

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

TATIANA MARIA INÊZ FERREIRA

Análise do potencial imunomodulador do extrato antigênico de *Pythium insidiosum* utilizando modelo murino de leishmaniose tegumentar.

Belo Horizonte
2016

TATIANA MARIA INÊZ FERREIRA

Análise do potencial imunomodulador do extrato antigênico de *Pythium insidiosum* utilizando modelo murino de leishmaniose tegumentar.

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo C. P. de Toledo – UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães – UFMG

Belo Horizonte – MG
2016

F383a Ferreira, Tatiana Maria Inêz.
Análise do potencial imunomodulador do extrato antigênico de *Pythium insidiosum* utilizando modelo murino de Leishmaniose tegumentar / Tatiana Maria Inêz Ferreira. – 2016.
92 f. : il.

Orientador: Vicente de Paulo C. P. de Toledo.
Co-orientadora: Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Leishmaniose tegumentar – Vacinas – Teses. 2. *L. major* – Teses. 3. *Pythium insidiosum* – Teses. 4. Resposta imune celular – Th1 – Teses. 5. Imunoterapia – Teses. 6. Antígenos imunomoduladores – Teses. I. Toledo, Vicente de Paulo C. P. de. II. Guimarães, Tânia Mara Pinto Dabés. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.969

Dedico esse trabalho a DEUS, minha fonte de serenidade, força e persistência.

Aos meus pais, os quais sempre me apoiaram com amor sem medidas e palavras de encorajamento. Ao meu irmão por todo carinho e torcida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais e irmão, por ser meu alicerce, o ombro amigo nos momentos de dificuldades. Obrigada por tanto zelo, carinho e incentivo. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos: Francielle, Rafaella, Ênio, Marlon, José Marcos e Murillo, os quais, alguns mesmo à distância, acompanharam o processo da dissertação. Muito obrigada por me ouvirem e por todo apoio e palavras de ânimo quando eu mais precisei. Vocês são muito especiais!

Ao meu orientador Vicente, pela oportunidade e pelo auxílio em todos os momentos de desenvolvimento da dissertação. Sua compreensão, atenção e paciência foram muito valiosas nessa caminhada de dois anos. Minha sincera gratidão!

A professora Tânia pela coorientação no trabalho, por ser sempre tão gentil e solícita. Você é um exemplo para todos nós, obrigada!

Ao Dr Leonel Mendoza por fornecer o extrato antigênico do *Pithium insidiosum* e por tantas considerações importantes acerca do trabalho.

A professora Raquel Virgínia Rocha Vilela pela oportunidade de me engajar no grupo de pesquisa em Pitiose e pelo apoio concedido durante a realização deste trabalho.

A professora Héliida Monteiro de Andrade por disponibilizar o biotério e outros meios necessários para a execução dos experimentos.

A professora Fernanda pela ajuda na execução e análise dos dados da citometria de fluxo.

Ao professor João Haddad pelo auxílio com a análise estatística.

A professora Mônica Demas pela análise histopatológica e por toda atenção.

A professora Leda Quercia por nos fornecer a cepa de *L. major*.

A Marcela pelo apoio na execução da titulação dos anticorpos, pelas dicas preciosas e pela ajuda nos experimentos.

Ao Josimar pelo auxílio com a parte estatística e pelo incentivo.

A Elida pela ajuda no trabalho, por todas as conversas de desabafo e principalmente pelas risadas. Você é uma guerreira, te admiro! A Tamara pelo seu jeito doce e atencioso e ao mesmo tempo tão cheio de força e determinação. Obrigada pelas palavras de ânimo e momentos de descontração! A amizade de vocês foi um valioso fruto do mestrado. Fico muito feliz!

A Isabela, que me acompanhou e ajudou inúmeras vezes na correria do dia a dia e na dificuldade que é conciliar trabalho com o mestrado. Não tenho palavras para te agradecer! Que DEUS te ilumine sempre. Você vai longe...estou na torcida!

Aos queridos alunos de iniciação científica: Larissa, Janaína e Pedro pela disponibilidade e ajuda nos experimentos.

A Edilene pela ajuda com a organização dos experimentos e por tantas conversas agradáveis. Que DEUS te abençoe!

A Ellen Márcia por cuidar dos animais experimentais no biotério. Descanse em paz!

A todos aqueles por ventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, meus agradecimentos!

**Provai e vede como Deus é bom,
feliz aquele que em seu amor confia. (Sl 34,9).**

RESUMO

A resposta imune efetiva na Leishmaniose Tegumentar é do tipo celular Th1. Antígenos imunomoduladores de *Pithium insidiosum* (VPI) parecem estimular tal fenótipo, de acordo com perfis celulares encontrados antes e após a imunoterapia em humanos e animais com pitiose. Nesse estudo, avaliou-se o potencial de a VPI atuar como imunoterápico ou agente vacinal na infecção tegumentar causada por *L. major* em camundongos da linhagem BALB/c. Além disso, determinou-se o fenótipo de células esplênicas após imunização com a VPI; quantificou-se citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos murinos, bem como aquelas presentes no sobrenadante do cultivo celular e avaliou-se a resposta imune humoral. Os resultados mostraram que a VPI revelou um perfil eletroforético estável e não degradado e que apesar de não ter impedido o surgimento de lesões nos animais, houve redução do tamanho e no tempo de desenvolvimento das mesmas. Na análise por citometria de fluxo, observou-se no ensaio de marcação “ex vivo” de células esplênicas, que no grupo imunizado a quantidade de linfócitos foi maior que no grupo controle, assim como em relação aos fenótipos CD4⁺ e CD8⁺. Já a marcação de citocinas intracitoplasmáticas de esplenócitos cultivados por 72 horas sob estímulo antigênico revelou, qualitativamente, maior produção de IFN γ em relação a IL-10, e que, a principal fonte de IFN- γ foi de células T CD8. A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células estimuladas *in vitro*, evidenciou maior produção de INF γ , seguida de IL-4, IL-2 e IL-10, revelando um perfil misto de citocinas, com tendência a polarização para Th1. A imunidade humoral avaliada pela dosagem de IgG no plasma dos animais imunizados revelou baixos títulos, sugerindo sua menor importância no controle da infecção. Este perfil imunológico foi em parte descrito em outros estudos de proteção vacinal eficaz. O sucesso da terapia em animais e pacientes com o uso da VPI em casos de pitiose fornecem evidências suficientes para maiores investigações do seu papel imunomodulador na leishmaniose, assim como em outros tipos de infecções causadas por patógenos intracelulares.

Palavras-chave: Leishmaniose, *L. major*, *Pythium insidiosum*, resposta imune celular, Th1, imunoterapia.

ABSTRACT

The effective immune response in Cutaneous Leishmaniasis is the cell type Th1. *Pythium insidiosum*'s immunomodulators antigens (VPI) appears to stimulate this phenotype, according to cell profiles found before and after immunotherapy in humans and animals with pythiosis. In this study, we evaluated the potential of the VPI act as immunotherapy or vaccine agent in cutaneous infection caused by *L. major* in BALB/c mice. Furthermore, it determined the phenotype of splenic cells after Immunization with VPI, intracytoplasmic cytokines in murine splenocytes were quantified as well as those present in the supernatant of the cell culture and the humoral immune response was evaluated. The results showed that the VPI revealed a stable electrophoretic profile and not degraded and that despite not having prevented the appearance of lesions in animals, there was a reduction in the size and in the development time of them. In the analysis by flow cytometry, it was observed on the "ex vivo" assay of spleen cells that in the immunized group the number of lymphocytes was higher in the control group, as well as the phenotypes CD4+ e CD8+. The intracytoplasmic cytokine of splenocytes cultured for 72 hours under antigenic stimulation revealed, qualitatively, IFN γ higher production compared to IL-10, and that the primary source of IFN γ was CD8 T cells. The in vitro dosage of cytokine in the cell culture supernatant of stimulated cells showed greater production of IFN γ , followed by IL-4, IL - 2 and IL - 10, revealing a mixed cytokine profile, tending to Th1 polarization. The humoral response assessed by IgG dosage of plasma in the immunized animals revealed low titers, suggesting a minor importance of it in infection control. This immunological profile was partly described in other effective vaccine protection studies. The success of therapy in animals and patients with the use of VPI in cases of Pythiosis provide sufficient evidence for further investigations of its immunomodulatory role in leishmaniasis as well as in other types of infections caused by intracellular pathogens.

Keywords: Leishmaniasis, *L. major*, *Pythium insidiosum*, cellular immune response, Th1, immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hipótese das propriedades curativas da VPI.....23
Figura 2	Eletrforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul de Coomassie. Canaleta 1 – Padrão de massa molecular (kDa), SDS-6H – Sigma Aldrich. Canaleta 2 – Extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i>53
Figura 3	Eletrforese em gel de poliacrilamida corada pelo método do nitrato de prata. Canaleta 1 - Padrão de massa molecular (kDa), SDS-6H – Sigma Aldrich. Canaleta 2 – Extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i>54
Figura 4	Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c imunizados e tratados com extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i> e desafiados com 1×10^7 promastigotas de <i>L. major</i>55
Figuras 5 e 6	Aspectos macroscópicos das patas (seta) infectadas de camundongos pertencentes ao grupo controle na terceira semana pós-infecção.....56
Figuras 7, 8 e 9	Aspectos macroscópicos das patas infectadas (seta) de camundongos pertencentes ao grupo imunizado, na terceira semana pós-infecção.....56
Figuras 10 e 11	Aspectos macroscópicos das patas (seta) infectadas de camundongos pertencentes ao grupo tratado após o desafio, na terceira semana pós-infecção.....56
Figura 12	Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo imunizado, na sétima semana pós-infecção.....57
Figura 13	Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo tratado, na quinta semana pós-infecção.....57
Figura 14	Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo imunizado, na décima primeira semana pós-infecção.....58
Figura 15	Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata não infectada de camundongo, exibindo tecidos subcutâneo, muscular estriado e ósseo normais. Ausência de leishmanias ou processo inflamatório. Coloração: Método HE, aumento 100X.....59
Figura 16	Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata de camundongo do grupo imunizado exibindo tecidos subcutâneo, muscular estriado e ósseo com intenso processo inflamatório. Coloração: Método HE, aumento 40X.....59
Figura 17	Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida de pata de camundongo do grupo imunizado exibindo epiderme, derme e subcutâneo. Presença de áreas de necrose com processo inflamatório (setas). Coloração: Método HE, aumento

