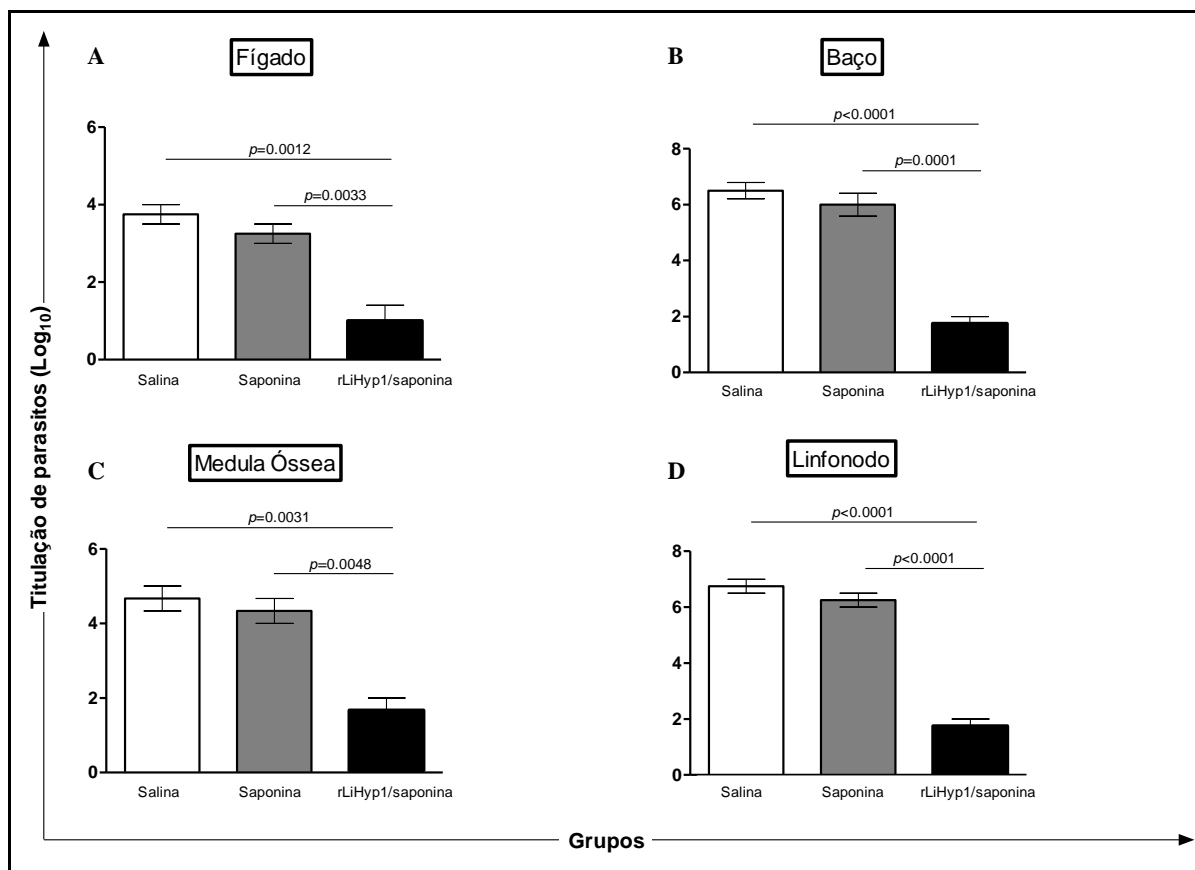


**Figura 8: Análise da proporção da produção de imunoglobulinas do isotipo G2a/G1.** A produção elevada de IgG2a frente a IgG1 no grupo rLiHyp1/saponina foi estatisticamente significativa quando comparada aos grupos controle (\* $P < 0,005$ ).

### 5.3. Eficácia protetora da proteína rLiHyp1 em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*

A avaliação da eficácia protetora de rLiHyp1/saponina contra a infecção experimental com promastigotas em fase estacionária de *L. infantum* foi realizada através de quantificação da carga parasitária no fígado, baço, medula óssea e linfonodo drenante da pata infectada, 10 semanas após o desafio.

Reduções significativas na carga parasitária nos diferentes órgãos dos animais vacinados foram observadas quando comparadas aos animais dos grupos controle (Figura 9). Camundongos vacinados com a rLiHyp1/saponina, em comparação com os grupos salina e saponina, mostraram respectivamente, uma redução de 73% e 69% no número de parasitos no fígado (Figura 9A), uma redução de 73% e 70% no número de parasitos no baço (Figura 9B), uma redução de 67% e 67% na medula óssea (Figura 9C) e uma redução de 74% e 72% no linfonodo drenante (Figura 9D).

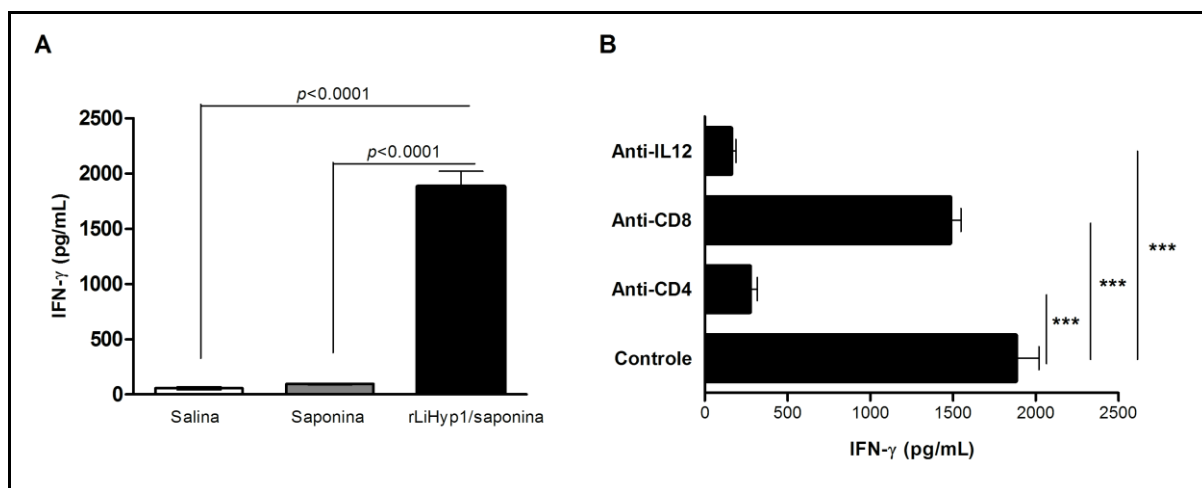


**Figura 9: Avaliação da carga parasitária nos camundongos BALB/c vacinados com rLiHyp1/saponina contra a infecção por *L. infantum*.** Camundongos receberam salina, saponina ou rLiHyp1/saponina e 30 dias após a última dose foram infectados com  $10^7$  promastigotas em fase estacionária de *L. infantum*. A carga parasitária foi determinada no fígado (A), baço (B), medula óssea (C) e linfonodo drenante da pata infectada (D), 10 semanas após o desafio. A média  $\pm$  desvio-padrão de 4 animais por grupo é mostrada. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas na carga parasitária do fígado, baço, medula óssea e linfonodo, quando comparado o grupo rLiHyp1/saponina com os grupos controle (solução salina e saponina).

#### 5.4. Resposta imune induzida após a infecção desafio com *L. infantum*

A produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos após o desafio, apresentada pelos diferentes grupos experimentais após estimulação com o extrato proteico solúvel de *L. infantum* (SLALi), foi analisada com o intuito de avaliar os parâmetros imunológicos associados com a proteção induzida pela imunização com rLiHyp1/saponina. Dez semanas após a infecção desafio, as células do baço dos camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina produziram níveis significativamente elevados de IFN- $\gamma$  após o estímulo com o SLALi, em comparação aos grupos controle (Figura 10A). A contribuição de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>, bem como a dependência de IL-12 na produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos dos animais imunizados e desafiados, foram também avaliadas. Os resultados demonstraram que a produção de IFN- $\gamma$  foi suprimida quando foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IL-12 ou anti-CD4 nas culturas de células de baço. Quando anticorpos anti-CD8 foram adicionados às culturas, observou-se uma menor produção de IFN- $\gamma$ , quando comparada ao controle do experimento (Figura 10B), porem não tão significativa quanto à verificada após adição de anticorpos anti-IL-12 ou anti-CD4.



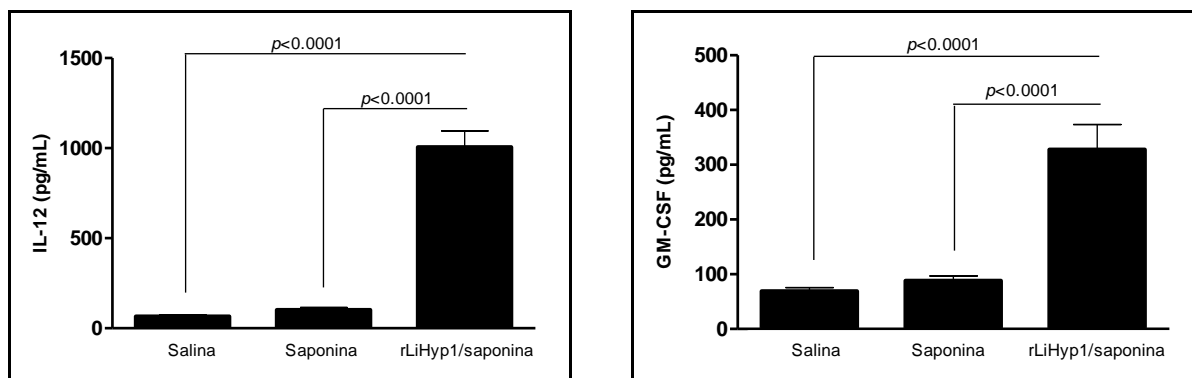


**Figura 10: Produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos dos grupos avaliados e análise do envolvimento de IL-12, de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> na produção desta citocina em camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina e desafiados com *L. infantum*.** Suspensões celulares foram obtidas a partir do baço dos animais, 10 semanas após a infecção desafio. As células foram separadamente estimuladas com SLA de *L. infantum* (25  $\mu$ g/mL) durante 48 h, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração de IFN- $\gamma$  foi medida em pg/mL nos sobrenadantes da cultura, e os resultados foram estatisticamente significantes quando o grupo rLiHyp1/saponina foi comparado aos grupos controle (salina e saponina). A média  $\pm$  desvio-padrão, determinados em 4 animais por grupo, foi mostrada (A). A análise do envolvimento da IL-12 e de células T na produção de IFN- $\gamma$  em animais vacinados e desafiados foi mostrada. Os níveis da citocina nos sobrenadantes das culturas estimuladas com SLALi, na ausência (controle) ou na presença de anticorpos monoclonais anti-IL-12, anti-CD4 ou anti-CD8, foram medidos. Diferenças estatisticamente significantes entre as células não tratadas e as culturas tratadas com os anticorpos monoclonais foram observadas (\*\*\*)  $P < 0,0001$  (B).

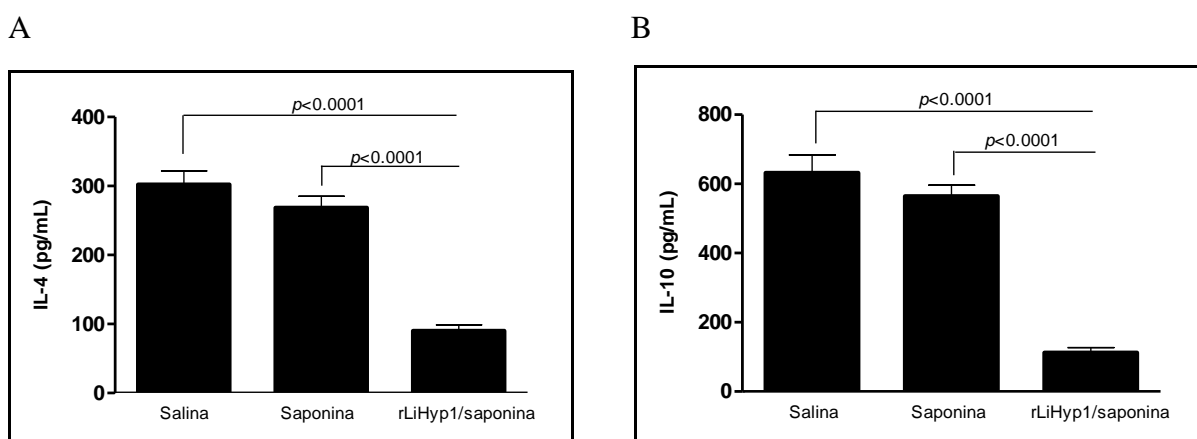
A produção de IL-12 e GM-CSF após o estímulo dos esplenócitos com SLALi foi também avaliada. Células do baço dos camundongos imunizados com rLiHyp1/saponina e desafiados, quando comparadas com as dos grupos salina e saponina, produziram níveis significativamente mais elevados dessas citocinas (Figura 11A para IL-12 e Figura 11B para GM-CSF). Além disso, a produção de IL-4 (Figura 12A) e IL-10 (Figura 12B) foi significativamente menor nos animais imunizados em relação aos níveis observados nos grupos controle (salina e saponina). Desta forma, pode-se concluir que a proteção induzida pela imunização com rLiHyp1/saponina nos camundongos BALB/c contra *L. infantum* foi relacionada à indução de uma resposta imune Th1, com a participação efetiva das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF, bem como com uma menor produção de IL-4 e IL-10.

A

B



**Figura 11: Produção de IL-12 e GM-CSF por células de baço de camundongos BALB/c após infecção com *L. infantum*.** Suspensões de células foram obtidas a partir do baço dos animais, 10 semanas após a infecção. As células foram estimuladas com SLA de *L. infantum* (25 µg/mL) e incubadas por 48 h, a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>. Níveis de IL-12 (A) e GM-CSF (B) foram medidos nos sobrenadantes das culturas. A média ± desvio-padrão foi determinada em 4 animais por grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis entre o grupo rLiHyp1/saponina e os grupos controle (salina e saponina), que são indicados na figura.

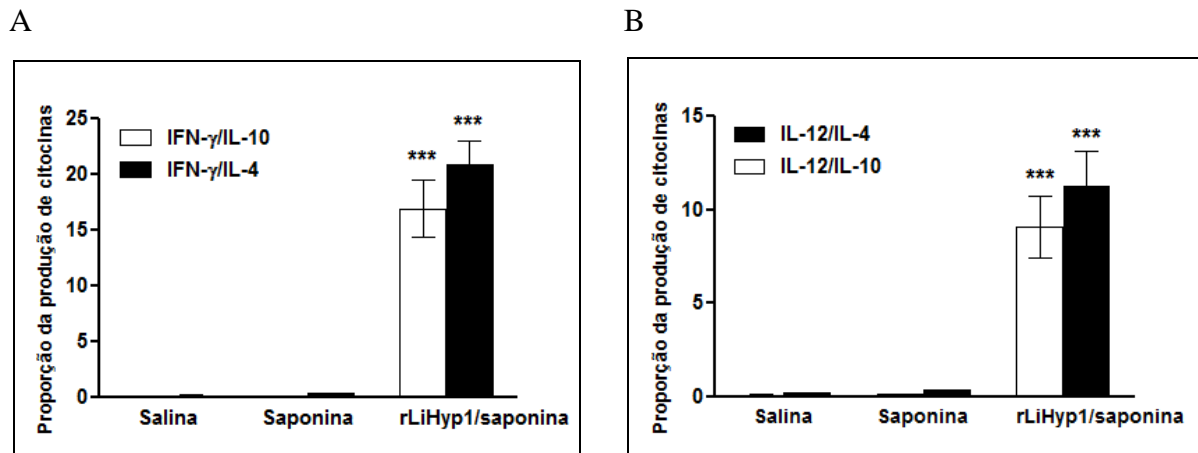


**Figura 12: Produção de IL-4 e IL-10 pelas células de baço de camundongos BALB/c após infecção de *L. infantum*.** Suspensões de células foram obtidas a partir do baço dos animais, 10 semanas após a infecção. As células foram estimuladas com SLA de *L. infantum* (25 µg/mL) e incubadas por 48 h, a 37°C, e a 5% de CO<sub>2</sub>. Níveis de IL-4 (A) e IL-10 (B) foram medidos nos sobrenadantes das culturas. A média ± desvio-padrão dos níveis das citocinas foi determinada em 4 animais por grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis entre o grupo rLiHyp1/saponina e os grupos controle (salina e saponina), que são indicados na figura.

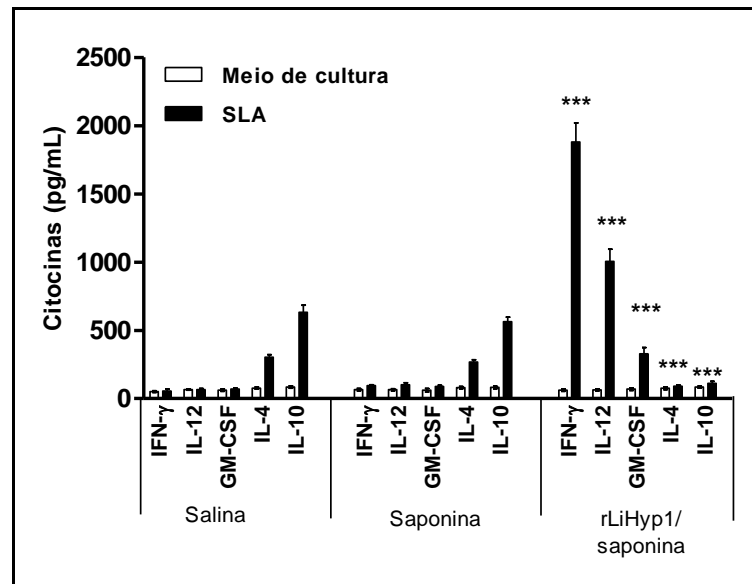
Uma análise na proporção entre IFN-γ/IL-4 e IFN-γ/IL-10 demonstrou o predomínio de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos esplenócitos do grupo rLiHyp1/saponina após o desafio, quando comparados aos grupos controle (Figura 13A). O mesmo perfil pôde ser observado quando foi analisada a proporção entre IL-12/IL-4 e IL-12/IL-10 (Figura 13B).

Dessa forma, esplenócitos de animais vacinados com rLiHyp1/saponina e desafiados com *L. infantum* produziram níveis elevados de IFN-γ, IL-12 e GM-CSF e níveis reduzidos

de IL-4 e IL-10 quando estimulados por SLALi. Em contrapartida, os animais dos grupos controle (salina e saponina) produziram níveis reduzidos de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF e níveis elevados de IL-4 e IL-10 (Figura 14).

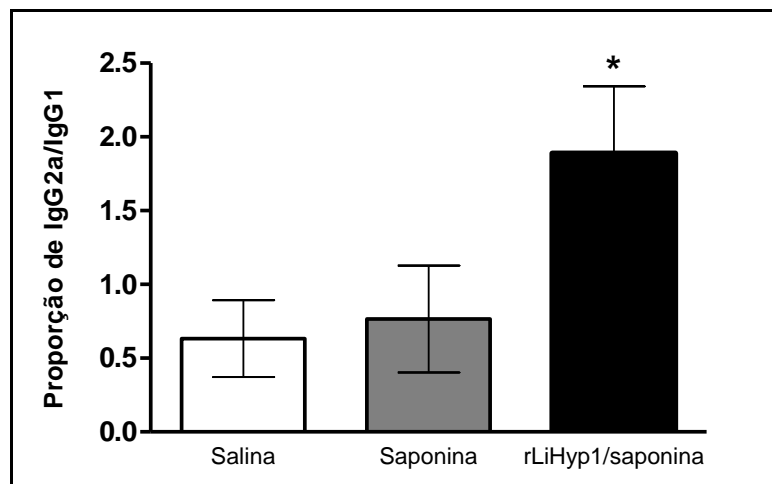


**Figura 13: Análise da proporção na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias após a infecção com *L. infantum*.** A produção elevada de IFN- $\gamma$  foi estatisticamente significativa quando comparada à produção de IL-10 e IL-4 no grupo rLiHyp1/saponina (A). Da mesma forma, a produção de IL-12 foi maior do que a produção de IL-10 e IL-4 no grupo rLiHyp1/saponina (B) (\*\*\*) ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 14: Produção de citocinas nos grupos de camundongos BALB/c após infecção com *L. infantum*.** Esplenócitos dos animais foram obtidos 60 dias após a infecção dos animais imunizados. As células foram não estimuladas (meio) ou estimuladas com SLALi (25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 48 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram dosados por ELISA de captura dos sobrenadantes da cultura. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio-padrão obtidos de 4 animais por grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF entre o grupo rLiHyp1/saponina e os grupos controle (salina e saponina) (\*\*\*) ( $P < 0,0001$ ).

Na avaliação da produção de anticorpos após o desafio (Figura 15), pôde-se verificar, de maneira similar ao observado antes da infecção, uma maior proporção na produção de IgG2a específica à proteína rLiHyp1 em relação à produção de anticorpos IgG1 anti-LiHyp1 nos animais imunizados. Tal fato indica que neste grupo houve a predominância de uma resposta Th1, direcionando para proteção contra a infecção com *L. infantum*.



**Figura 15:** Análise da proporção da produção de imunoglobulinas do isotipo G2a/G1 após a infecção com *L. infantum*. A produção elevada de IgG2a frente aos anticorpos IgG1 no grupo rLiHyp1/saponina foi estatisticamente significativa quando comparada aos grupos controle (\* $P < 0,005$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A LV é uma zoonose que se tornou um crescente problema de Saúde Pública no Brasil e em outros países do mundo, sendo considerada uma endemia em franca expansão geográfica. É uma doença crônica que, se não tratada, pode evoluir para o óbito em cerca de 90% dos casos (WHO, 2010). Como o tratamento da doença ainda é insatisfatório, devido aos muitos efeitos colaterais dos fármacos e ao aumento da resistência dos parasitos aos produtos utilizados, o desenvolvimento de uma vacina profilática é altamente desejável como uma medida efetiva de controle da doença (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Objetivando a busca por novas proteínas de *Leishmania* que apresentem propriedades antigênicas e imunogênicas, recentemente, através de uma ferramenta imunoproteômica, Coelho *et al.* (2012) identificaram diversas proteínas em extratos antigênicos de formas promastigotas e amastigotas-like de *L. infantum*, que foram reconhecidas por anticorpos presentes em amostras de soros de cães com LV sintomática e/ou assintomática, dentre as quais estão incluídas algumas proteínas com funções desconhecidas, denominadas como proteínas hipotéticas. O fato dos anticorpos terem reconhecido tais proteínas indica que as mesmas são expressas pelos parasitos durante a doença e que, dessa forma, são consideradas antigênicas e/ou imunogênicas frente ao sistema imune adaptativo do hospedeiro mamífero (Coelho *et al.*, 2012).

Uma das proteínas hipotéticas identificadas neste trabalho é membro da superfamília das oxigenases em *Leishmania*, e foi denominada rLiHyp1. A sequência gênica referente a esta proteína foi clonada para estudos de antigenicidade frente à LVC e verificação da eficácia protetora contra a LV murina. Por meio de experimentos de Western-blot, observou-se que anticorpos presentes no soro de cães com LV reconheceram a proteína rLiHyp1, com cerca de 36.6 kDa. Experimentos posteriores de ELISA utilizando um amplo painel de soros de cães demonstraram que a proteína rLiHyp1 foi reconhecida, especificamente, pelos anticorpos presentes nos soros de cães com LV sintomática e assintomática, além de não ter sido reconhecida por anticorpos presentes nas amostras de soros de cães saudáveis, de animais vacinados com Leish-Tec<sup>®</sup> e daqueles infectados com *T. cruzi*. Isto demonstra um elevado potencial para estudos adicionais e emprego no diagnóstico sorológico sensível e específico da LVC.

A detecção sorológica de cães com LV assintomática é considerada crítica para um correto diagnóstico laboratorial, para a realização de estudos epidemiológicos e para um

controle mais efetivo contra a propagação da doença entre os próprios cães e entre os cães e humanos, uma vez que tais animais permanecem como potenciais transmissores do parasito (da Costa-Val *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 1994). A técnica de ELISA, utilizando extratos proteicos obtidos de formas promastigotas de *Leishmania*, não é tão efetiva na detecção, com elevada sensibilidade, dos casos de LVC assintomática (Miro *et al.*, 2008; Porrozzi *et al.*, 2007). Desta forma, com os dados de ELISA obtidos neste trabalho, a proteína rLiHyp1 torna-se atrativa para o sorodiagnóstico sensível da LVC, uma vez que a mesma apresentou uma sensibilidade de 95% frente aos soros de cães assintomáticos.

A especificidade do teste de ELISA utilizando extratos dos parasitos também não é satisfatória, uma vez que pode gerar resultados falso-positivos devido à presença de antígenos comuns em outros parasitos como *T. cruzi*, além de microorganismos que causam a malária, lepra e a toxoplasmose (Ferreira *et al.*, 2007; Kar, 1995; Porrozzi *et al.*, 2007). No Brasil existem atualmente duas vacinas licenciadas (Fernandes *et al.*, 2008; Palatnik-de-Sousa, 2008), e postula-se que a especificidade do teste diagnóstico deve ser mantida quando da utilização de amostras de soros de cães vacinados, a fim de que estes cães se diferenciem dos animais infectados. A elevada especificidade apresentada pela proteína rLiHyp1, que não é reconhecida por anticorpos presentes nas amostras de soro de cães com doença de Chagas e de animais sadios mas vacinados com uma vacina comercial, indicam a proteína rLiHyp1 como um novo antígeno candidato ao sorodiagnóstico da LVC.

Em conclusão, os resultados de sorodiagnóstico apresentados demonstram que a proteína rLiHyp1 pode ser considerada como uma nova alternativa para a identificação sensível e específica, por ELISA, de cães com LV sintomática e assintomática.