	100X.....	60
Figuras 18 e 19	Fotomicrografias de detalhe de uma das áreas de necrose (seta na Fig. 18) da derme e subcutâneo com processo inflamatório do grupo imunizado. Coloração: Método HE, aumento 200X e imagem ampliada da mesma área em coloração pelo Giemsa para visualização de formas amastigotas de leishmanias no interior de macrófagos e dispersas no interstício (setas na Fig 19) em aumento de 1000x.....	60
Figuras 20, 21 e 22	– Fotomicrografias de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata de camundongo do grupo controle exibindo ninhos de formas amastigotas de leishmanias na derme e subcutâneo (setas) e processo inflamatório. Coloração pela HE, aumentos de 200X, 400X e 1000X.....	61
Figura 23	Exemplo de gráfico de FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular) em células mononucleares esplênicas com delimitação na região linfocitária.....	62
Figura 24	Aquisição de janela para células CD3 ⁺	63
Figura 25	Aquisição de janelas para células CD4 ⁺ e CD8 ⁺	63
Figura 26	Porcentagem de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ presentes em células esplênicas de camundongos BALB/c dos grupos controle e grupo imunizado sem estímulo antigênico.....	64
Figura 27	Porcentagem de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtoras de IL-10 e INF γ presentes no cultivo de células esplênicas de animais do grupo controle (sem estímulo) e do grupo imunizado (com estímulo de 30 μ g/ml de <i>P. insidiosum</i>).....	65
Figura 28	Valores de D.O. para IFN γ	66
Figura 29	Valores de D.O. para IL-2.....	67
Figura 30	Valores de D.O. para IL-4.....	68
Figura 31	Valores de D.O. para IL-10.....	69
Figura 32	Valores de D.O. para IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-10.....	70
Figura 33	Avaliação dos níveis de anticorpos IgG no soro de camundongos Balb/c imunizados com extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i> por reação imunoenzimática indireta.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos anti CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e seus respectivos fluorocromos	49
Tabela 2 - Anticorpos anti INFγ e anti IL-10 e seus respectivos fluorocromos.....	51
Tabela 3 - Resultados da avaliação histopatológica nos diferentes grupos experimentais....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Células apresentadoras de antígenos
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMI	Imunidade mediada por células
CTL	Células citotóxicas
DC	Células dendríticas
DHT	Hipersensibilidade tardia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O	Densidade óptica
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LACK	Quinase C ativada por leishmania
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicanos
LV	Leishmaniose visceral

mDC	Células dendríticas derivadas de monócitos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MPL	Monofosforil lipídeo A
NETS	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NK	Natural killers
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKLD	Leishmaniose dérmica pós calazar
RINs	Reativos intermediários de nitrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
Sb	Estibogliconato de sódio
TCD4	Linfócitos T helper
TCD8	Linfócito T citotóxico
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
Th	T helper
TLR	Receptores Tool like
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VPI	Vacina do <i>Pythim insidiosum</i>
WB	Western blot
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Pitiose.....	17
2. Aspectos imunológicos da pitiose: o potencial imunomodulador dos antígenos do <i>P. insidiosum</i>	19
2.1 Imunoterapia em animais portadores de pitiose.....	19
2.2 Imunoterapia em humanos infectados por <i>P. insidiosum</i>	21
3. Resposta imune induzida pela VPI	22
4. O uso do extrato do <i>Pythium insidiosum</i> como agente imunoterápico	24
5. Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar: modelo experimental para estudo da VPI como imunomodulador	24
5.1 Tratamento da leishmaniose e medidas de controle	27
5.2 Modelos murinos para <i>Leishmania major</i>	28
6. Imunidade Inata na Leishmaniose Tegumentar	28
7. Imunidade Adaptativa na Leishmaniose Tegumentar.....	30
7.1 O papel das citocinas envolvidas na imunidade da Leishmaniose Tegumentar	32
8. Vacinas utilizadas para Leishmaniose Tegumentar	33
8.1 Vacinas de Primeira Geração	34
8.2 Vacinas de Segunda Geração	35
8.3 Vacinas de terceira geração	35
9. Imunoterapia para leishmaniose: casos de sucesso	36
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVO GERAL.....	41
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
6. MATERIAIS E MÉTODOS	43
6.1 Animais selecionados	43
6.2 Parasitas.....	43
6.3 Obtenção do extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i>	44
6.4 Esterilização do extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i>	44
6.5 Dosagem de proteínas.....	44
6.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	45
6.7 Protocolo de imunização e infecção desafio	45
6.7.1 Imunização de camundongos com extrato de <i>P. insidiosum</i>	45
6.7.2 Imunoterapia de camundongos desafiados com promastigotas de <i>L. major</i>	46
6.7.3 Grupo controle	46

6.8 Estudo histopatológico	46
6.9 Estudos imunológicos	47
6.9.1 Imunização de camundongos BALB/c.....	47
6.9.2 Obtenção de amostras de soro	47
6.9.3 Isolamento e cultura de esplenócitos	48
6.9.4 Caracterização Imunofenotípica dos linfócitos esplênicos.....	48
6.9.5 Detecção intracitoplasmática das citocinas IFN- γ e IL-10 produzidas por células esplênicas sob estímulo do extrato antigênico de <i>Pythium insidiosum</i>	49
6.9.6 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células esplênicas.....	51
6.9.7 Avaliação da produção de anticorpos no soro dos camundongos imunizados com extrato de <i>P. insidiosum</i>	51
6.10 Análise Estatística.....	52
7. RESULTADOS	53
7.1 Eletroforese do extrato antigênico de <i>P. insidiosum</i>	53
7.2 Medidas das lesões	54
7.3 Aspecto macroscópico das lesões	55
7.4 Estudo Histopatológico	58
7.5 Caracterização imunofenotípica de células esplênicas de camundongos BALB/c após imunização com a VPI	62
7.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas	65
7.6.1 – Dosagem de IFN- γ	66
7.6.2 – Dosagem de IL-2	66
7.6.3 – Dosagem de IL-4	67
7.6.4 – Dosagem de IL-10	68
7.7 Dosagem de anticorpos IgG em soro de animais imunizados e controle	70
8. DISCUSSÃO.....	72
9. CONCLUSÃO	80
10. PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no uso de animais	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pitiose

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies diferentes, sendo a maior parte composta por patógenos de vegetais, muitas vezes causadores de severos prejuízos em lavouras. (SANTURIO *et al.*, 2006). Apenas a espécie *Pythium insidiosum* é conhecida como o agente etiológico da pitiose em mamíferos (GAASTRA *et al.*, 2010).

Kaufman *et al.* (1998) classificam o *P. insidiosum* como um organismo parecido com um fungo pertencente ao reino *Straminipila*, filo *Oomycota*, classe *Oomycetes*. Estudos taxonômicos baseados em análise de sequenciamento de genes do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal de *P. insidiosum*, demonstraram que os membros da classe *Oomycetes* são filogeneticamente distantes dos membros do reino *Fungi*. Ao nível celular essa diferença é pronunciada pela composição da parede e membrana celulares. Nos fungos a parede celular é composta por um polissacarídeo, a quitina, enquanto nos oomicetos os componentes predominantes são a celulose e β -glucana. Em relação à composição da membrana celular, o ergosterol, principal esteroide dos fungos, não está presente nos oomicetos (SANTURIO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013).

A pitiose ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo que o patógeno possui uma preferência ecológica por áreas alagadas. Sua frequência é maior em animais, porém tem sido diagnosticada cada vez mais em humanos. A doença já foi descrita em uma variedade de mamíferos nas Américas do Norte, Central e do Sul, na Ásia, Austrália, Nova Zelândia e ilhas Caribenhas (KAUFMAN, 1998).

O ciclo do *P. insidiosum* baseia-se na colonização de plantas aquáticas, onde se desenvolve e reproduz. Os zoósporos livres na água, liberados pelos zoosporângios, podem encontrar outra planta ou então animais ou humanos (GARCIA; PASTOR; MENDOZA, 2007). Ao penetrarem o tecido do hospedeiro, os zoósporos se encistam e emitem um tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e assim, completam seu ciclo. Após o encistamento, os zoósporos liberam uma substância amorfa que provavelmente tem a função de promover a adesão

entre o patógeno e o tecido (SANTURIO *et al.*, 2006; MENDOZA, HERNANDEZ, AJELLO, 1993).

Mendoza, Hernandez e Ajello (1993) demonstraram em testes *in vitro* que existe um tipo de atração quimiotática entre o *P. insidiosum* e plantas, pelo de humanos, pele e pelo de equinos. Entretanto, estudos usando plantas vivas precisam ser conduzidos para confirmar a hipótese de que o patógeno infecta plantas, como fazem outros membros do seu gênero. Além disso, acredita-se que o *P. insidiosum* não tem a capacidade de penetrar em tecidos intactos. Portanto, sua invasão depende de alguma porta de entrada na pele do hospedeiro (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Outro fato curioso e até mesmo intrigante baseia-se em achados de que as espécies infectadas de modo geral com *P. insidiosum* são resistentes a infecção experimental com o patógeno. Na verdade, o único modelo animal susceptível à pitiose experimental é o coelho. Provavelmente a infecção em hospedeiros naturais requer elementos especiais desconhecidos para seu desencadeamento (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Ovinos, bovinos, felinos e aves já foram acometidos pela doença, inclusive animais em cativeiro como camelos, ursos e onça-pintada. (GAASTRA *et al.*, 2010). Entretanto, os animais mais acometidos pela doença são os equinos, seguidos pelos cães (SANTURIO *et al.*, 2006).