A proteína rLiHyp1, associada a saponina como adjuvante, foi testada quanto a sua eficácia protetora contra a LV murina, utilizando-se camundongos BALB/c. Os resultados mostraram que a proteína foi capaz de induzir uma resposta imune predominantemente do tipo Th1, antes da infecção desafio com *L. infantum*. Esta resposta foi responsável por induzir proteção contra a LV nestes animais. Camundongos imunizados com rLiHyp1/saponina apresentaram uma produção elevada de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF, combinados com a presença de baixos níveis de IL-4 e IL-10. Após a infecção, os camundongos imunizados, quando comparados aos grupos controle, saponina e salina, mostraram reduções significativas no número de parasitos em todos os órgãos avaliados (fígado, baço, medula óssea e linfonodo drenante). A avaliação da carga parasitária em diferentes órgãos é um importante marcador da eficácia de uma vacina contra a LV, dado o fato de que a resposta imune específica de cada

órgão pode ser observada individualmente após a infecção com espécies de *Leishmania* que apresentem tropismo visceral, independente da via de inóculo escolhida (intravenosa, intradérmica ou subcutânea) (Garg & Dube, 2006).

Antígenos expressos apenas nas formas amastigotas de *Leishmania* são menos testados devido à dificuldade associada com a purificação e/ou cultura de tais formas quando extraídas de tecidos do hospedeiro mamífero infectado. A facilidade com que as formas promastigotas podem ser cultivadas *in vitro* normalmente é a maior causa da escolha desta forma para a pesquisa por novos antígenos com aplicação imunológica. Entretanto, nota-se que os antígenos das formas amastigotas sejam os prováveis indutores de uma resposta imune mais eficaz, uma vez que poucas horas após a infecção e durante a doença, apenas este estágio do parasito permanece em contato com as células e sistema imune do hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2012). Neste contexto, uma vacina contendo antígenos amastigota-específicos, que seja capaz de induzir uma resposta imune contra tal forma intracelular de *Leishmania*, deverá apresentar vantagens não apenas para profilaxia, mas também com a possível utilização como vacina terapêutica.

Dentre os antígenos amastigota-específicos testados como vacina para a LV, a proteína A2 tem se destacado como um candidato promissor. Diversos estudos incluindo a administração da proteína A2 recombinante, associada a diferentes adjuvantes (Ghosh *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2003), como plasmídeo de DNA (Zanin *et al.*, 2007), inserida em vírus atenuados não-replicativos (Resende *et al.*, 2008), em bactérias não-patogênicas (Yam *et al.*, 2011) ou em parasitos não-virulentos (*L. tarentolae*) (Mizbani *et al.*, 2009), tem evidenciado um efeito protetor de tal antígeno na LV murina.

No presente estudo, camundongos vacinados apresentaram uma produção elevada de IFN- $\gamma$  no baço, sendo essa citocina uma das principais envolvidas na resposta imune Th1 contra a infecção por *Leishmania* (Park *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2005). Células T CD4<sup>+</sup> provaram ser a principal fonte na produção de IFN- $\gamma$  nos camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina. Embora estudos realizados tenham mostrado que a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> sejam importantes para a eliminação dos parasitos em camundongos vacinados com diferentes antígenos recombinantes e infectados com *L. donovani* (Bhowmick *et al.*, 2008; Rachamim & Jaffe, 1993), dados do presente estudo sugerem que a indução de IFN- $\gamma$ , mediada principalmente por LT CD4<sup>+</sup>, seja o suficiente para induzir a proteção contra a infecção com *L. infantum*. Além disto, nos animais vacinados, a produção de IFN- $\gamma$  foi amplamente dependente da presença de IL-12, sendo que uma elevada produção de IL-12

pelos esplenócitos foi também detectada após o estímulo das células *in vitro* com SLALi. Desta forma, os dados encontrados indicam que a imunização de camundongos BALB/c com a proteína rLiHyp1 mais saponina induziu a uma resposta imune LiHyp1-específica, a qual foi mantida mesmo após o desafio com *L. infantum*, protegendo os camundongos vacinados contra a LV.

Os esplenócitos dos camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina e infectados por *L. infantum*, quando comparados aos grupos controle (salina e saponina), produziram elevados níveis de GM-CSF quando estimulados com o SLALi. Esta citocina encontra-se relacionada com a ativação de macrófagos e com a resistência de modelos murinos contra diferentes patógenos intracelulares, como *L. major* (Dumas *et al.*, 2003), *L. donovani* (Murray *et al.*, 1995) e *L. chagasi* (Chavéz-Fumagalli *et al.*, 2010). Em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major*, foi observado que nos animais resistentes ocorreu um aumento dos níveis de GM-CSF (Saha *et al.*, 1999). Em camundongos infectados com *L. donovani* e, posteriormente, tratados com rGM-CSF, houve uma redução significativa da carga parasitária. A redução do número de parasitos no fígado dos animais foi acompanhada pelo aumento do número de neutrófilos e monócitos na circulação sanguínea e pelo influxo e acúmulo de células mielo-monocíticas nos órgãos infectados (Murray *et al.*, 1995). Macrófagos derivados de monócitos humanos, pré-tratados com a proteína rGM-CSF, foram capazes de inibir a replicação dos parasitos fagocitados, sugerindo que tal citocina pode ser considerada como um ativador de macrófagos (Weiser *et al.*, 1987). Além disso, demonstrou-se que a imunização de voluntários humanos com uma preparação de antígenos de *Leishmania* contendo rGM-CSF como adjuvante induziu a uma resposta imune do tipo Th1 (Follador *et al.*, 2002), e que a administração de uma vacina terapêutica contendo quatro antígenos de *Leishmania* combinada com rGM-CSF, foi capaz de estimular a resolução das lesões mucosas em paciente com LMC (Badaró *et al.*, 2001).

Em camundongos BALB/c vacinados com proteínas ribossomais de *Leishmania* associadas à CpG-ODN, a proteção contra LC e LV foi relacionada com a redução da resposta mediada por IL-4 e IL-10. No presente estudo, foi também demonstrado que a proteção de camundongos contra *L. infantum* foi associada com uma redução significativa na produção de IL-4 e IL-10. Em relação a IL-4, os resultados mostraram que camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina apresentaram uma baixa produção desta citocina pelos esplenócitos após a infecção, da mesma forma como descrito na proteção induzida pela vacina contendo a proteína A2 nos modelos de LC e LV (Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007), ou com as



proteínas ribossomais de *Leishmania* (Iborra *et al.*, 2008; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2010). A presença de IL-4 foi também correlacionada com uma inibição da atividade leishmanicida de macrófagos humanos, o que acabou por favorecer o desenvolvimento da infecção por *Leishmania* (Vouldoukis *et al.*, 1997).

Níveis diminuídos de IL-10 foram detectados nos camundongos vacinados com rLiHyp1/saponina, quando comparados aos níveis obtidos nos grupos controle, os quais apresentaram uma produção significativamente elevada desta citocina. Na LV, o controle da produção de IL-10 é considerado essencial na prevenção da doença. De acordo com Murray *et al.* (2002), camundongos BALB/c tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-10 ou camundongos *knockout* para IL-10 são resistentes contra a infecção por *L. donovani*. Entretanto, animais antes resistentes, mas que são estimulados a aumentar a produção de IL-10 ou que recebem rIL10 tornam-se susceptíveis e incapazes de controlar a infecção, devido à inativação dos macrófagos infectados. Desta forma, a IL-10 é considerada um dos mais importantes fatores relacionados com a progressão da doença na infecção por LV em camundongos (Murphy *et al.*, 2001; Awasthi *et al.*, 2004; Garg & Dube, 2006). Esta citocina tem também sido associada com a LC causada por *L. amazonensis*, uma vez que camundongos BALB/c deficientes em IL-10 apresentam baixos níveis de infecção após o desafio, quando comparados aos camundongos selvagens (Padigel *et al.*, 2003).

Na avaliação da resposta humoral dos animais imunizados, foi observada uma maior produção de IgG2a anti-rLiHyp1, quando comparada aos níveis obtidos de IgG1, nos animais imunizados com rLiHyp1/saponina. A concentração elevada de IgG2a pode estar diretamente relacionada à produção elevada de IFN- $\gamma$  pelas células do hospedeiro. É postulado que os isotipos IgG1 e IgG2a apresentam uma correlação com a susceptibilidade e resistência, respectivamente, em modelos murinos experimentais para as leishmanioses, sendo que IgG2a encontra-se associada com uma resposta imune celular e com o controle da replicação dos parasitos (Passero *et al.*, 2012).

Em conclusão, os dados apresentados no presente estudo confirmaram que concentrações elevadas de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF e baixas concentrações de IL-4 e IL-10 são necessárias para a indução de uma resposta imune do tipo Th1 e para o direcionamento de uma resposta protetora em camundongos BALB/c contra a infecção experimental com *L. infantum*. Os resultados indicam que a proteína amastigota-específica de *Leishmania*, LiHyp1, quando associada ao adjuvante saponina, foi capaz de cumprir tais requisitos e que, portanto, apresenta-se como um candidato para compor uma vacina efetiva contra a LV murina.

## 7. CONCLUSÕES

⇒ A proteína rLiHyp1 apresentou-se como uma boa candidata para o sorodignóstico sensível e específico da leishmaniose visceral canina.

⇒ A imunização de camundongos BALB/c com a proteína rLiHyp1 e saponina induziu ao desenvolvimento de uma resposta imune celular e humoral do tipo Th1, antes da infecção desafio.

⇒ A imunização com rLiHyp1 e saponina mostrou-se eficaz na indução de proteção em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, representada por reduções significativas na carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodo drenante, quando comparados aos grupos controle.

⇒ Animais imunizados e infectados produziram níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-12 e GM-CSF e baixos níveis de IL-4 e IL-10. Houve a predominância de anticorpos do isotipo IgG2a específicos ao parasito. A produção elevada de IFN- $\gamma$  foi associada, principalmente, à ativação de LT CD4<sup>+</sup>, e foi amplamente dependente de IL-12.

⇒ Com base nos resultados apresentados neste trabalho, a proteína rLiHyp1, associada à saponina, apresenta-se como uma candidata efetiva para compor uma vacina contra a LV murina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-BE, I.; DA SILVA ZARDO, R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJACABRERA, G.P.; ROSADO-VALLADO, M.; MUT-MARTIN, M.; GARCÍA-MISS MDEL, R.; PALATNIK DE SOUSA, C.B.; DUMONTEIL, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* v. 73, n. 2, p. 812–819. 2005.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.D.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One.* v. 7, n. 5, p. e35671. 2012.
- ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Euro. Infect. Dis.* v. 2, p. 145-146. 1996.
- AWASTHI, R.K.; MATHUR, B.; SAHA, J. Immune response to *Leishmania* infection, *Indian J. Med. Res.* v. 119, n. 6, p. 238-58. 2004.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.
- BADARÓ, R.; LOBO, I.; NAKATANI, M.; MUINOS, M.; NETTO, E.M.; COLER, R.N.; REED, S.D. Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal Leishmaniasis refractory to antimony: a case report. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 5, n. 4, p. 223-32. 2001.
- BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M.A.; BURZA, S.; ORTIZ GENOVESE, G.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2012.
- BHARDWAJ, S.; VASISHTA, R.K.; ARORA, S.K. Vaccination with a novel recombinant *Leishmania* antigen plus MPL provide partial protection against *L. donovani* challenge in experimental model of visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* v. 121, n. 1, p. 29–37. 2009.
- BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in Stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* v. 76, n. 3, p. 1003–1015. 2008.
- BHOWMICK, S.; ALI, N. Identification of novel *Leishmania donovani* antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. *PLoS ONE.* v. 4, n. 6, p. e5820. 2009.
- BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology.* v. 112, p. 67-74. 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v. 72, p. 248-254. 1976.
- BRADLEY, D.J. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature.* v. 250, n. 464, p. 353-4. 1974.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília/DF. Ministério da Saúde, 120 p., 2006.
- CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Braz. J. Pharmac. Sci.* v. 36, p. 69-96. 2000.

- CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* v. 28, p. 173–183. 2006.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COSTA, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; RAMÍREZ, L.; COSTA, L.E.; DUARTE, M.C.; MARTINS, V.T.; OLIVEIRA, J.S.; OLORTEGI, C.C.; BONAY, P.; ALONSO, C.; TAVARES, C.A.; SOTO, M.; COELHO, E.A. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes Infect.* v. 12, n. 12-13, p. 967-77. 2010.
- CHENIK, M.; LOUZIR, H.; KSONTINI, H.; DILOU, A.; ABDMOULEH, I.; DELLAGI, K. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine* v. 24, n. 14, p. 2521–2529. 2006.
- CLAASSEN, E.; BOERSMA, W.J.A. Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complet adjuvant. *Res. Immunol.* v. 143, n. 5, p. 475-477. 1992.
- COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. & Immun.* v. 71, n. 7, p. 3988-94, 2003.
- COELHO, V.T.; OLIVEIRA, J.S.; VALADARES, D.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; DUARTE, M.C.; LAGE, P.S.; SOTO, M.; SANTORO, M.M.; TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 6, n. 1, p. e1430. 2012.
- CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* v. 19, n. 11, p. 502-8. 2003.
- DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAM, S.P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.* v. 174, n. 3, p. 636–643. 2007.
- DAS, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology.* v. 3, n. 99, p. 1-19. 2012.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* v. 2, n. 9, p. 692. 2004.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 27, p. 305-18. 2004.
- DUMAS, C.; MUYOMBWE, A.; ROY, G.; MATTE, C.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony stimulating factor survives poorly in macrophages in vitro and delays disease development in mice. *Infect Immun.* v. 71, n. 11, p. 6499–6509. 2003.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2004.
- FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A.; MICHALICK, M.S.; DE FREITAS, E.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.E.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania*

- (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*. v. 26, n. 46, p. 5888-95. 2008.
- FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI, G.JR.; GAZZINELLI, R.T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol*. v. 15, n. 4, p. 476-85. 2012.
- FERREIRA, E.C.; de LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; da SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C.M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol*. v. 146, n. 3-4, p. 235-241. 2007.
- FIGUEIREDO, E.M.; COSTA E SILVA, J.; BRAZIL, R.P. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 32, n. 2, p. 191-3. 1999.
- FOLLADOR, C.; ARAUJO, G.; ORGE, L.H.; CHENG, L.P.; DE CARVALHO, O.; BACELLAR, R.P.; ALMEIDA, E.M.; CARVALHO, J. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine*. v. 20, n. 9-10, p. 1365-68. 2002.
- GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.
- GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*. v. 123, n. 3, p. 439-454. 2006.
- 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* infection. *Vaccine*. v. 20, n. 1-2, p. 59-66. 2001.
- GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Present status of antileishmanial vaccines. *Mol Cell Biochem*. v. 253, n. 1-2, p. 199-205. 2003.
- GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M.J.; SILVA, C.; DE OLIVEIRA, C.I.; MIRANDA, J.C.; ELNAIEM, D.E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G.; BRODSKYN, C.I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 105, n. 22, p. 7845-7850. 2008.
- GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The veterinary Journal*. v. 175, p. 45-52. 2008.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.
- GONTINJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.
- GONZALO, R.M.; DEL REAL, G.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; HELJASVAARA, R.; LUCAS, P.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. v. 20, n. 7-8, p. 1226-31. 2002.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. v. 35, n.11-12, p. 1169-80. 2005.
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. v. 145, n. 12, p. 4290-7. 1990.

- GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 6, p. 230–50. 1993.
- GROGL, M.; MARTIN, R.K.; ODUOLA, A.M.J.; MILHOUS, W.K.; KYLE, D.E. Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 45, p. 98-111. 1991.
- HANDMAN, E.; SYMONS, F.M.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; SCHEERLINCK, J.P. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun.* v. 63, n. 11, p. 4261-7. 1995.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* v. 14, n. 2, p. 229-43. 2001.
- IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; ANDERSON, C.; ALONSO, C.; SACKS, D.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect. & Immun.* v. 73, n. 9, p. 5842-52. 2005.
- IBORRA, S.; PARODY, N.; ABANADES, D.R.; BONAY, P.; PRATES, D.; NOVAIS, F.O.; BARRAL-NETTO, M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect.* v. 10, n. 10-11, p. 1133–1141. 2008.
- JAAFARI, M.R.; GHAFARIAN, A.; FARROKHGISOUR, A.; SAMIEI, A.; KHEIRI, M.T.; MAHBOUDI, F.; BARKHORDARI, F.; KHAMESIPOUR, A.; MCMMASTER, W.R. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine.* v. 24, n. 29-30, p. 5708–5717. 2006.
- JAAFARI, M.R.; BADIEE, A.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; KHEIRI, M.T.; BARKHORDARI, F.; MCMMASTER, W.R.; MAHBOUDI, F. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. *Vaccine.* v. 25, n. 32, p. 6107–6117. 2007.
- JAFFE, C.L.; RACHAMIM, N.; SARFSTEIN, R. Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* v. 144, p. 699–706. 1990.
- KAHL, L.P.; LELCHUK, R.; SCOTT, C.A.; BEESLEY, J. Characterization of *Leishmania major* antigenliposomes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* v. 58, n. 10, p. 3233–3241. 1990.
- KANE, M.M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.* v. 7, n. 1, p. 26-31. 2000.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit. Rev. Microbiol.* v. 21, n. 2, p. 123–152. 1995.
- KEMP, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl.* v. 68, p. 1–33. 1997.
- KUSHAWAHA, P.K.; GUPTA, R.; SUNDAR, S.; SAHASRABUDDHE, A.A.; DUBE, A. Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- $\gamma$  and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. *J Immunol.* v. 187, n. 12, p. 6417-27. 2011.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.

- LIU, G.; ANDERSON, C.; SCALTRETO, H.; BARBON, J.; KENSIL, C.R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*. v. 20, n. 21-22, p. 2808-15. 2002.
- MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 80, p. 349-57. 1985.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública*. v. 10, n. 2, p. 359-375. 1994.
- MAZUMDER, T.; ANAM, K.; ALI, N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 response and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine*. v. 22, n. 9-10, p. 1162–1171. 2004.
- MAZUMDER, S.; MAJI, M.; DAS, A.; ALI, N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS ONE*. v. 6, n. 2, p. e14644. 2011b.
- MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E.L.T.; HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.
- MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; da ROCHA LIMA, A.C.; FRANCA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; dos SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; ROMANHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* v. 147, n. 1-2, p. 67–76. 2007.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis*. v. 5, n. 3, p. 150-8. 2007.
- MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* v. 24, n. 8, p. 371–377. 2008.
- MIZBANI, A.; TAHERI, T.; ZAHEDIFARD, F.; TASLIMI, Y.; AZIZI, H.; AZADMANESH, K.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. 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.
- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 88, n. 4, p. 491–493. 1994.
- MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* n. 8, p. 919-44. 2010.
- MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J. Immunol.* v. 167, n. 9, p. 5226–5230. 2001.
- MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* v. 31, n. 10, p. 2848-56. 2001.
- MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma

- formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J. Immunol.* v. 148, p. 1858–1863. 1992.
- MURRAY, H.W.; CERVIA, J.S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.P.; STOECKLE, M.Y.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest.* v. 95, n. 3, p. 1183–1192. 1995.
- MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun.* v. 70, n. 11, p. 6284–6293. 2002.
- NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet.Res.* v. 42, n. 39, p. 1-13. 2011.
- OLIVEIRA, D.M.; COSTA, M.A.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.; COELHO, E.A. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res.* v. 110, n. 3, p.1277-85. 2012.
- OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* v. 118, n. 2, p. 87-96. 2011.
- PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol.* v. 171, n. 7, p. 3705–3710. 2003.
- PALATNIK DE SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; CASAS, C.P.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; TINOCO, L.W.; DA SILVA, B.P.; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing Quillaja saponaria saponin. *Vaccine.* v. 22, n. 19, p. 2470-9, 2004.
- PALATNIK DE SOUZA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* v. 26, n. 14, p. 1709-24. 2008.
- PALATNIK DE SOUZA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology.* v. 3, n. 69, p. 1-15. 2012.
- PARAGUAI DE SOUZA, E.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine.* v. 19, n. 23-24, p. 3104-15. 2001.
- PARK, A.Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J Immunol.* v. 168, n. 11, p. 5771–5777. 2002.
- PASSERO, L.F.D.; CARVALHO, A.K.; BORDON, M.L.A.C.; BONFIM-MELO, A.; CARVALHO, K.; KALLÁS, E.G.; SANTOS, B.B.A.; TOYAMA, M.H.; PAES-LEME, A.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Proteins of *Leishmania (Viannia) shawi* confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. *Parasit Vectors.* v. 5, n. 64, p. 1-10. 2012.
- PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Parasitologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988.
- PORROZZI, R.; SANTOS da COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; dos SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G.Jr. 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. *Clin. Vaccine Immunol.* v. 14, n. 5, p. 544–548. 2007.
- RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol.* v. 150, n. 6, p. 2322–2331. 1993.
- RAJPUT, Z.I.; HU, S.H.; XIAO, C.W.; ARIJO, A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B.* v. 8, n. 3, p. 153–61. 2007.
- RAMIRO, M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine.* v. 21, n. 20, p. 2474–84. 2003.
- RAVINDRAN, R.; ALI, N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med.* v. 4, n. 6, p. 697–709. 2004.
- REES, P.H.; KAGER, P.A. Visceral leishmaniasis and post-kalazar dermal leishmaniasis. In: Peters, W. and Killick-Kendrick (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York. 1987.
- REIS, A.B., GIUNCHETTI, R.C., CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O.A., and MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol.* v. 26, p. 341–349. 2010.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* v. 7, n. 9, p. 581–96. 2007.
- RESENDE, D.M.; CAETANO, B.C.; DUTRA, M.S.; PENIDO, M.L.; ABRANTES, C.F.; VERLY, R.M.; RESENDE, J.M.; PILÓ-VELOSO, D.; REZENDE, S.A.; BRUNAROMERO, O.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8 T cells. *Vaccine.* v. 26, n. 35, p. 4585–4593. 2008.
- RUECKERT, C.; GUZMÁN, C.A. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog.* v. 8, n. 11, p. e1003001. 2012.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 55, p. 453–483. 2001.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol.* v. 3, n. 11, p. 1041–1047. 2002.
- SAHA, B.; SAINI, A.; GERMOND, R.; PERRIN, P.J.; HARLAN, D.M.; DAVIS, T.A. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* v. 29, n. 7, p. 2319–29. 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: Laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press. 1989.
- SHARMA, A.; MADHUBALA, R. Ubiquitin conjugation of open reading frame F DNA vaccine leads to enhanced cell-mediated immune response and induces protection against both antimony-susceptible and -resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* v. 183, n. 12, p. 7719–7731. 2009.
- SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 99, n. 3, p. 239–51. 2004.
- SJÖLANDER, A.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J Immunol.* v. 160, n. 8, p. 3949–57. 1998.

- SKEIKY, Y.A.; COLER, R.N.; BRANNON, M.; STROMBERG, E.; GREESON, K.; CRANE, R.T.; WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*. v. 20, n. 27-28, p. 3292-303. 2002.
- SOTO, M.; REQUENA, J.M.; QUIJADA, L.; PEREZ, M.J.; NIETO, C.G.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; ALONSO, C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* v. 115, n. 2, p. 342-349. 1999.
- SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 105, n. 1, p. 1-6. 2011.
- STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* v. 165, n. 12, p. 7064-7071. 2000.
- STAGER, S.; ALEXANDER, J.; KIRBY, A.C.; BOTTO, M.; ROOIJEN, N.V.; SMITH, D.F.; BROMBACHER, F.; KAYE, P.M. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med.* v. 9, n. 10, p. 1287-92. 2003.
- SUKUMARAN, B.; TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine*. v. 21, n. 11-12, p. 1292-9. 2003
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* v. 9, n. 5, p. 951-958. 2002.
- TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.* v. 3, n. 5, p. 657-67. 2003.
- TAYLOR, C.E. Cytokines as adjuvants for vaccines: antigen-specific responses differ from polyclonal responses. *Infect Immun.* v. 63, n. 9, p. 3241-3244. 1995.
- TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *Am J Trop Med Hyg.* v. 52, n. 3, p. 287-92. 1995
- TEWARY, P.; SUKUMARAN, B.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine*. v. 22, n. 23-24, p. 3053-3060. 2004b.
- TOLSON, D.L.; JARDIM, A.; SCHNUR, L.F.; STEBECK, C.; TUCKEY, C.; BEECROFT, R.P.; THE, H.S.; OLAFSON, R.W.; PEARSON, T.W. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun.* v. 62, n. 11, p. 4893-9. 1994.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; BORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* v. 76, n. 9, p. 4350-4354. 1979.
- VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARNEIRO, C.M.; SIQUEIRA, F.A.; VIEIRA, P.M.; GIUNCHETTI, R.C.; MOURA, S.A.; FUJIWARA, R.T.; MELO, M.N.; REIS, A.B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One.* v. 7, n. 7, p. e40745. 2012.
- VOGUEL, F.R. Adjuvants in perspective. *Dev. Biol. Stand.* v. 92, p. 241-248. 1998.
- VOULDOUKIS, I.; BÉCHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; SILVAO, D.A.; DEBRÉ, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* v. 27, n. 4, p. 860-65. 1997.

- WEIGLE, K.; SARAIVA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* v. 14, p. 433-450. 1996.
- WEISER, W.Y.; VAN NIEL, A.; CLARK, S.C.; DAVID, JR.; REMOLD, H.G. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* v. 166, n. 5, p. 1436-46. 1987.
- WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathog.* v. 38, p. 147-60. 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. *WHO Technical Report Series.* (949). Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)>. Acesso em: 5 dez. 2012.
- YAM, K.K.; HUGENTOBLER, F.; POULIOT, P.; STERN, A.M.; LALANDE, J.D.; MATLASHEWSKI, G.; OLIVIER, M.; COUSINEAU, B. Generation and evaluation of A2-expressing *Lactococcus lactis* live vaccines against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *J Med Microbiol.* v. 60, n. 9, p. 1248–1260. 2011.
- ZADEH-VAKILI, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DOUSTDARI, F.; SALMANIAN, A.H.; RAFATI, S. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine ses Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. *Vaccine.* v. 22, n. 15-16, p. 1930–1940. 2004.
- ZANIN, F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; SILVA COSTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* v. 9, n. 9, p. 1070–1077. 2007.