As infecções por *P. insidiosum* são caracterizadas pela presença de hifas esparsamente septadas e irregularmente ramificadas dentro de lesões piogranulomatosas eosinofílicas (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; SANTURIO *et al.*, 2006). A forte degranulação dos eosinófilos (fenômeno de Splendore- Hoeppli) circundando as hifas pode levar à formação, apenas em equinos, de massas endurecidas conhecidas como “Kunkers” localizadas nas lesões nodulares e ulcerativas (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003). Já a infecção em humanos é mais rara e a maioria dos casos (80%) foi descrita na Tailândia (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Atividades ligadas à agricultura e ao lazer aquático são consideradas fatores predisponentes para a pitiose humana, assim como uma hemoglobinopatia de alta incidência na Tailândia, a talassemia. A doença em humanos já foi descrita também na Austrália, Brasil, Nova Zelândia, Haiti, Malásia e Estados Unidos da América (EUA) (GAASTRA *et al.*, 2010).

Três formas clínicas de pitiose humana já foram descritas na literatura:

1. Lesões ulcerativas e granulomatosas envolvendo a pele e tecidos subcutâneos;
2. Pitiose oftálmica, podendo causar queratite;
3. Pitiose sistêmica com envolvimento vascular, podendo causar vasculite, trombose e aneurismas; (MENDOZA; NEWTON, 2005; JIMÉNEZ *et al.*, 2013).

Os tratamentos preconizados consistem na remoção cirúrgica da lesão, a qual nem sempre é indicada dependendo do sítio e extensão da mesma; uso de drogas antifúngicas, embora possuam eficácia reduzida, uma vez que o *P. insidiosum* não possui ergosterol na membrana celular e mais recentemente está sendo indicada a imunoterapia como um tratamento promissor (PEREIRA *et al.*, 2013; SANTURIO *et al.*, 2006).

2. Aspectos imunológicos da pitiose: o potencial imunomodulador dos antígenos do *P. insidiosum*

Os antígenos liberados pelas hifas do *P. insidiosum* no tecido do hospedeiro desencadeiam uma reação inflamatória com predominância de eosinófilos, mastócitos, macrófagos, células plasmáticas e alguns linfócitos. Muitas vezes, as hifas são encontradas no interior de granulomas ou nos “kunkers” e possivelmente essa é uma estratégia do patógeno para se camuflar, pois dessa forma evita a apresentação da totalidade de seus antígenos às células dendríticas e uma resposta imune eficaz (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Dessa forma, acredita-se que a degranulação dos eosinófilos está intimamente relacionada ao dano tecidual observado em animais e humanos e à permanência das hifas no tecido hospedeiro através do mecanismo de evasão do sistema imune (MENDOZA; NEWTON, 2005).

2.1 Imunoterapia em animais portadores de pitiose

As propriedades terapêuticas da vacina do *P. insidiosum* (VPI) foram descobertas ao acaso durante investigações que avaliavam testes intradérmicos em

equinos. Os animais infectados que receberam a injeção de imunógenos do *P. insidiosum* progrediram para a cura da pitiose, com exceção dos casos crônicos.

Depois desse fato, novas formulações da VPI foram introduzidas e testadas em animais. Em uma dessas formulações foram adicionados antígenos citoplasmáticos aos exoantígenos já utilizados e essa mistura demonstrou uma taxa de cura de 72% em 26 equinos, incluindo casos crônicos. A VIP não apresentou, entretanto, bons resultados no caso de cães (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Apesar de haver na literatura alguns relatos de casos sobre a cura de cães tratados com imunoterápico, a discrepância nos resultados do tratamento entre equinos e os mesmos merece estudos adicionais (SANTURIO *et al.*, 2006; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Durante o estudo usando a formulação da VPI com antígenos citoplasmáticos, cães e equinos receberam duas doses de 100µl da vacina com intervalo de 15 dias: a primeira dose se deu por inoculação intradérmica no pescoço e a segunda por via subcutânea. Alguns animais foram selecionados para fornecer amostras sanguíneas antes e depois da inoculação da vacina e verificou-se que os altos título iniciais de IgE diminuíram após 3 meses de tratamento. Outro equino, curado após tratamento com a VPI, foi selecionado para a realização da análise histopatológica por meio de uma série de biópsias. O resultado das mesmas demonstrou que os eosinófilos foram gradualmente substituídos por macrófagos e linfócitos após o tratamento. Além disso, foram demonstradas hifas degeneradas nos tecidos do animal após 7 dias de tratamento e seu desaparecimento após 15 dias da primeira dose da VPI (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

No mesmo ano que Mendoza, Mandy e Glass (2003) publicaram seus resultados usando a VIP, Santurio *et al.*, (2003) testaram três diferentes tipos de formulações de imunoterápico em coelhos, os quais variavam quanto ao modo de preparo. A cepa do oomiceto foi recuperada da lesão de um potro e foi então cultivada em ágar de amido de milho 1,5% (p/v) por sete dias. Posteriormente, adicionou-se grama (*Paspallum notatum*) ao meio de cultura para obtenção dos zoósporos. Os mesmos foram contados em câmara de Neubauer e inoculados em 1mL via subcutânea no dorso dos coelhos (17,500 zoosporos/ml).

Demonstrou-se que o imunoterápico preparado em vortex, seguido da liofilização apresentou proteção estatisticamente significativa quando comparada aos outros dois tipos de imunoterápicos preparados por sonicação e pela

combinação da sonicação e vortex. Os autores atribuem a baixa eficácia da sonicação à possível desnaturação de antígenos durante o procedimento.

Além de avaliar os três tipos de preparo do imunógeno, Santurio *et al.* (2003) sugerem também que a resposta à imunoterapia pode ser monitorada satisfatoriamente usando o modelo animal em coelhos, já que ainda não foi possível reproduzir a enfermidade através de infecção experimental nos animais infectados naturalmente.

Dessa forma, tais estudos e seus achados corroboram o conceito da imunomodulação induzida por diferentes antígenos do *P. insidiosum* na pitiose equina.

2.2 Imunoterapia em humanos infectados por *P. insidiosum*

Em humanos, o primeiro caso de imunoterapia ocorreu na Tailândia em uma criança do sexo masculino que apresentava a forma arterial grave da doença, não responsiva ao tratamento com antifúngicos como anfotericina B, iodetos e cetoconazol, além de cirurgia. Foram administradas na criança, de forma experimental, duas injeções de 100µl da VPI com intervalos de 14 dias. Como desfecho o paciente apresentou uma recuperação surpreendente, com desaparecimento das dores de cabeça, diminuição do edema facial e do linfonodo cervical e melhora significativa da estenose da artéria carótida afetada. Não houve relatos de efeitos colaterais e a criança foi considerada curada após um ano do tratamento (MENDOZA; NEWTON, 2005; THITITHANYANONT *et al.*, 1998).

Wanachiwanawin *et al.* (2004) realizaram um estudo usando a VPI em oito pacientes portadores da forma vascular grave da pitiose, que não responderam a outros tratamentos. Nestes pacientes também foram administradas duas injeções do imunoterápico de 100 a 200µl (2mg/ml) com intervalo de 14 dias. Quatro pacientes (50%) foram curados pela imunoterapia e não apresentaram evidências de infecção residual após acompanhamento por mais de 24 meses. Outros dois pacientes apresentaram bons resultados iniciais, porém posteriormente houve recorrência da infecção. Os outros dois pacientes restantes, não responderam ao tratamento e vieram a óbito.

Estudos imunológicos demonstraram que antes da vacinação os níveis de IL-4 e IL-5 foram maiores que os níveis de IL-2, em um mesmo paciente. Depois de um mês, os níveis de IL-4 e IL-5 diminuíram e de IL-2 aumentaram. Já os níveis de IgE dosados por ensaio imunoenzimático (ELISA), imediatamente após a primeira dose do imunoterápico foram 1:6400 (cut off de 1:800), enquanto nos sete meses seguintes houve diminuição para 1:400, coincidindo com a recuperação clínica do paciente. Com esse trabalho, Wanachiwanawin *et al.*, (2004) demonstraram que a imunoterapia usando antígenos citoplasmáticos mostrou-se eficaz inclusive em casos crônicos da doença em humanos, diferentemente do que era proposto, pois acreditava-se que a vacina só era satisfatória em casos recentes da infecção.

Além disso, os achados sorológicos estão de acordo com um modelo proposto por Mendoza, Mandy e Glass (2003) no qual defendem a hipótese de que ocorre uma mudança na resposta imune de T helper (Th) 2 para Th1 após o tratamento com o imunoterápico, a qual estaria diretamente ligada ao sucesso do tratamento.

3. Resposta imune induzida pela VPI

Baseado nos perfis celulares antes e após a imunoterapia em humanos e animais foi proposto um modelo da resposta imunológica envolvida no processo de cura da pitiose (**Figura 1**). Os autores defendem a hipótese de que dois tipos de antígenos do *P. insidiosum* estimulariam a resposta imune de forma diferenciada.

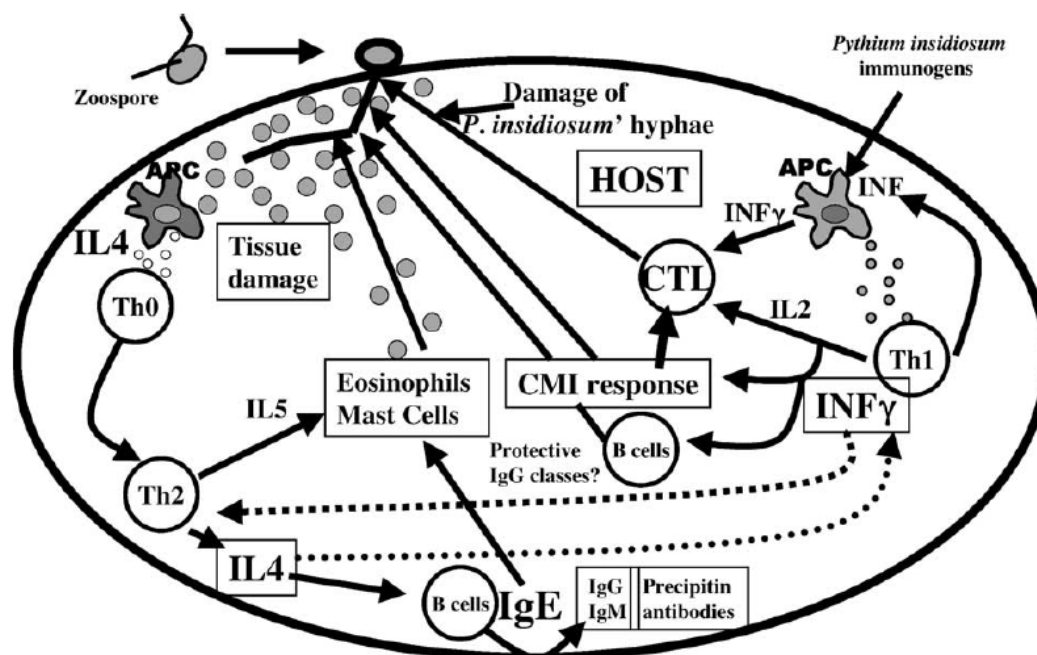
Os exoantígenos são expressos *in vivo* e parecem induzir a resposta imune para o perfil Th2 durante a infecção natural, enquanto os antígenos citoplasmáticos parecem estimular o sistema imune do hospedeiro no sentido de uma resposta curativa Th1 (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Segundo Mendoza, Mandy e Glass (2003), durante a infecção natural os exoantígenos liberados pelas hifas seriam reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos (APC). As mesmas liberariam IL-4 que induziria uma mudança das células nativas Th0 para Th2. Essa mudança culminaria em maior produção de IL-4 e IL-5. A IL-4 diminui a resposta Th1 e estimularia a produção de IgE, IgM e IgG pelos linfócitos B. A IL-5 e a IgE estimulam a ativação de eosinófilos e mastócitos envolvidos na lesão tecidual.