## **9. ANEXOS**

**9.1.** Certificado de aprovação do projeto de pesquisa junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG.

**9.2.** Artigo científico publicado no periódico internacional *PLOS Neglected Tropical Diseases* no ano de 2013, intitulado “*Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific hypothetical protein, a member of the oxygenase family against visceral leishmaniasis*”.



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 43/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Ferramenta imunoproteômica utilizando *Leishmania Chagasi* para a identificação de novos antígenos vacinais contra a Leishmaniose Visceral**", que tem como responsável(is) **Eduardo Antonio Ferraz Coelho**, 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 **6/ 07/2011**.

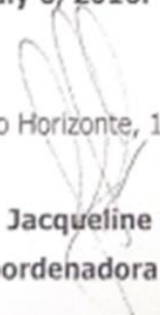
Este certificado expira-se em **6/ 07/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 43/2011**, related to the project entitled "**An immunoproteome approach using *Leishmania Chagasi* in order to identifying new vaccine antigens to protect against Visceral Leishmaniasis**", under the supervisors of **Eduardo Antonio Ferraz Coelho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 6, 2011**.

This certificate expires in **July 6, 2016**.

Belo Horizonte, 14 de Julho de 2011.

  
Prof<sup>a</sup>. **Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil

# Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis

Vivian T. Martins<sup>1</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>2</sup>, Lourena E. Costa<sup>2</sup>, Adriana M. C. C. Martins<sup>3</sup>, Paula S. Lage<sup>2</sup>, Daniela P. Lage<sup>4</sup>, Mariana C. Duarte<sup>2</sup>, Diogo G. Valadares<sup>1</sup>, Rubens D. M. Magalhães<sup>1</sup>, Tatiana G. Ribeiro<sup>3</sup>, Ronaldo A. P. Nagem<sup>1</sup>, Wanderson D. DaRocha<sup>5</sup>, William C. B. Régis<sup>6</sup>, Manuel Soto<sup>7,9</sup>, Eduardo A. F. Coelho<sup>2,4,8,9</sup>, Ana Paula Fernandes<sup>8,9</sup>, Carlos A. P. Tavares<sup>1,9</sup>

**1** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, **6** PUC Minas and Minasfungi do Brasil LTDA, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **7** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **8** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## Abstract

**Background:** The present study aimed to evaluate a hypothetical *Leishmania* amastigote-specific protein (LiHyp1), previously identified by an immunoproteomic approach performed in *Leishmania infantum*, which showed homology to the super-oxygenase gene family, attempting to select a new candidate antigen for specific serodiagnosis, as well as to compose a vaccine against VL.

**Methodology/Principal Findings:** The LiHyp1 DNA sequence was cloned; the recombinant protein (rLiHyp1) was purified and evaluated for its antigenicity and immunogenicity. The rLiHyp1 protein was recognized by antibodies from sera of asymptomatic and symptomatic animals with canine visceral leishmaniasis (CVL), but presented no cross-reactivity with sera of dogs vaccinated with Leish-Tec, a Brazilian commercial vaccine; with Chagas' disease or healthy animals. In addition, the immunogenicity and protective efficacy of rLiHyp1 plus saponin was evaluated in BALB/c mice challenged subcutaneously with virulent *L. infantum* promastigotes. rLiHyp1 plus saponin vaccinated mice showed a high and specific production of IFN- $\gamma$ , IL-12, and GM-CSF after *in vitro* stimulation with the recombinant protein. Immunized and infected mice, as compared to the control groups (saline and saponin), showed significant reductions in the number of parasites found in the liver, spleen, bone marrow, and in the paws' draining lymph nodes. Protection was associated with an IL-12-dependent production of IFN- $\gamma$ , produced mainly by CD4 T cells. In these mice, a decrease in the parasite-mediated IL-4 and IL-10 response could also be observed.

**Conclusions/Significance:** The present study showed that this *Leishmania* oxygenase amastigote-specific protein can be used for a more sensitive and specific serodiagnosis of asymptomatic and symptomatic CVL and, when combined with a Th1-type adjuvant, can also be employed as a candidate antigen to develop vaccines against VL.

**Citation:** Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Martins AMCC, Lage PS, et al. (2013) Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 7(3): e2148. doi:10.1371/journal.pntd.0002148

**Editor:** Shaden Kamhawi, National Institutes of Health, United States of America

**Received:** October 9, 2012; **Accepted:** February 20, 2013; **Published:** March 28, 2013

**Copyright:** © 2013 Martins et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa from UFMG (Edital 07/2012), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; CBB-APQ-02364-08, PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG/CBB-APQ-00356-10, and CBB-APQ-00496-11), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; APQ-472090/2011-9), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas. EAFC and APF are grant recipient of CNPq. MACF is a grant recipient of FAPEMIG/CAPES. This study was also, in part, supported in Spain by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (FIS/PI1100095). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

9 These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania donovani* and *L. infantum/L. chagasi* represents an important disease in the world, leading to nearly 500,000 new cases and 50,000 deaths annually.

The first choice of treatment for all forms of leishmaniasis is still based on the use of the parenteral administration of pentavalent antimonials; however, increased parasite resistance and several side effects reported by patients have been important problems [1,2]. Liposomal amphotericin B is effective but is too expensive



### Author Summary

Life-long immunity to leishmaniasis in recovered patients has inspired the development of vaccines against disease. The present study aimed to evaluate a non-described hypothetical *Leishmania* amastigote-specific protein, identified by an immunoproteomic approach in *L. infantum*, attempting to select a new candidate antigen for specific serodiagnosis and a vaccine against visceral leishmaniasis (VL). The recombinant protein (rLiHyp1) was recognized by antibodies from sera of asymptomatic and symptomatic canine visceral leishmaniasis (CVL), but presented no cross-reactivity with sera of vaccinated dogs, those with Chagas' disease or healthy animals. In addition, the rLiHyp1 plus saponin was able to induce a Th1 response, which was based on the production of high levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, and GM-CSF after *in vitro* stimulation in BALB/c mice. The protective efficacy of rLiHyp1 plus saponin was evaluated in mice challenged with *L. infantum* promastigotes. Challenged and vaccinated mice showed significant reductions in the number of parasites in all evaluated organs, and the protection was associated with a Th1-type response. Therefore, the present study reveals a new potential candidate for the improvement of serodiagnosis of CVL, as well as an effective vaccine candidate against VL.

for most patients [3]. Results from clinical trials using oral miltefosine are encouraging; however, therapy is linked to both potential toxicity and teratogenicity, and should not be given to childbearing-age women [4]. Therefore, the development of new strategies to prevent leishmaniasis has become a high priority.

The evidence of life-long immunity to leishmaniasis has inspired the development of prophylactic vaccination protocols against the disease, but few have progressed beyond the experimental stage. Most experimental vaccines have focused on the mouse model for cutaneous leishmaniasis. Several studies have demonstrated the Type-1 cells mediated immunity-dependence for protective responses against disease. Moreover, Th1 cells response has also been correlated with protection against VL [5]. In this context, the protective immunity in murine VL primarily depends on an IL-12-driven Th1 cells response, leading to an increased IL-2 and IFN- $\gamma$  production. Substantial uptake of inducible NO synthase by IFN- $\gamma$  generates NO from splenic and liver cells, thereby controlling parasite multiplication in these organs [6,7]. By contrast, TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-13 represent major disease promoting cytokines, leading in turn to the suppression of the Th1 response [8]. Low levels of IL-4 commonly enhance vaccine-induced protection by indirectly increasing IFN- $\gamma$  production by T cells [9].

In recent decades, the majority of studies have focused on *Leishmania* promastigote antigens for vaccine development [10,11,12,13]; however, amastigote antigens also seem to be appropriate targets for the immune responses elicited by vaccines, given that after a few hours of infection and during the active disease, this parasite stage becomes exposed to the host immune system [14]. In addition, the fact that promastigotes can be easily cultured *in vitro*, as opposed to axenic amastigotes, has hampered the identification of amastigote-specific stage antigens [15].

In the present work, a hypothetical amastigote-specific *L. infantum* protein, LiHyp1 (XP\_001468941.1), which has been identified by an immunoproteomic approach, was recognized by antibodies present in sera samples of dogs with asymptomatic and symptomatic VL [16]. The amastigote-specific *Leishmania* protein gene (LiHyp1) is predicted to encode a protein with a theoretical molecular weight of 36.6 kDa. An *in silico* sequence comparison

revealed that LiHyp1 belongs to the super-oxygenase family in *Leishmania*, and is an alkylated DNA repair protein. The ability of the recombinant protein (rLiHyp1) to induce protection against infection with virulent *L. infantum* promastigotes was assessed in BALB/c mice. The results showed that rLiHyp1 was antigenic and specifically recognized by canine VL (CVL) sera, whereas a Th1 response, induced by immunization of a combination of rLiHyp1 and saponin, was able to confer protection against *L. infantum*. This protection correlated with a *Leishmania* antigens-specific and IL-12-dependent IFN- $\gamma$  production, mediated mainly by CD4 T cells, as well as by a diminished production of parasite-specific IL-4 and IL-10.

Thus, the present study demonstrates that this unique amastigote-specific protein, a member of the super-oxygenase family in *Leishmania*, can be a new candidate for the improvement of serodiagnosis of CVL and, when associated with a Th1-type adjuvant, to develop an effective vaccine against VL.

### Materials and Methods

#### Ethics statement

Experiments were performed in compliance with the National Guidelines of the Institutional Animal Care, and Committee on the Ethical Handling of Research Animals (CEUA) from the Federal University of Minas Gerais (Law number 11.794, 2008), with code number 043/2011. Sera samples used in this study were kindly provided by Prof. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (Department of Pharmacology and Biochemistry, UFPI) and Prof. Maria Norma Melo (Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, UFMG).

#### Mice and parasites

Female BALB/c mice (8 weeks age) were obtained from the breeding facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, and were maintained under specific pathogen-free conditions. Experiments were carried out using the *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46) strain. Parasites were grown at 24°C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at pH 7.4. The soluble *L. infantum* antigenic extract (SLA) was prepared from  $1 \times 10^{10}$  stationary-phase promastigote cultures (5–7 day-old), as described [17]. Parasites were kindly provided by Prof. Maria Norma Melo.

#### Cloning of DNA sequence coding for *L. infantum* hypothetical protein, LiHyp1

The LiHyp1 (XP\_001468941.1) nucleotide and amino acid sequences used in this study were obtained from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The local alignment of the LiHyp1 sequence against the available complete genomes of other organisms was performed by BLAST. Analyses of basic physical and chemical properties, as well as phylogenetic analysis, were performed in a TriTrypDB database (<http://tritrypdb.org>). The recombinant protein (rLiHyp1) was obtained after having cloned a DNA *L. infantum* fragment containing the LiHyp1 coding region. Initially, genomic DNA was extracted by a phenol:chloroform extraction, as described [17], and it was used as a template. *Forward* (5'-GAAGGATCCAGCATGTCTATCGTGTGCGAG-3') and *reverse* (5'-GGAAAGCTTCGCTTGGCGGCGTACGTGAGC-3') primers were designed according to the DNA sequence of the ORF described in the *L. infantum* genome sequence database [Linj.35.1290]. The PCR product was cloned

into the pGEM-T *easy* vector confirmed by sequencing and transferred to the pET21a expression vector (Novagen), using the *Bam*HI and *Hind*III restriction enzymes included in the primers for this purpose (underlined). Recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant protein expression was performed by adding 0.5 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, Promega, Montreal, Canada) for 4 h at 37°C, when cells were lysed by a homogenizer after five passages through the apparatus. The product was centrifuged at 13,000 $\times$  g for 20 min at 4°C, while the rLiHyp1, containing a tag of 6 $\times$  residues of histidine, was purified under non-denaturing conditions, using a 5 mL HIS-Trap column (GE Healthcare Life Science) attached to an FPLC (GE Healthcare Life Science) system. After purification, the recombinant protein was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma) to remove residual endotoxin content.