Quando a VPI contendo antígenos citoplasmáticos é administrada, tanto em animais como em humanos, há um grande aumento nas suas propriedades curativas. Diferentemente do que ocorre na infecção natural, após o reconhecimento dos antígenos citoplasmáticos as APC produzem interferon gama ($IFN\gamma$), o qual induziria uma mudança do perfil Th0 para o Th1. Com a polarização da resposta Th1, mais $IFN\gamma$ é produzido, assim como IL-2, e os mesmos estão envolvidos no estímulo de uma resposta imune mediada por células – composta por linfócitos T supostamente citotóxicos e macrófagos que destroem as hifas. Além disso, a produção de $IFN\gamma$ resulta em diminuição da resposta imune Th2 (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

Ainda não está claro se durante a imunoterapia a IL2 e o $IFN\gamma$ estimulam as células para produção de IgG. Sua ação protetora contra a pitiose após a imunoterapia ainda precisa ser melhor investigada. Entretanto, a possibilidade da participação da imunidade humoral na cura de equinos tratados por imunoterapia por mais de 18 meses já foi sugerida (MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003; MENDOZA; NEWTON, 2005).

Figura 1 - Hipótese das propriedades curativas da VPI.



Setor superior esquerdo: representação o início da infecção natural. O hospedeiro entra em contato com propágulos (geralmente zoósporos, mas pode ser qualquer elemento da hifa). Setor superior direito: representação da imunomodulação pela VPI. CMI (cellular mediated

immunity) e CTL (citotoxic mediate immunity). Adaptado de MENDOZA; MANDY; GLASS, 2003).

4. O uso do extrato do *Pythium insidiosum* como agente imunoterápico

De acordo com o exposto acima, a indução da resposta para o fenótipo Th1 estimula uma resposta imune do tipo celular, que provavelmente está envolvida na eliminação do patógeno do tecido hospedeiro e conseqüente cura da pitiose.

Achados de Mendoza e Newton (2005) indicam que a imunoterapia utilizando a VPI com a mistura de exoantígenos e antígenos citoplasmáticos é inócua, tanto em animais quanto em humanos. Ademais, os autores relatam uma possível ocorrência de imunomodulação e uma taxa de cura de 60% dos equinos tratados pela VPI.

Tendo em vista tais achados de segurança e eficácia e o potencial indutor de uma resposta Th1, a qual é altamente favorável ao controle de infecções causadas por patógenos intracelulares, propomos avaliar neste estudo a imunidade induzida pela VPI na leishmaniose tegumentar murina, utilizando *L. major* como modelo de infecção experimental.

5. Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar: modelo experimental para estudo da VPI como imunomodulador

O agente etiológico da leishmaniose pertence ao gênero *Leishmania*, à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. São protozoários unicelulares, heteroxenos, que podem apresentar-se nas seguintes formas: promastigotas e paramastigotas ou amastigotas. Estes são arredondados, desprovidos de flagelos e são parasitas intracelulares; aqueles são alongados e flagelados, encontrados no tubo digestivo do vetor invertebrado (GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose faz parte das doenças ditas negligenciadas e está presente nos cinco continentes mundiais, sendo que sua distribuição é mais concentrada em determinadas regiões. Ela é endêmica em 98 países e, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), mais de 350 milhões de pessoas encontram-se expostas

ao risco de contrair a doença. Além disso, estima-se a ocorrência de cerca de 1.3 milhões de novos casos da infecção anualmente (WHO, 2010; WHO, 2015).

Estima-se também que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, enquanto mais de 90% dos casos da forma cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, República Islâmica do Irã, Arábia Saudita, República Árabe da Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (WHO, 2010).

Entretanto, tais dados provavelmente são subestimados uma vez que a doença não é notificada em todos os países endêmicos. Ademais, muitos casos ocorrem em regiões de difícil acesso à assistência médica, enquanto outros não são diagnosticados e/ou são assintomáticos (OKWOR *et al.*; 2012).

A leishmaniose pode ser agrupada em duas categorias principais de acordo com a fonte da infecção: a forma zoonótica, em que os reservatórios são animais (selvagens ou domésticos) e a forma antroponótica, na qual os reservatórios são os humanos (WHO, 2010).

Os hospedeiros vertebrados mais comumente relacionados à leishmaniose são os roedores, canídeos, felinos e outros mamíferos. (NEUBER, 2008; GILL; GILL, 2013). Já os hospedeiros invertebrados, responsáveis pela transmissão do agente, são as fêmeas de insetos hematófagos, cujos dois principais gêneros são: *Lutzomia*, característico vetor do “Novo Mundo” e *Phlebotomus*, o qual é encontrado no “Velho Mundo” (GOTO; LINDOSO, 2012).

A doença pode ser classificada em três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e a mais agressiva delas, a leishmaniose visceral ou calazar (LV) (OKWOR *et al.*, 2012). A LC geralmente é caracterizada por uma única lesão de bordas elevadas e centro necrótico e pode ser curada espontaneamente, enquanto a forma cutaneomucosa atinge o septo nasal e pode causar desfiguração desta região anatômica. A LV pode atingir vários órgãos e é caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, sudorese, e hepatoesplenomegalia. Desta forma, se não tratada, muitas vezes é fatal (OLIVEIRA *et al.*, 2004; GILL; GILL, 2013).

A forma cutânea difusa (LCD), mais rara, produz múltiplas lesões paponodulares não ulcerativas ou infiltrativas pelo corpo. (AMEEN, 2010). Já a forma dérmica pós calazar (PKLD), ocorre anos após o tratamento da forma visceral,

em que aparecem pápulas ou máculas no corpo do paciente, considerado neste estágio como reservatório da doença (STEBUT, 2015).

As diversas formas da doença estão relacionadas aos diferentes subgêneros e espécies do patógeno. O mesmo é válido para a resolução clínica da infecção, que depende também da virulência do vetor, além da resposta imunológica do hospedeiro (AMEEN, 2010).

A classificação taxonômica estabelecida por Laison e Shaw tem sido extensamente usada e baseia-se na divisão das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros de acordo com o local de desenvolvimento do parasita no vetor invertebrado: *Leishmania* e *Viannia*, os quais incluem aproximadamente 20 espécies. O primeiro tipo é encontrado tanto no Velho como no Novo Mundo, enquanto o subgênero *Viannia* é encontrado somente no Novo Mundo (WHO, 2010).

As formas tegumentares da doença são geralmente causadas pelos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis* na América e *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum* e *L. donovani* no Velho Mundo. Já a forma visceral é causada pela espécie *L. donovani* na África, Índia e Ásia; *L. chagasi* na América e *L. infantum* no Mediterrâneo (GILL; GILL, 2013; WHO, 2010).

A *L. amazonensis* e a *L. braziliensis* são as espécies cutâneas de maior interesse médico no Brasil devido à gravidade e alta incidência, respectivamente. A primeira espécie pode causar a forma cutânea difusa e a segunda pode causar a forma mucocutânea (DANTAS *et al.*; 2013).

O ciclo da doença ocorre da seguinte maneira: o parasita é transmitido pelo flebotomíneo, o qual inocula promastigotas metacíclicos juntamente com alguns componentes salivares durante o repasto sanguíneo. Os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos, onde se transformam em amastigotas e multiplicam-se. Eventualmente, os macrófagos se rompem e liberam os parasitas que irão infectar novos fagócitos. O vetor, ao alimentar-se de um hospedeiro infectado suga os amastigotas e, dessa forma, o ciclo se completa (KAYE; SCOTT, 2011; STEBUT, 2015).

5.1 Tratamento da leishmaniose e medidas de controle

A escolha da terapia para leishmaniose depende do grau de evidência, da distribuição geográfica, das manifestações clínicas, do tamanho e número das lesões e da espécie do parasita (WHO, 2010).

Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime, Sanofi-Aventis) e estibogluconato de sódio (Pentostan, GlaxoSmithKline), são considerados tratamento de primeira escolha. Entretanto, são associados a casos de toxicidade, efeitos adversos, são contra-indicados em mulheres grávidas e em pacientes cardíacos e renais; além disso, há relatos de resistência a tais fármacos (CROFT *et al.*, 2006; MAYRINK *et al.*, 1992; OKWOR *et al.*, 2012; TOLEDO *et al.*, 2001).

As alternativas viáveis ao tratamento de primeira escolha consistem no uso da paromicina, pentamidina, miltefosina, anfotericina, azólicos, rifampicina e sitamaquine. Contudo, estes são fármacos de uso limitado devido a diferentes fatores: casos de toxicidade, efeitos adversos, alto custo, potencial de resistência, tratamento demorado, via de administração e eficácia inadequada. Há ainda outras opções de tratamento, como uso tópico de alguns agentes contra a forma cutânea da doença, como o imiquimod, assim como técnicas baseadas na terapia fotodinâmica, na termo e crioterapia (EL-ON, 2009; AMEEN, 2010; ELMAHALLAWY; AGIL, 2015; STEBUT, 2015; SIMON, 2008).