### Canine sera and ELISA for immunodiagnosis and immunoblotting

To evaluate the antigenicity of rLiHyp1, sera samples from healthy (n=37), vaccinated with Leish-Tec<sup>®</sup> (n=18), *T. cruzi* experimentally infected (n=18), asymptomatic (n=19) and symptomatic *L. infantum*-infected dogs (n=15) were used. All animals were considered symptomatic when three or more of the following symptoms were present: loss of weight, alopecia, adenopathy, onychogryphosis, hepatomegaly, conjunctivitis and exfoliate dermatitis on the nose, tail and ear tips; and asymptomatic when they were free from clinical symptoms. In the infected animals, the diagnosis of the disease was defined when amastigotes were seen in Giemsa stained smears of bone marrow aspirates or promastigotes were identified on culture of peripheral blood or bone marrow aspirates. Sera were considered positive when tested by indirect immunofluorescence. A titration curve was performed to determine the best protein concentration and antibody dilution to perform ELISA. Plates (Falcon) were sensitized with rLiHyp1 (1.0  $\mu$ g/well) or SLA (0.5  $\mu$ g/well) for 18 h at 4°C. Free binding sites were blocked with a PBS-Tween 20 0.05% (PBST) and 5% casein solution for 2 h at 37°C. After five washes with PBST, plates were incubated with 100  $\mu$ L of canine sera for 1 h at 37°C. Serum samples were diluted 1:200 in PBST and 0.5% casein. After, plates were washed seven times with PBST and incubated with 1:10,000 anti-dog IgG antibody (Sigma, St. Louis, USA) horseradish peroxidase conjugated. The reaction was developed through incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, along with *ortho*-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer pH 5.0, for 30 min in the dark, and was stopped by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 N. Optical densities were read at 492 nm in an ELISA microplates spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Concord, Canada).

For immunoblotting experiments, the recombinant protein was submitted to a 10% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane (0.2  $\mu$ m pore size, Sigma, St. Louis, USA). Membranes were blocked with PBST and 5% casein solution, and were incubated for 2 h at 37°C before the first incubation with a pool of sera samples of asymptomatic CVL, diluted 1:100 in PBST. Peroxidase conjugated anti-dog IgG (1:5,000) was used as a second antibody (Sigma). Reactions were revealed by adding chloronaphthol, diaminobenzidine, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Immunization and challenge infection

Mice (n=8, per group) were vaccinated subcutaneously in their left hind footpad with 25  $\mu$ g of rLiHyp1 associated with 25  $\mu$ g of saponin (*Quillaja saponaria* bark saponin, Sigma), with adjuvant or only diluent (PBS). Three doses were administered at 2-week intervals. Four weeks after the final immunization, animals (n=4, per group) were euthanized for the analysis of the immune

response elicited by vaccination. At the same time, the remaining animals were infected subcutaneously in the right hind footpad, with virulent 1 $\times$ 10<sup>7</sup> stationary-phase promastigotes of *L. infantum*, when 10 weeks after the animals were euthanized, and the liver, spleen, bone marrow (BM), and the paws' draining lymph nodes (dLN) were collected to determine parasite burden and evaluation of the immune response.

### Estimation of parasite load

The liver, spleen, BM, and dLN were collected for parasite quantification, following a limiting-dilution protocol [18]. Briefly, the organs were weighed and homogenized using a glass tissue grinder in sterile PBS. Tissue debris was removed by centrifugation at 150 $\times$  g, and cells were concentrated by centrifugation at 2000 $\times$  g. Pellets were resuspended in 1 mL of Schneider's insect medium supplemented with 20% FBS. Two hundred and twenty microliters were plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc, Nunclon<sup>®</sup>, Roskilde, Denmark) and diluted in log-fold serial dilutions in supplemented Schneider's medium with a 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-20</sup> dilution. Each sample was plated in triplicate and read 7 days after the beginning of the culture at 24°C. Pipette tips were discarded after each dilution to avoid carrying adhered parasites from one well to another. Results are expressed as the negative log of the titer (*i.e.*, the dilution corresponding to the last positive well) adjusted per microgram of tissue.

### Cytokine production

Splenocyte cultures and cytokine assays were performed before infection and at 10<sup>th</sup> week after challenge, as described [17]. Briefly, single-cell preparations from spleen tissue were plated in duplicate in 24-well plates (Nunc) at 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells per mL. Cells were incubated in DMEM medium (non-stimulated, background control), or separately stimulated with SLA (25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) or rLiHyp1 (20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12, and GM-CSF levels were assessed in the supernatants by a sandwich ELISA provided in commercial kits (BD OptEIA TM set mouse IFN- $\gamma$  (AN-18), IL-12 and GM-CSF; Pharmingen, San Diego, CA, USA; and Murine IL-4 and IL-10 ELISA development kits; PeproTech<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil); following manufacturer's instructions. In order to block IL-12, CD4, and CD8 mediated T cell cytokine release, spleen cells of mice vaccinated with rLiHyp1 plus saponin and challenged with *L. infantum* were *in vitro* stimulated with SLA (25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), and incubated in the presence of 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of monoclonal antibodies (mAb) against mouse IL-12 (C17.8), CD4 (GK 1.5), or CD8 (53-6.7). Appropriate isotype-matched controls – rat IgG2a (R35-95) and rat IgG2b (95-1) – were employed in the assays. Antibodies (no azide/low endotoxin<sup>TM</sup>) were purchased from BD (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

### Statistical analysis

The statistical analysis was made using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). Statistical analysis with the vaccinated and/or infected mice was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using the Bonferroni's post-test for multiple comparisons of groups. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were used to analyze the data obtained using sera samples of dogs. Statistical analysis between CVL and the control groups were performed by one-way ANOVA using Tukey's multiple comparison test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Data of shown in this study are representative of two independent vaccination' experiments, which presented similar results.



## Results

### Antigenicity of the *L. infantum* hypothetical protein, LiHyp1

In the present study, a putative member of the super-oxygenase family in *Leishmania* was fused as a recombinant protein to an N-terminal 6× histidine-tag and expressed in *E. coli*. The recombinant protein (rLiHyp1) was purified by nickel affinity chromatography (Fig. 1A), and tested for serodiagnosis of CVL. Initially, a pool of sera of asymptomatic dogs was able to recognize the rLiHyp1 by immunoblotting analysis, as seen in Fig. 1B.

Sera were individually tested in ELISA against rLiHyp1, and the results indicated that all sera samples of symptomatic dogs, and 18 out of 19 samples of asymptomatic CVL animals were able to recognize the recombinant protein. In contrast, antibodies from *T. cruzi*-infected, Leish-Tec<sup>®</sup> vaccinated or healthy dogs did not react with the rLiHyp1 protein (Fig. 1C). To determine the diagnostic performance of rLiHyp1 for CVL, Receiver-Operating Characteristic (ROC) curves were constructed to determine area under curve (AUC) and sensitivity and specificity values in the experiments. In the results, it was observed that the performance of rLiHyp1 proved to be highly effective in order to identify sera samples of symptomatic and asymptomatic CVL, and also to differentiate them in relation to the other sera samples employed in this study (Fig. 1D and 1E, respectively).

### Immunogenicity and protective efficacy of rLiHyp1 against *L. infantum*

The immunogenicity of the rLiHyp1 was evaluated in BALB/c mice, 4 weeks after the last vaccine dose. Following *in vitro* stimulation with rLiHyp1, spleen cells from vaccinated mice significantly produced higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, and GM-CSF than those secreted by spleen cells from control mice (saline and saponin groups). No increase in IL-4 and IL-10 production could be observed in any experimental group, after stimulation with rLiHyp1 (Fig. 2A). The ratio between IFN- $\gamma$ /IL-4 and IFN- $\gamma$ /IL-10 levels; as well as between IL-12/IL-4 and IL-12/IL-10 levels showed that vaccinated animals presented an elevated Th1 immune response after rLiHyp1-stimulus (Fig. 2B and 2C, respectively). In addition, mice vaccinated with rLiHyp1 plus saponin presented an rLiHyp1-specific humoral response, with the predominance of IgG2a isotype (Fig. 2D).

Next, the present study analyzed whether the immunization with the rLiHyp1 plus saponin was able to induce protection against *L. infantum*. The infection was followed up over a 10-weeks period, when the parasite burden in the liver, spleen, BM, and dLN was determined. Significant reductions in the number of parasites were observed in the different evaluated organs of vaccinated mice, as compared with those that received only saline or saponin (Fig. 3). In this context, vaccinated mice with rLiHyp1 plus saponin showed significant reductions in the parasite load in liver (3.8- and 3.3-log reductions, Fig. 3A), spleen (3.7- and 3.5-log reductions, Fig. 3B), BM (3.0- and 3.0-log reductions, Fig. 3C), and dLN (3.9- and 3.6-log reductions, Fig. 3D), in comparison to the saline and saponin groups, respectively. Attempting to determine the influence of immunization with rLiHyp1 plus saponin on the *L. infantum* specific killing effectors functions in the spleen of infected mice, nitrite was assayed as an indicator of nitric oxide (NO) production in spleen cells. The nitrite production was significantly higher in mice vaccinated with rLiHyp1 plus saponin after stimulation with SLA, as compared to the control groups that produced minimum amounts of this product (data not shown).

### Cellular response elicited after *L. infantum* challenge infection

The production of cytokines in the supernatants of spleen cells cultures stimulated with rLiHyp1 and SLA after challenge was analyzed to determine the immunological correlates of protection induced by rLiHyp1. The spleen cells from mice vaccinated with rLiHyp1 plus saponin produced higher levels of SLA-specific IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF cytokines than those secreted by spleen cells from control groups, 10 weeks after infection (Fig. 4A). In contrast, the SLA-driven production of IL-4 and IL-10 showed that vaccination with rLiHyp1 plus saponin induced no production of these cytokines in the vaccinated and infected animals.

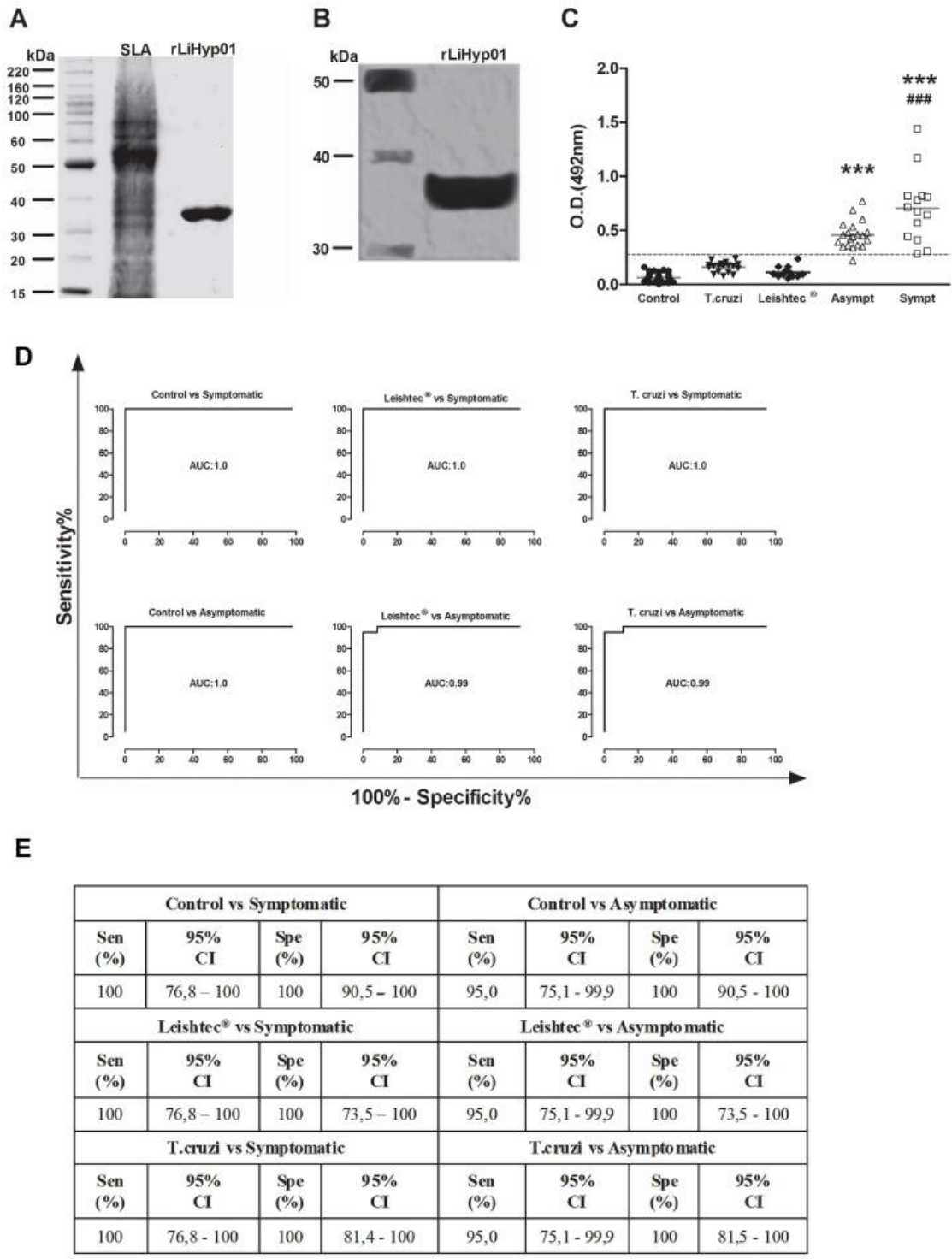
The contribution of CD4 and CD8 T cells and the dependence of IL-12 production for the SLA-specific IFN- $\gamma$  response from the spleen cells of mice immunized with rLiHyp1 plus saponin and challenged with *L. infantum* were evaluated. The IFN- $\gamma$  production was completely suppressed using anti-IL-12 or anti-CD4 monoclonal antibodies in the spleen cells cultures (Fig. 4B). The addition of anti-CD8 antibodies to the cultures also decreased the production of IFN- $\gamma$ , as compared to the cell cultures without treatment ( $1.881 \pm 139$  pg/mL before, and  $1.533 \pm 110$  pg/mL after including anti-CD8 antibodies); however, the production of this cytokine proved to be higher than that produced by the use of the anti-CD4 monoclonal antibody.