Combinações de fármacos ou de fármacos e imunoterápicos têm sido extensivamente estudadas como alternativas terapêuticas para pacientes mais fragilizados, que apresentam contraindicações e para pacientes imunossuprimidos. Tais estratégias vêm demonstrando resultados positivos promissores (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

Já as medidas de controle da doença se baseiam na prevenção do contato entre o homem e os vetores. Atualmente, a leishmaniose também causa preocupação em áreas não endêmicas da doença, tendo em vista o grande fluxo de mobilidade da população, principalmente entre ecoturistas e militares. Conseqüentemente, o conhecimento do ciclo de transmissão de diferentes espécies do parasita, assim como dos principais vetores e reservatórios associados à doença em áreas específicas, é de extrema importância para determinar questões

epidemiológicas, de tratamento, controle e prevenção da doença (GOTO; LINDOSO, 2012; STEBUT, 2015).

5.2 Modelos murinos para *Leishmania major*

O modelo murino da infecção por *L. major* é um dos mais estudados acerca dos mecanismos imunológicos que contribuem para o controle do patógeno intracelular (LIESE *et al.*, 2008).

Os camundongos BALB/c são amplamente usados em experimentos por serem altamente susceptíveis à doença. Eles desenvolvem úlceras severas que não se curam no sítio da inoculação e acabam, portanto, morrendo devido à metástase das lesões. Já os animais das cepas C3H/He, CBA, 129Sv/Ev e C57BL/6 são resistentes à infecção por *L. major*. Eles desenvolvem pequenas lesões que curam dentro de 10 a 12 semanas (OLIVEIRA *et al.*, 2004; MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995).

Os estudos com modelos animais possibilitaram a determinação de vários mecanismos envolvidos na patogênese da doença. Aspectos da imunidade inata e adaptativa foram propostos e alguns conceitos já estão bem estabelecidos, como, por exemplo, a necessidade primordial de uma resposta imunológica do tipo celular, perfil Th1, para o controle da doença.

6. Imunidade Inata na Leishmaniose Tegumentar

Nos seres humanos, a forma tegumentar da doença causada pela *L. major* geralmente culmina na cura espontânea da úlcera no sítio da picada e no desenvolvimento de imunidade protetora em longo prazo. Fatores como idade, status nutricional, gravidez e coinfeções, como por exemplo, pelo HIV, contribuem para a severidade da doença (KHARAZMI *et al.*, 1999; BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

As células que compõem o sistema imune inato, como as células dendríticas (CD), neutrófilos, células exterminadoras naturais (NK) e macrófagos, são células efetoras que se orquestram para tentar eliminar o patógeno em um primeiro contato. Funções como fagocitose, apresentação de antígenos, produção de sinais bioquímicos e até mesmo o extermínio do microorganismo podem ser elencados

como alguns dos mecanismos usados por essas células na imunidade inata (BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

Acredita-se que os neutrófilos são as primeiras células que entram em contato com os promastigotas, atuando na exterminação dos patógenos intracelulares após a fagocitose (OKWOR *et al.*, 2012). Contudo, um estudo em modelo animal demonstrou que em alguns casos as promastigotas conseguem sobreviver dentro dos fagossomos dos neutrófilos e os mesmos contribuiriam para a disseminação das promastigotas para outras células e tecidos do organismo (KAYE; SCOTT, 2011).

Como a população de células no local da inoculação do parasita não é muito grande há provavelmente recrutamento de novas células para o local, onde os monócitos podem se diferenciar em células dendríticas, que também são células fagocíticas e podem produzir citocinas (OKWOR *et al.*, 2012).

Entretanto, evidências indicam que os macrófagos são as células hospedeiras definitivas e é no seu interior que o parasita se multiplica e pode sobreviver durante longo período. (MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995) Assim, na leishmaniose, os macrófagos desempenham um duplo papel: são responsáveis pela morte do patógeno e funcionam como o mais importante sítio de replicação do mesmo (OKWOR *et al.*, 2012).

Por conseguinte, um dos maiores desafios do parasita durante um primeiro contato é estabelecer uma infecção duradoura no interior dos macrófagos sem, entretanto, ativar a defesa antimicrobiana inata dessas células (KAYE; SCOTT, 2011).

O reconhecimento do patógeno geralmente ocorre via receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Os mesmos reconhecem substâncias na membrana dos microorganismos conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno ou PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) como não próprias e potencialmente perigosas. Uma família de RRP envolvida na leishmaniose e outras parasitoses é a dos receptores do tipo TOLL ou TLR (TOLL like receptors) (BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

A ativação dos TLR2s em infecções por *Leishmania spp* tem sido relacionada aos lipofosfoliglicanos (LPG) presentes em sua superfície. Tal ativação, mediada através da molécula adaptadora MyD88, resulta na expressão de genes que levam à produção de citocinas inflamatórias efetoras da resposta imune contra o patógeno. Estudos com camundongos deficientes em MyD88 mostram que esses animais são

altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania spp*, o que corrobora essa via de reconhecimento do parasita através dos TLRs. Todavia, apesar desses achados, a magnitude do papel desempenhado pelos TLRs na leishmaniose ainda demanda mais estudos (VEER *et al.*, 2003; BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

Além do LPG, também são conhecidos outros padrões da superfície do parasita, como o antígeno gp63 (uma glicoproteína com atividade de protease) e o LACK ou quinase C ativada por *Leishmania* (que parece estar relacionado a uma família de receptores enzimáticos). Todos esses PAMPs estão sendo investigados em modelos animais e parecem induzir proteção contra o patógeno (THE JORDAN REPORT, 2002).

Outro fator determinante no desfecho e controle da doença em modelo murino é dependente dos chamados reativos intermediários de nitrogênio (RINs), os quais possuem atividade citotóxica e microbicida. (LIESE *et al.*, 2008). A ativação de macrófagos por IFN γ e fator de necrose tumoral (TNF α) estimula a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que a partir da 1-arginina gera o óxido nítrico (ON) (OKWOR *et al.*, 2012; LIESE *et al.*, 2008).

A importância do papel do ON foi demonstrada através de estudos com camundongos knock-out para a iNOS, nos quais houve alta susceptibilidade à infecção (MCSORLEY *et al.*, 1996; MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995). A principal citocina envolvida na ativação da iNOS é o IFN γ e o ON desempenha funções efetoras antimicrobianas, atua em numerosas funções de sinalização celular e contribui para a expressão gênica de citocinas (LIESE *et al.*, 2008).

7. Imunidade Adaptativa na Leishmaniose Tegumentar

Já está bem estabelecido que o desfecho da infecção por *L. major* em modelo murino depende da ativação de um dos fenótipos das células CD4⁺ (helper): Th1 ou Th2 (KHARAZMI *et al.*, 1999).

As células T podem apresentar subpopulações diferentes, conforme a ativação que recebem. MOSMANN e COFFMAN (1989) descreveram que, em suma, o fenótipo Th1 está relacionado às citocinas IL-12 e IL-2, enquanto o Th2 está relacionado à IL-4, IL-5 e IL-10.

De fato, em um estudo conduzido com camundongos imunossuprimidos por intervenção genética, demonstrou-se que após administração de células com perfil

Th1 no local da lesão, os animais foram capazes de evoluir para cura. Porém, quando outro grupo de animais recebeu células do tipo Th2 os mesmos desenvolveram lesões ainda maiores (MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995).

Nos macrófagos, a *L. major* encontra-se dentro de fagolisossomos, onde ocorre processamento de seus antígenos, que são então apresentados para células CD4⁺ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II. Essa localização intracelular do patógeno explica porque a resposta celular é mais importante para a resolução da doença (MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995).

Células CD4⁺ efectoras são cruciais para a resistência contra a infecção. Quando ativadas por citocinas do perfil Th1, como IL-2 e IL-12, produzem IFN γ , citocina de extrema importância para exterminação das formas amastigotas do parasita, uma vez que ativam propriedades citotóxicas nos macrófagos, como a produção de óxido nítrico (PALATNIK-de-SOUZA, 2008).

Já o papel dos linfócitos CD8⁺ na leishmaniose cutânea é controverso. Há evidências de que tais células atuam de duas formas distintas: contribuindo na proteção contra a infecção e também com a patogênese da doença (SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Apesar de existirem alguns estudos em animais deficientes em células CD8⁺ ou na expressão de MHC classe I, que não tiveram alterada a sua capacidade de controlar a infecção, a evidência mais aceita é que as células T CD8⁺ também possuem efeito protetor na doença (OKWOR *et al.*; 2012). Muller *et al.*, (1991) demonstraram que uma depleção inicial de células CD4⁺ em camundongos susceptíveis a *L. major* levou à resistência à infecção via mecanismos produzidos por células CD8⁺.

As células CD8⁺ têm capacidade de produzir IFN γ e regular também sua produção por linfócitos CD4⁺, atuando, portanto, na ativação de macrófagos. A participação na produção de IFN γ parece ser mais evidente em casos de reinfecção, em que as células CD8⁺ parecem ter efeito de “memória” (MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995).

Além desta propriedade, o papel citotóxico das células CD8⁺ já foi correlacionado ao tamanho das lesões em diferentes formas de leishmaniose tegumentar (SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Esta citotoxicidade parece estar relacionada a dois principais mecanismos: exocitose de grânulos líticos que contém moléculas como perforinas que formam

poros nas membranas lipídicas dos parasitas, permitindo assim, a entrada de grânulos, como granzimas A e B que ativam reações em cascata que culminam na apoptose celular. O outro mecanismo citolítico é mediado por meio de expressão de FasL/CD95L na membrana dos linfócitos que ligam-se aos receptores nas células alvo, levando à apoptose via ativação da caspase 8 (DANTAS *et al.*, 2013; FARIA *et al.*, 2009; RUIZ *et al.*, 2007).

7.1 O papel das citocinas envolvidas na imunidade da Leishmaniose Tegumentar

O fator preponderante na ativação do fenótipo Th1 parece ser a produção de IL-12 e IFN γ (EL-ON, 2009). A IL-12, que pode ser produzida por CD, macrófagos e até algumas linhagens de células B, é importante na ativação de células NK e linfócitos para a consequente produção de IFN γ (LIESE *et al.*, 2008). Quando usada *in vitro*, a IL-12 pode selecionar as células Th1 e suprimir as do tipo Th2 em amostras de células T de animais não infectados. Já no modelo *in vivo*, a administração de IL-12 é suficiente para curar camundongos BALB/c infectados por *L. major* – quando administrada no início da infecção (MCSORLEY *et al.*, 1996).

No modelo murino, o IFN γ é uma citocina crítica na resistência frente a *L. major*, uma vez que ela atua na ativação de macrófagos para produção de RINs e pode também selecionar células com fenótipo Th1 e suprimir do tipo Th2 (OKWOR *et al.*, 2012). Sua ação pode ser aumentada de forma sinérgica pelo TNF α produzido pelos próprios macrófagos. Entretanto, na ausência do IFN γ , o TNF α não consegue por si só ativar os macrófagos, o que demonstra a importância do IFN γ no combate ao patógeno (MCSORLEY *et al.*, 1996).

Desta forma, pesquisadores acreditam na existência de uma regulação cruzada entre os diferentes fenótipos celulares, em que citocinas do perfil Th1 podem inibir o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 ou vice-versa (MCSORLEY *et al.*, 1996). A produção dos RINs por macrófagos ativados, por exemplo, pode ser inibida pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF β), IL-4, IL-13 e IL-10. Tal fato indica que a supressão das citocinas do perfil Th2 deve ser crucial no desenvolvimento de resistência à infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A IL-2 é um dos principais fatores de crescimento de linfócitos T e desempenha um importante papel na indução e supressão de respostas imunes

específicas. Além disso, parece estar envolvida em mecanismos de regulação de células T efetoras assim como das células T regulatórias (TRUNOVA *et al.*, 2011).

Já a IL-4 parece estar envolvida no desenvolvimento de uma resposta polarizada do tipo Th2 após a infecção por *L. major*. Pesquisadores observaram que camundongos BALB/c infectados e tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-4 no início da infecção tornaram-se resistentes. Além disso, houve também inibição da expansão de células Th2 e desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. (MILON; GIUDICE; LOUIS, 1995). No entanto, essas considerações acerca da IL-4 parecem ser cepa dependente e precisam de maiores investigações (OKWOR *et al.*, 2012; PETERS; SACKS, 2006).

A IL-10, citocina considerada do perfil Th2, tem um importante papel no desfecho da doença por *L. major* em camundongos. Ela bloqueia a ativação de macrófagos pelo INF γ e inibe o desenvolvimento da resposta Th1, diminuindo assim, a eficiência da resposta imunológica requerida para conter a infecção. Além disso, a susceptibilidade da cepa BALB/c é dependente da IL-10, pois mesmo em animais deficientes em IL-4 a doença progride. Entretanto, quando é administrado anticorpo contra IL-10 os animais deixam de ser susceptíveis (OKWOR *et al.*, 2012).

8. Vacinas utilizadas para Leishmaniose Tegumentar

Diante das considerações acerca dos processos imunológicos envolvidos na leishmaniose, é possível dizer que o controle da infecção depende diretamente da resposta imune celular. Entretanto, o fator ou fatores chave no desencadeamento dessa resposta ainda precisam ser estabelecidos.

Supõe-se, todavia, que é durante o processo da imunidade inata que a ativação desta resposta ocorre. Desta forma, o estudo dos perfis celulares e de citocinas no sítio de inoculação do parasita são necessários para melhor entendimento deste processo.

A polarização do perfil de células Th1 provavelmente se dá por estimulação de determinados antígenos específicos, pelo tipo de linhagem das APC, pelo envolvimento de citocinas acessórias como a IL-12 ou pela coestimulação das células T CD4⁺ (BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

Apesar de todos os avanços na elucidação dos aspectos imunológicos envolvidos na doença, principalmente através do modelo animal, há ainda muito a

ser estudado. A dificuldade na determinação dos fatores desencadeantes de uma resposta imune eficaz na leishmaniose prejudica, pelo menos em parte, o desenvolvimento de uma vacina eficiente para a doença. Além da falta de uma vacina de uso amplamente consolidada na prática clínica, os tratamentos disponíveis para a leishmaniose possuem diversas limitações (KAYE; SCOTT, 2011).

Dessa forma, o desenvolvimento de imunoterápicos e de vacinas contra a leishmaniose constitui uma meta preponderante da área médico científica (GENARO *et al.*, 1996; ALVAR *et al.*, 2013).

8.1 Vacinas de Primeira Geração

A primeira geração de vacinas para leishmaniose possui em sua constituição parasitas mortos. A sua produção é relativamente fácil e barata, não requer tecnologia sofisticada e não apresenta o risco de aparecimento de lesões. Tais características possibilitaram o desenvolvimento de vacinas em países em desenvolvimento, com destaque para a América Latina (OKWOR *et al.*, 2012).

No Brasil, Mayrink e colaboradores desenvolveram uma formulação pentavalente de diferentes parasitas, a qual chegou a ser produzida pela empresa Biobrás com o nome de Leishvacin®, tendo sido inclusive utilizada para imunoterapia associada aos fármacos de primeira linha (HERMETO *et al.*, 1993).

De acordo com ensaios clínicos, a vacina mostrou ser segura e imunogênica, porém apresentou pequeno grau de proteção. Posteriormente, de acordo com diretrizes propostas por um grupo consultor organizado pela WHO, ficou estabelecido que os estudos deveriam continuar, porém, usando uma formulação monovalente, apenas com a cepa da *L. amazonenses*, por tratar-se de uma cepa conhecida, de taxonomia bem definida e por apresentar fácil crescimento em meio de cultura (NOAZIN *et al.*, 2008).

Mais tarde, observou-se em modelo animal que a imunogenicidade da vacina constituída por apenas uma cepa era similar à da vacina pentavalente (MAYRINK *et al.*, 2002).

Outros estudos foram conduzidos na Colômbia com a formulação monovalente de *L. amazonensis* em voluntários do exército. A mesma mostrou-se segura e imunogênica, porém não forneceu proteção. Tentativas no Equador

também não lograram êxito, assim como formulações em países do Velho Mundo, como Iran e Sudão (NOAZIN *et al.*, 2008).

Apesar desse tipo de vacina não ser considerado o ideal, seu uso em humanos confirma os dados observados em animais, de que a indução da proteção contra a leishmaniose pode ser alcançada por meio de vacinas ou extratos antigênicos do parasita (COLER, 2005).

8.2 Vacinas de Segunda Geração

A segunda geração, por sua vez, é caracterizada por formulações contendo antígenos, proteínas purificadas, recombinantes ou cepas de parasitas vivos atenuados (COLER, 2005; BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

Várias proteínas do gênero *Leishmania* já foram identificadas e parece que há alguma semelhança antigênica entre diversos isolados de parasitas e entre diferentes espécies. Tal fato é relevante, uma vez que uma vacina poderia ter proteção cruzada entre espécies. Entretanto, apesar dessas semelhanças é importante lembrar que a leishmaniose é uma doença complexa, que apresenta diversas formas clínicas e é causada por um grande espectro de parasitas. Portanto, estudos de sequenciamento genômico de diferentes espécies certamente facilitará a análise do potencial de certos antígenos se tornarem vacinas (ALVAR *et al.*, 2013).

Um desses antígenos, a poliproteína conhecida como Leish-111f, já passou por ensaios clínicos de fase I e II e mostrou-se segura e imunogênica tanto em pacientes saudáveis como em pacientes afetados por LC e LMC (OKWOR *et al.*, 2012).

Vários outros estudos em andamento avaliam o potencial de certas moléculas da *Leishmania* tornarem-se candidatas ao desenvolvimento de vacinas contra a doença (SINGH; SUNDAR, 2012).

8.3 Vacinas de terceira geração

A mais recente geração de vacinas baseia-se no uso do DNA e por enquanto constitui apenas uma prática experimental. (BIRNBAUM; CRAFT, 2011).

As vacinas de DNA são capazes de estimular a resposta imune celular e mimetizar a proteção induzida pelas vacinas de cepas vivas sem, contudo, apresentar risco de desenvolvimento da doença. Além disso, sua produção é relativamente fácil e barata e não requer a manutenção de cadeia fria na fabricação do produto (PALATNIK-de-SOUZA, 2008; OKWOR *et al.*, 2012).

Apesar da existência de estudos experimentais que demonstram proteção induzida por vacina de DNA na LC e LV, sua extrapolação para humanos esbarra em diversas questões técnicas, éticas, de segurança e em estudos com evidências contraditórias (OKWOR *et al.*, 2012).

Assim, pode-se concluir que o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose constitui um vasto campo de pesquisa experimental, que engloba estudos de diversas formulações candidatas a tornarem-se vacina em diferentes continentes.

Além da expectativa pela obtenção de uma vacina eficaz, há também uma demanda por imunoterápicos eficazes contra a leishmaniose, já que os tratamentos disponíveis são limitados, podem apresentar riscos aos pacientes, em alguns casos são caros e há também alguns relatos de inefetividade e resistência medicamentosa.

Portanto, a abordagem imunoterapêutica constitui uma alternativa importante para pacientes que possuem alguma contra indicação aos fármacos de primeira linha e para aqueles que são refratários ao tratamento.

9. Imunoterapia para leishmaniose: casos de sucesso

Convit *et al.* (1987) iniciaram de forma pioneira, na Venezuela, estudos utilizando uma vacina para terapia da leishmaniose. O grupo publicou resultados de um estudo randomizado duplo-cego que comparava as abordagens da quimioterapia e imunoterapia para leishmaniose cutânea. Noventa e quatro pacientes foram divididos em dois grupos, sendo que um deles recebeu o regime padronizado com antimonial e outro recebeu uma vacina com promastigotas mortos mais o BCG (bacilo de Calmette-Guérin) como adjuvante.