As observed before challenge, the ratio between IFN- $\gamma$ /IL-4 and IFN- $\gamma$ /IL-10, and between IL-12/IL-4 and IL-12/IL-10 indicated that vaccinated mice developed a specific Th1 immune response, which was maintained after infection in these animals (Fig. 4C and 4D, respectively). In this study, very low levels of anti-SLA antibodies could be observed in the sera of all mice groups challenged with *L. infantum*. However, it was possible to detect that vaccinated and infected mice presented SLA-specific IgG2a antibodies that were significantly higher than the obtained IgG1 levels (Fig. 4E).

## Discussion

Different *Leishmania* proteins with antigenic properties were recently identified by an immunoproteomic approach applied to *L. infantum* promastigotes and amastigote-like proteic extracts [18], including hypothetical proteins of the parasites. The fact that antibodies present in the sera of infected dogs recognized these hypothetical proteins indicates that they are expressed by parasites during active infection, and are antigenic to the host's immune system. In this context, the DNA encoding one of these *Leishmania* hypothetical proteins, which was specifically recognized by antibodies in the amastigote-like antigenic extracts, was cloned and expressed in *E. coli* and tested for its antigenicity and prophylactic properties. Immunoblotting and ELISA analyses demonstrated that the recombinant LiHyp1 protein (rLiHyp1) was specifically recognized by antibodies present in the sera of dogs with symptomatic and asymptomatic VL, yet it presented no cross-reactivity with the sera of dogs vaccinated with a Brazilian recombinant vaccine, Leish-Tec<sup>®</sup>, or with animals experimentally infected with *T. cruzi*, demonstrating, besides antigenicity its potential for improvement of CVL serodiagnosis. Dogs are also reservoirs for *T. cruzi* parasites in endemic areas for VL transmission in Brazil, and seroprevalences of anti-*T. cruzi* antibodies, which may cross react with *Leishmania* antigens, of 21.9% and up to 57.0% have been reported [19,20].

In a previous study, it was demonstrated that sera from dogs naturally infected with *L. infantum* displayed reactivity with *Leishmania* ribosomal proteins (LRP) through Western-Blot analysis. A comparison between LRP and SLA showed that LRP had a



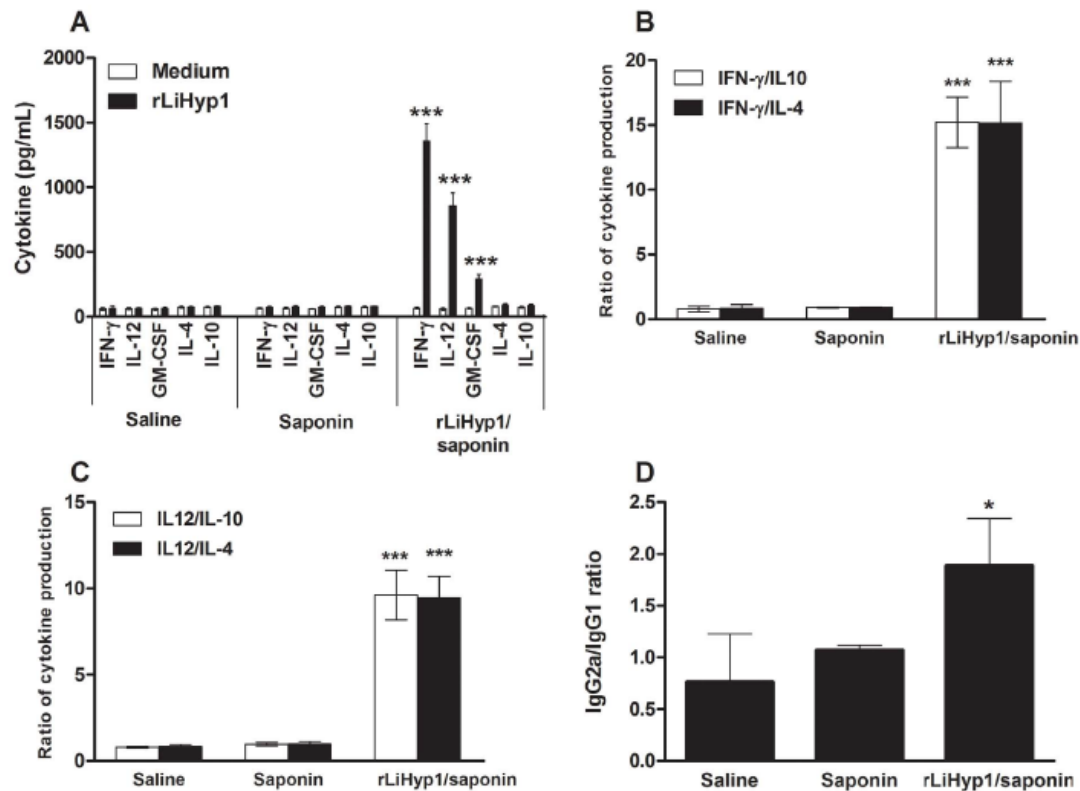
**Figure 1. Antigenicity of rLiHyp1 protein against canine sera.** Ten micrograms of *L. infantum* SLA and of the rLiHyp1 protein were electrophoresed on a SDS-PAGE 10% gel and stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (A). Western-Blot showing the reactivity against the purified protein from a pool of sera from dogs with asymptomatic VL. Gels and Western-Blot used were derived from three independent experiments, and one representative preparation was showed in this study (B). ELISA assays performed with rLiHyp1 (1 µg per well) against individual

sera samples from healthy dogs (n=37), *T. cruzi*-infected dogs (n=18), Leish-Tec<sup>®</sup> vaccinated animals (n=18); and asymptomatic (n=19) and symptomatic (n=15) *L. infantum*-infected dogs is showed (C). The OD values of each individual serum are shown. Cut-off value (dotted line) for negative and positive samples discrimination was selected by Receiver-Operating Characteristic (ROC) curves analysis as the lower OD value with a 100% of specificity. Statistically significant differences were obtained between CVL groups and other groups: \*\*\*  $P < 0.0001$ ; and between the symptomatic and asymptomatic groups: ###  $P < 0.0001$ , by one-way ANOVA using the Tukey's multiple comparison test. In order to analyze the diagnostic performance of rLiHyp1 against different sera samples, ROC curves were used to determine area under curve (AUC) (D), and sensitivity and specificity values (E).  
doi:10.1371/journal.pntd.0002148.g001

similar sensitivity in ELISA, but higher specificity than the SLA-based assays in the diagnosis of CVL [21]. However, the technical purification of LRP is complex and labor-intensive. In contrast, the production of recombinant proteins is less complex and allows obtain large amounts of proteins, when compared to production of semi-purified extracts of the parasites (like LRP). In this context, the use of the rLiHyp1 protein in the serodiagnosis of CVL is attractive.

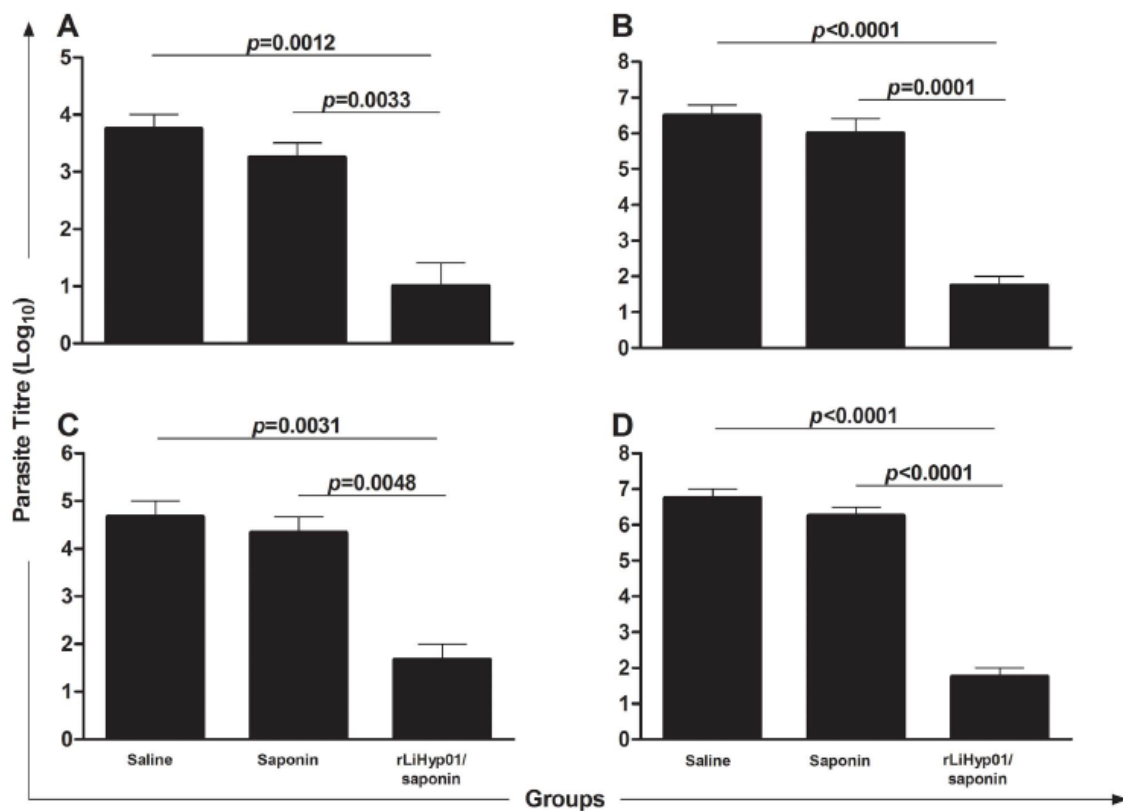
Amastigote antigens have been far less tested as vaccine candidates against VL [15]. Therefore, a vaccine that is able to elicit immune responses against intracellular amastigotes of *Leishmania* may present advantages not only for prophylactic, but

also for therapeutic vaccines. In this context, the immunization with rLiHyp1 plus saponin was able to induce a predominant Th1 immune response, which was characterized by an *in vitro* rLiHyp1-specific production of IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF, combined with the presence of very low levels of IL-4 and IL-10. After infection, mice immunized with rLiHyp1 plus saponin, when compared to control groups, displayed significant reductions of the number of parasites in all evaluated organs (liver, spleen, BM, and dLN), which correlated a specific rLiHyp1- and SLA-dependent IFN- $\gamma$  production in the spleen, one of the main cytokines implicated in the acquired immunity against infection with *Leishmania* [22,23,24]. The CD4<sup>+</sup> T cells proved to be the major source of



**Figure 2. Cellular and humoral response induced in BALB/c mice by immunization with rLiHyp1 plus saponin.** Single cells suspensions were obtained from the spleens of mice, four weeks after vaccination. Cells were non-stimulated (medium; background control) or stimulated with rLiHyp1 ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 48 h at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . IFN- $\gamma$ , IL-12, GM-CSF, IL-4, and IL-10 levels were measured in culture supernatants by capture ELISA (A). Each bar represents the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of data from four individual mice per group. Statistically significant differences in the IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF levels between the rLiHyp1 plus saponin group and control mice (saline and saponin groups) were observed (\*\*\*  $P < 0.0001$ ). The ratio between IFN- $\gamma$ /IL-10 and IFN- $\gamma$ /IL-4 levels (B); and between IL-12/IL-10 and IL-12/IL-4 levels (C) are also showed. Statistically significant differences in the ratios between the rLiHyp1 plus saponin group and control groups were observed (\*\*\*  $P < 0.0001$ ). The ratio between rLiHyp1-specific IgG1 and IgG2a antibodies was obtained for sera of each individual mouse within their respective vaccination group and statistically significant difference between the rLiHyp1 plus saponin group and control groups was also observed (\*  $P < 0.005$ ) (D).  
doi:10.1371/journal.pntd.0002148.g002





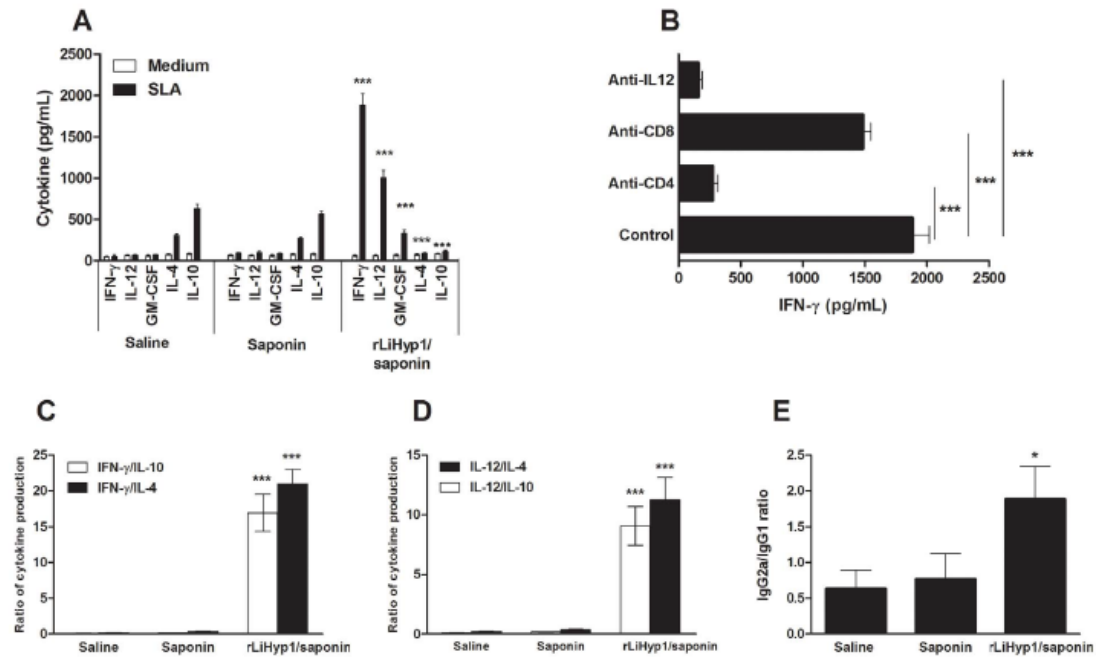
**Figure 3. Protection of BALB/c mice vaccinated with rLiHyp1 plus saponin against *L. infantum*.** Mice inoculated with saline, saponin, or rLiHyp1 plus saponin were subcutaneously infected with virulent  $1 \times 10^7$  stationary-phase promastigotes of *L. infantum*. The number of parasites in the liver (A), spleen (B), bone marrow (C), and paws' draining lymph nodes (D) was measured, 10 weeks after challenge by a limiting-dilution technique. Mean  $\pm$  standard deviation (SD) of four mice in each group is shown. Statistically significant differences in the parasite load in all evaluated organs between the rLiHyp1 plus saponin group and control mice (saline and saponin groups) are shown (in numbers). Data shown in this study are representative of two independent experiments, which presented similar results. doi:10.1371/journal.pntd.0002148.g003

IFN- $\gamma$  in the protected mice, since depletion of these cells in cultures of spleen cells stimulated with SLA significantly abrogated this response. Similarly, in the vaccinated mice, IFN- $\gamma$  production proved to be IL-12-dependent. Although previous reports have shown that the activation of both CD4 and CD8 T cells subsets may be important for the killing of parasites in mice vaccinated with different parasite recombinant antigens [25,26], the present study's data suggest that CD8 T cells may contribute in a less extension to the induction of IFN- $\gamma$  mediated response elicited by the rLiHyp1 plus saponin formulation. Besides production of IFN- $\gamma$ , these cells may contribute to infection control by their direct cytotoxic effect on infected cells, as previously demonstrated in other experimental conditions [24]. Altogether, the present study indicates that immunization with rLiHyp1 plus saponin primed BALB/c mice for an rLiHyp1-specific Th1 response that was sustained after *L. infantum* infection challenge.

The present study also showed that the protection in BALB/c mice against *L. infantum* is associated with a significant decrease in the production of macrophage deactivating cytokines, like IL-4 and IL-10. Very low levels of *Leishmania*-specific IL-10 were detected after the stimulation of spleen cells from vaccinated mice, 10 weeks after infection. In contrast, spleen cells from both control mice

groups showed a significantly higher production of this cytokine. Indeed, control of the parasite-mediated IL-10 response in vaccinated mice may be critical for protection, since this cytokine is considered to be the most important factor for VL progression after infection with viscerotropic *Leishmania* species in IL-10 deficient mice [12,27,28], or in mice treated with an anti-IL-10 receptor antibody [29]. In BALB/c mice, the IL-4-dependent production of IgG1 antibodies is associated with disease progression due to some *Leishmania* species, including *L. amazonensis* [30], but it is not confirmed in *L. infantum* or *L. donovani* [31,32]. Nonetheless, in BALB/c mice vaccinated with recombinant A2 protein or LRP plus saponin, the protection against cutaneous or visceral leishmaniasis have been also correlated with a decrease in *Leishmania*-specific IL-4 and IL-10 mediated response [12,17,22,33].

Spleen cells from vaccinated mice, as compared to the control groups, produced higher levels of rLiHyp1- and SLA-specific GM-CSF, a cytokine related with macrophage activation and resistance in murine models against different intracellular pathogens, including *L. major* [34], *L. donovani* [35], and *L. chagasi* (= *L. infantum*) [12]. It has also been shown that the immunization of humans with a crude *Leishmania* antigenic preparation using this cytokine as an adjuvant commonly induces a parasite-specific Th1



**Figure 4. Analysis of the cellular and humoral response and of the involvement of IL-12, CD4 and CD8 T cells in the IFN- $\gamma$  production after *L. infantum* challenge.** Single cells suspensions were obtained from the spleens of mice, 10 weeks after infection. Cells were non-stimulated (medium; background control) or stimulated with *L. infantum* SLA ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 48 h at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, GM-CSF, IL-4 and IL-10 were measured in culture supernatants by capture ELISA. Mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the cytokines levels determined in four individual mice per group is shown (A). Statistically significant differences between the rLiHyp1 plus saponin group and the control mice (saline and saponin groups) were observed ( $*** P < 0.0001$ ). The analysis of the involvement of IL-12 and CD4 and CD8 T cells in the IFN- $\gamma$  production is showed (B). Levels of IFN- $\gamma$  in the supernatants of spleen cells cultures stimulated with SLA, as explained above, in the absence (positive control) or in the presence of anti-IL-12, anti-CD4, or anti-CD8 monodonal antibodies were measured. Statistically significant differences between non-treated control cells and cultures incubated with anti-CD4 and anti-IL-12 monodonal antibodies were observed ( $*** P < 0.0001$ ). The ratio between IFN- $\gamma$ /IL-10 and IFN- $\gamma$ /IL-4 levels (C), and between IL-12/IL-10 and IL-12/IL-4 levels (D), are also showed. Statistically significant differences between the rLiHyp1 plus saponin group and the control groups were observed ( $*** P < 0.0001$ ). The ratio between SLA-specific IgG1 and IgG2a antibodies levels were calculated for sera of each individual mouse within their respective vaccination group and statistically significant difference between the rLiHyp1 plus saponin group and the control groups was also observed ( $* P < 0.005$ ) (E). doi:10.1371/journal.pntd.002148.g004

response [36], and that the administration of a therapeutic vaccine containing some *Leishmania* antigens plus GM-CSF could be correlated with the cure of lesions in the muco-cutaneous leishmaniasis [37].

A critical aspect for *Leishmania* vaccines development refers to the pre-clinical model chosen for initial screening of vaccine candidates. Although sand fly transmitted infection in hamsters more closely resemble the natural transmission and the human disease, this infection model requires specific laboratory conditions and trained personnel staff, which are not widely available, hindering its general use as a first step for testing vaccine efficacy against VL [38]. In contrast, BALB/c mice infected with *L. donovani* or *L. infantum* is one of the most widely studied murine models for VL, and is therefore naturally selected over other models for this purpose [17,39,40,41]. Murine models have also allowed the characterization of the immune mechanisms required to develop organ-specific immune response against *Leishmania* [41,42]. Therefore, the evaluation of the parasite burden in different organs is an important marker of vaccine efficacy against VL in these models. In a recent study, it was demonstrated that the subcutaneous route of inoculation of *L. infantum* in BALB/c mice induces a faster infection development in the animals and higher parasite burden in different tissues as compared to the intravenous challenge [41]. In this

context, the subcutaneous route was selected to evaluate the efficacy of rLiHyp1 plus saponin vaccine against *L. infantum*. In addition, in comparative studies, it was found that protection afforded by vaccination might be improved in animals challenged by intradermal/subcutaneous route as compared to those receiving an intravenous challenge [43,44]. Nevertheless, additional studies may well be carried out in order to extend the observations present herein of the protective efficacy of rLiHyp1 plus saponin vaccination to other infection models and experimental conditions.

In conclusion, the present study's data indicated that a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the superoxide family, LiHyp1, is antigenic in the CVL, and also conferred protection in BALB/c mice against *L. infantum*. Protection correlated with the CD4 T cells response characterized by high IFN- $\gamma$ , IL-12, and GM-CSF, and low IL-4 and IL-10 levels. Therefore, the LiHyp1 protein constitutes a new and promising antigen candidate for serodiagnosis and vaccine development against VL.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EAFC APF CAPT MACF WDdR. Performed the experiments: VTM LEC AMCCM PSL DPL MCD DGV RDMM TGR. Analyzed the data: EAFC APF MACF MS.

Contributed reagents/materials/analysis tools: WCBR RAPN. Wrote the paper: EAFM MS APF MACF CAPT.

## References

- Croft SL, Coombs GH (2003) Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502–508.
- Minodier P, Parola P (2010) Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 5: 150–158.
- Mondal S, Bhattacharya P, Ali N (2010) Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 919–944.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, et al. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118: 87–96.
- Das A, Ali N (2012) Vaccine prospects of killed but metabolically active *Leishmania* against visceral leishmaniasis. *Expert Rev Vaccines* 11: 783–785.
- Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA (1990) Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* 25: 15–19.
- Blackwell JM (1996) Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112: S67–S74.
- Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD (2005) Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 38: 147–160.
- Stäger S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM (2003) Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* 71: 4804–4807.
- Stäger S, Smith DF, Kaye PM (2000) Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165: 7064–7071.
- Dondji B, Perez-Jimenez E, Goldsmith-Pestana K, Esteban M, McMahon-Pratt D (2005) Heterologous prime – boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 5286–5289.
- Chávez-Fumagalli MA, Costa MA, Oliveira DM, Ramirez L, Costa LE, et al. (2010) Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes Infect* 12: 967–977.
- Agallou M, Sniirlis D, Soteriadou KP, Karagouni E (2012) Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 30: 5086–5093.
- Wenzel UA, Bank E, Horian C, Forster S, Zimara N, et al. (2012) *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *FASEB J* 26: 29–39.
- Fernandes AP, Coelho EAF, Machado-Codho GLL, Grimaldi JrG, Gazzinelli RT (2012) Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rationale, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol* 15: 1–10.
- Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, et al. (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1430.
- Coelho EA, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, et al. (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 71: 3988–3994.
- Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleas M, Heffer K, Mak T, et al. (1996) Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol* 157: 827–835.
- Lima MM, Sarquis O, de Oliveira TG, Gomes TF, Coutinho C, et al. (2012) Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 143–149.
- Roque AI, Xavier SC, Gerhardt M, Silva MF, Lima VS, et al. (2012) *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Vet Parasitol* 193: 71–7. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.028.
- Coelho EAF, Ramirez L, Costa MAF, Coelho VTS, Martins VT, et al. (2009) Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1774–1780.
- Zanin HH, Coelho EA, Tavares CA, Marques-da-Silva EA, Costa MMS, et al. (2007) Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9: 1070–1077.
- Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, et al. (2008) Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26: 5888–5895.
- Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CF, et al. (2008) Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8 T cells. *Vaccine* 26: 4585–4593.
- Bhowmick S, Ravindran R, Ali N (2008) gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 76: 1003–1015.
- Rachamin N, Jaffe CL (1993) Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol* 150: 2322–2331.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119: 238–258.
- Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP (2001) IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31: 2848–2856.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AI, et al. (2002) Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun* 70: 6284–6293.
- Pereira BA, Alves CR (2008) Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol* 158: 239–255.
- Garg R, Dube A (2006) Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 12: 439–454.
- Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infection. *Vaccine* 20: 59–66.
- Iborra S, Parody N, Abanades DR, Bonay P, Prates D, et al. (2008) Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect* 10: 1133–1141.
- Dumas C, Muyombwe A, Roy G, Matte C, Ouellette M, et al. (2003) Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages *in vitro* and delays disease development in mice. *Infect Immun* 71: 6499–6509.
- Murray HW, Cervia JS, Hariprasad J, Taylor AP, Stoeckle MY, et al. (1995) Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 95: 1183–1192.
- Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, de Carvalho LP, et al. (2002) Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 20: 1365–1368.
- Badaró R, Lobo I, Nakatani M, Muinos A, Netto EM, et al. (2001) Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony: a case report. *Braz J Infect Dis* 5: 223–232.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, et al. (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7845–7850.
- Afrin F, Anam K, Ali N (2000) Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *J Parasitol* 89: 730–735.
- Carrion J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, et al. (2006) Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 28: 173–183.
- Oliveira DM, Valadares DG, Duarte MC, Costa LE, Martins VT, et al. (2012) Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res* 110: 1277–1285.
- Requena JM, Iborra S, Carrion J, Alonso C, Soto M (2004) Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1505–1517.
- Ahmed S, Colmenares M, Soong I, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, et al. (2003) Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 71: 401–410.
- Mizbani A, Taheri T, Zahedifard F, Taslimi Y, Azizi H, et al. (2009) Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 28: 53–62.