Verificou-se que a taxa de cura foi similar entre os dois grupos, 94.23% e 95.24% para imunoterapia e quimioterapia, respectivamente. A comodidade posológica da imunoterapia foi maior, uma vez que os pacientes receberam a vacina

em três doses com um intervalo de oito semanas, enquanto o grupo da quimioterapia recebeu 60 doses do fármaco. Neste último caso, houve maiores índices de efeitos adversos devido ao tratamento (CONVIT *et al.*, 1987).

Posteriormente, em 2004, o grupo publicou um estudo sobre terapia de quatro pacientes com LMC severa e três pacientes com a forma difusa inicial da doença, com evolução variando de 1 a 5 anos. Essas duas formas da doença são difíceis de tratar, sendo que no primeiro caso há relatos de falha terapêutica pela quimioterapia e no segundo, a forma difusa apresenta geralmente apenas remissão transitória (CONVIT *et al.*, 2004).

Dos sete pacientes que receberam imunoterapia, três foram considerados refratários ao tratamento com Glucantime®, outro teve o tratamento suspenso devido a efeitos adversos ao fármaco e os três restantes apresentavam contraindicações em relação ao antimonial pentavalente. Dessa forma, os pacientes elencados receberam uma vacina composta por promastigotas pasteurizados de *L. (V.) brazilienses* e BCG que foram administradas por via intradérmica com intervalos de quatro semanas. Todos os pacientes tratados apresentaram completa remissão clínica durante o tempo de acompanhamento de dez meses (CONVIT *et al.*, 2004).

A imunoquimioterapia, associação entre fármaco e a vacina, foi amplamente estudada por Mayrink e colaboradores usando uma vacina de primeira geração.

Em um estudo não controlado com pacientes de uma região endêmica de Minas Gerais, alguns foram tratados com a vacina pentavalente produzida por Mayrink e colaboradores e outros com Glucantime®. Dos 62 pacientes tratados pela vacina, 46 tinham uma única lesão, 8 tinham múltiplas lesões e 8 a forma mucocutânea da doença. Desse total, 47 foram considerados curados (76%) e os cinquenta pacientes tratados com Glucantime® foram todos curados em menor período de tratamento (MAYRINK *et al.*, 1992).

A imunoquimioterapia mostrou-se eficaz também em 4 casos de pacientes com LC co-infectados por HIV e outros 2 portadores de lepra (GENARO *et al.*, 1996).

Toledo *et al.* (2001) demonstraram em um ensaio clínico randomizado duplo cego, que tanto a quimioterapia usando Glucantime® quanto a imunoquimioterapia usando uma vacina monovalente (Leishvacin®) mais o antimonial foram capazes de curar as lesões dos 117 pacientes elencados para o estudo.

Mayrink *et al.* (2006) compararam em um estudo randomizado e aberto três abordagens para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana: a imunoterapia, a imunoquimioterapia e a quimioterapia, segundo a evolução clínica de 542 pacientes de uma região endêmica de Minas Gerais. Como resultado, observou-se que o grupo que recebeu somente a imunoterapia apresentou 98.1% de cura em um período prolongado de 172 dias. Já a imunoquimioterapia apresentou 100% de cura, em menos de 70 dias, com redução de aproximadamente 18% no volume de Glucantime®.

Esta redução no tempo de tratamento e da quantidade do fármaco, que pode produzir efeitos colaterais, constitui uma importante alternativa terapêutica, assim como a imunoterapia isolada, mais indicada para aqueles pacientes com contraindicações ao medicamento (MAYRINK *et al.*, 2006).

O fator estimulador de colônia granulocítica e monocítica (GM-CSF) também foi usado por Almeida *et al.* (2005), em um estudo aberto, no qual demonstraram que a associação de GM-CSF tópico ao fármaco de primeira linha foi capaz de curar lesões de cinco pacientes com LC refratária a monoterapia com fármaco. Não foram observados efeitos adversos advindos da associação e a mesma foi bem tolerada.

Raman *et al.* (2010) também avaliaram a implicação do uso de adjuvantes em modelo murino de LC causada por *L. major*. Como antígeno, o grupo usou a poliproteína L110f e variou os adjuvantes, a saber: monofosforil lipídeo A (MPL), um agonista TLR 4; cPG, um agonista TLR 9 ou a combinação dos dois. Somente os animais do grupo que recebeu L110f e a combinação dos dois adjuvantes apresentaram cura das lesões, resposta eficaz de linfócitos T e menor número de parasitas.

O Imiquimod, também considerado um agonista dos TLRs e imunomodulador, foi analisado em um estudo com camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Observou-se que a associação do Imiquimod ao Glucantime® demonstrou melhores resultados quando comparados ao uso dos dois separadamente, de acordo com a análise de critérios como espessura da pata e quantidade de parasita nas mesmas (KHALILI *et al.*, 2011).

Há vários estudos que investigam também o papel da imunoquimioterapia na forma visceral da leishmaniose. Joshi *et al.* (2014) compararam a quimioterapia, imunoterapia e imunoquimioterapia em modelo murino de infecção de LV causada por *L. donovani*. Dentre os esquemas propostos no estudo, os melhores resultados

de eficácia relacionados à quantidade de parasitas e investigações imunológicas foram do grupo tratado pela imunoquimioterapia (Sb e promastigotas mortos de *L. donovani*) e (Sb e promastigotas mortos de *L. donovani* + adjuvante). Houve nesses grupos evidências de aumento na resposta de hipersensibilidade tardia, aumento de IFN- γ e diminuição de IL-10 e IL-4.

Como descrito acima, existem diversas possibilidades para a modulação da terapêutica imunomediada na leishmaniose tegumentar. Independentemente do seu tipo, o que se busca no tratamento da doença é a polarização da resposta imune para o perfil Th1. Nosso trabalho também propõe mais uma alternativa de imunoterapia para a leishmaniose tegumentar, bem como a avaliação de uma proteção vacinal para a doença.

2. JUSTIFICATIVA

Diversas doenças parasitárias graves são muitas vezes negligenciadas pelas grandes indústrias farmacêuticas e por alguns governos. A leishmaniose enquadra-se nesse panorama e a WHO (2010) estima que o número de pessoas infectadas pelas diversas espécies do parasita tende a aumentar, assim como as taxas de mortalidade e morbidade desta doença.

O controle da infecção é uma tarefa difícil em regiões endêmicas e muitas vezes indivíduos assintomáticos não tratados funcionam como reservatórios transmissores da doença.

Como o tratamento de primeira escolha da leishmaniose é demorado e pode causar diversos efeitos colaterais, além de apresentar variadas contra indicações, a imunoterapia pode constituir uma nova abordagem eficaz no tratamento da doença.

Já a prevenção contra a leishmaniose através da vacinação ainda não é uma realidade, sendo que a complexidade da resposta imune envolvida entre patógeno e hospedeiro é um dos fatores que mais dificultam o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz.

Apesar de todos os desafios, muitas pesquisas estão sendo conduzidas em nível mundial, com o intuito de se obter uma vacina que possa ser utilizada na prática clínica, assim como de fármacos que apresentem menos efeitos colaterais.

Como a resolução da doença depende da ativação da resposta celular polarizada Th1, a determinação de agentes que consigam modular a resposta imune nesse sentido são de extrema importância na tentativa de propor métodos alternativos de tratamento e/ou prevenção da doença.

Uma vez que foi demonstrado por Mendoza e Newton (2005) que o extrato de *P. insidiosum* não apresenta efeito colateral e que a imunoterapia é efetiva em humanos, a determinação dessas propriedades do extrato do oomiceto em um modelo de infecção que não seja causada pelo próprio *Pythium insidiosum* poderá lançar novas perspectivas de estudos em outras doenças parasitárias intracelulares.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador, terapêutico e/ou preventivo, do extrato proteico do *P.insidiosum* em modelo murino de infecção da leishmaniose tegumentar causado pela *L. major*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial do extrato antigênico do *P. insidiosum* como imunoterápico na infecção tegumentar causada por *L. major* em camundongos BALB/c.
2. Demonstrar que o extrato antigênico do oomiceto *P. insidiosum* possui um padrão eletroforético de acordo com o perfil proteico de *P. insidiosum* por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
3. Avaliar a função protetora do extrato antigênico do *P. insidiosum* em camundongos BALB/c frente à infecção causada por *L. major*.
4. Realizar estudos histopatológicos em tecidos do coxim plantar de camundongos imunizados e tratados com extrato do *P. insidiosum*.
5. Dosar citocinas envolvidas na resposta à leishmaniose em cultura de células esplênicas dos animais imunizados com o extrato antigênico do *P. insidiosum* após estimulação *in vitro*.
6. Avaliar o fenótipo celular após imunização com extrato antigênico do *P. insidiosum* e dosar citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo.
7. Avaliar a imunidade humoral após a imunização dos camundongos BALB/c com extrato antigênico do *P. insidiosum*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais selecionados

Este Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), tendo sido aprovado sob o número 313/2014, disponível no Anexo 1. Todos os procedimentos envolvendo a utilização dos camundongos, bem como o método de eutanásia escolhido e o número de animais usados nos experimentos detalhados a seguir foram aprovados por este Órgão. A manutenção e o manejo dos animais foram conduzidos respeitando-se o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (2008).

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, foram utilizadas nos experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em temperatura aproximada de 22°C, sob ventilação e ciclo de claro/escuro de 12 horas e acesso irrestrito a ração e água *ad libitum*.

Em relação à eutanásia dos animais, o método escolhido e aprovado pelo CEUA foi a sobredosagem de anestésico geral, utilizando-se a combinação dos anestésicos pentobarbital-xilazina (120mg/kg e 15mg/kg, respectivamente). O procedimento está em conformidade com as Diretrizes da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

6.2 Parasitas

Foi utilizada a cepa de *L. major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin), gentilmente cedida pela Profa. Leda Quércia Vieira do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG). Para o cultivo *in vitro* de promastigotas de *L. major*, foi utilizado o meio de Grace (Grace's Insect Medium – Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2mM de glutamina, 100U de penicilina e 100g de estreptomicina/ml. Promastigotas metacíclicas infectantes foram isoladas de cultura estacionária (5 a 6 dias) e lavadas duas vezes com PBS (phosphate-buffered saline pH 7.3) antes de

serem utilizadas na infecção desafio. Os parasitas foram contados em Câmara de Neubauer e a dose infectante foi ajustada com PBS para 1×10^7 promastigotas por animal (LOMBONA-GONZALEZ *et al.*, 2008).

6.3 Obtenção do extrato antigênico de *P. insidiosum*

O extrato de *P. insidiosum* foi gentilmente cedido pelo Dr. Leonel Mendoza (Michigan State University, East Lansing, EUA). O mesmo foi preparado da seguinte forma: culturas do *P. insidiosum* (ATCC 58643) foram incubadas, tratadas com mertiolate (0.02% p/vol) e posteriormente, filtradas. A massa de células resultante foi transferida para um pistilo e triturada na presença de nitrogênio líquido. O pó resultante foi ressuspenso em 5ml de água destilada e incubado a 4°C por 24 horas. Depois da incubação, a mistura foi centrifugada (5000 x g por 10 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Os antígenos solúveis foram dializados em membrana de diálise com *cut-off* de peso molecular de 10.000 Daltons e então foram estocados a -10°C até o momento do uso (MENDOZA *et al.*, 1997).

6.4 Esterilização do extrato antigênico de *P. insidiosum*

O extrato antigênico de *P. insidiosum* foi aliqotado em tubos Eppendorf de 1,5mL e esterilizado através de irradiação gama (dose de 5000 Gray por 2 horas e 15 minutos), utilizando o reator gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG.

6.5 Dosagem de proteínas

Foi empregado o *2D Quanti Kit*® (GE-Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante, para determinar a quantidade de proteínas totais do extrato antigênico de *P. insidiosum*.

6.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise do perfil proteico do extrato de *P. insidiosum* foi feita em sistema de SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970). As condições específicas utilizadas foram: gel de concentração a 4% (acrilamida/bisacrilamida 4% em Tris-HCl 6% pH 6,8 e SDS 0,1%) e gel de resolução a 10% (acrilamida/bisacrilamida 10% em Tris-HCl 6% pH 8,8 e SDS 0,1%). Os géis foram polimerizados por ação do persulfato de amônio a 10% e N'N'N'N'-Tetrametilenodiamina 0,05% (TEMED), os quais foram mantidos após polimerização em tampão de corrida (Tris 0,3%, Glicina 1,5% e SDS 0,5%, pH 8,3). As amostras foram diluídas em tampão de solubilização de amostra (Tris-HCl 6%, pH 6,8, SDS 0,4%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,25%) na proporção de 1:1, homogeneizadas, fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel de concentração polimerizado, juntamente com um padrão de peso molecular conhecido. A corrida eletroforética foi realizada na presença de tampão de corrida a 100V. Após a corrida o gel foi corado pelos métodos de azul de Coomassie e pelo nitrato de prata (Wray *et al.*, 1981).

6.7 Protocolo de imunização e infecção desafio

6.7.1 Imunização de camundongos com extrato de *P. insidiosum*

Camundongos BALB/c fêmeas (n=10/grupo) foram imunizados com 3 doses de 20µg do extrato de *P. insidiosum* por via subcutânea no abdômen com intervalos de 7 dias entre as doses. Sete dias após a última dose, os animais foram desafiados com 1×10^7 promastigotas no coxim plantar direito. A avaliação da infecção em animais desafiados foi feita através do acompanhamento do desenvolvimento do edema e endurecimento na pata infectada, por medidas semanais da espessura das mesmas, utilizando-se um paquímetro (Digimess). O tamanho da lesão foi considerado como a diferença de espessura da pata infectada em relação à pata não infectada. A média e o desvio padrão foram calculados e os dados foram inseridos em gráficos, para melhor visualização da evolução. O acompanhamento nas medições foi realizado durante doze semanas e ao final desse período, os camundongos foram sacrificados.

6.7.2 Imunoterapia de camundongos desafiados com promastigotas de *L.major*

Camundongos BALB/c fêmeas (n=10/grupo) foram desafiados com 1×10^7 promastigotas no coxim plantar direito. Sete dias após o desafio, os animais receberam pela via subcutânea a primeira dose do extrato de *P. insidiosum*, contendo 20 µg de proteínas. Duas outras doses foram conduzidas da mesma forma, obedecendo-se 7 dias de intervalo entre elas. Os animais foram acompanhados por um período de cinco semanas. A avaliação da infecção em animais desafiados foi feita através do acompanhamento do desenvolvimento do edema e endureção na pata infectada, por medidas semanais da espessura das mesmas, utilizando-se um paquímetro (Digimess). O acompanhamento nas medições foi realizado durante 5 semanas e ao final desse período, os camundongos foram sacrificados.

6.7.3 Grupo controle

Camundongos BALB/c fêmeas (n=10/grupo) foram desafiados com 1×10^7 promastigotas no coxim plantar direito. O acompanhamento das medições foi realizado durante três semanas e ao final desse período, os camundongos foram sacrificados. O tempo de acompanhamento do grupo controle foi menor, uma vez que os animais desenvolveram necrose nos coxins plantares.

6.8 Estudo histopatológico

As amostras de tecidos retiradas das lesões das patas dos camundongos dos três grupos foram fixadas em formol P.A. a 10% para estudo histopatológico. Como nestas amostras havia representação de tecidos cartilaginoso e ósseo foi necessário descalcificá-las por meio de submersão em solução descalcificadora durante período de doze horas. Uma vez descalcificadas, as amostras foram processadas rotineiramente no Laboratório de Pesquisa em Patologia Cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG para serem incluídas em blocos de parafina.

A partir dos blocos de parafina foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 µm (micrômetros) de espessura, colocados sobre lâminas, desparafinados e

desidratados por tratamento com xilol e álcool. A seguir, as lâminas foram coradas pelo método de coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina (HE) e pelo método de Giemsa e analisadas histopatologicamente por dois patologistas, ambos sem conhecimento prévio de qualquer informação sobre o grupo de origem das amostras.

A análise histopatológica foi feita em toda a extensão dos cortes histológicos por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse 50i), inicialmente com aumento de 40x e 100x para avaliação dos seguintes aspectos: arquitetura tecidual das amostras e presença de reação inflamatória, assim como sua intensidade semi-quantificada como ausente (0), leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

A presença de leishmanias nas amostras foi considerada quando as formas amastigotas foram visualizadas claramente no interior de macrófagos ou dispersas no interstício dos tecidos. A presença do parasita nos tecidos foi também semi-quantificada como ausente (0), escassa (+), moderada (++) e intensa(+++).

6.9 Estudos imunológicos

6.9.1 Imunização de camundongos BALB/c

Para o experimento de marcação de superfície celular e de citocinas intracitoplasmáticas, camundongos BALB/c fêmeas (n=10/grupo) foram imunizados com 3 doses de 20µg do extrato de *P. insidiosum* por via subcutânea com intervalos de 7 dias entre as doses. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Para a quantificação de anticorpos, camundongos BALB/c fêmeas (n=5/grupo) também foram imunizados conforme descrito acima.

6.9.2 Obtenção de amostras de soro

Após sete dias da última dose do extrato antigênico, amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso orbital dos animais com auxílio de uma Pipeta Pasteur. Foram coletados aproximadamente 500 µL de sangue, transferidos para tubos Eppendorf, centrifugados a 1500g por 10 minutos à temperatura ambiente e o soro foi aspirado e mantido a -20°C até o momento da quantificação de anticorpos pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto.

6.9.3 Isolamento e cultura de esplenócitos

A obtenção de células mononucleares para estimulação *in vitro* e verificação da produção de citocinas e caracterização do fenótipo celular foi feita a partir de uma suspensão celular de esplenócitos obtidas após o sacrifício dos animais. Os baços dos mesmos foram removidos em condições assépticas e imediatamente transferidos para uma placa de Petri estéril contendo 5 mL de meio completo RPMI (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), glutamina (SIGMA), Penicilina/Estreptomicina 100UI/mL – 50pg/mL (SIGMA). Os baços foram então picotados e macerados com auxílio de pinças e tesouras estéreis. A suspensão de células obtida foi filtrada em filtro estéril de 0,45µm (Millipore, BD) e transferida para um gradiente de Ficoll-Hypaque, sendo em seguida centrifugadas a 440g por 35 minutos a 18°C. Após a centrifugação, o anel de células mononucleares formado foi retirado cuidadosamente e transferido para tubo estéril. Em seguida acrescentou-se 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), realizando-se nova centrifugação a 330g por 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi decantado e procedeu-se mais dois ciclos de lavagens nas mesmas condições descritas. As células foram então ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% soro fetal bovino para contagem de células. Preparou-se duas suspensões celulares: uma de 1×10^6 células/mL para análise *ex-vivo* e para cultivo e avaliação dos fenótipos celulares e outra de 5×10^6 células/mL para cultivo e posterior quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura. (OLIVEIRA et al., 2000; BARROSO, 2007).

6.9.4 Caracterização Imunofenotípica dos linfócitos esplênicos

Para a marcação de superfície celular, foram utilizados anticorpos marcados com fluorocromos específicos para anticorpos anti CD3⁺, anti CD4⁺ e anti CD8⁺. A **(Tabela 1)** relaciona os anticorpos utilizados neste estudo, bem como as diluições de uso após serem devidamente titulados no laboratório.

Utilizou-se a suspensão celular preparada conforme descrito no item 6.9.3, na concentração de 1×10^6 células esplênicas/mL em meio completo RPMI para a

realização tanto da análise fenotípica quanto para a detecção intracitoplasmática de citocinas. Para a marcação de superfície, volumes de 100 µL da suspensão celular foram transferidos para tubos de poliestireno (12x75mm) contendo os anticorpos marcados com fluorocromos, na concentração previamente titulada, conforme apresentado na **(Tabela 1)**.

As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de PBS (phosphate-buffered saline, 0,015M pH7,4) e as amostras foram centrifugadas a 330g por 7 minutos a 4°C . O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de PBS, procedendo-se duas novas centrifugações nas mesmas condições descritas acima. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspendido em vórtex e foram adicionados a cada tubo 300 µL de solução fixadora Maxs Facs Fix – MFF (10g/L de paraformaldeído; 1% de cacodilato de sódio; 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Todos os reagentes adquiridos da SIGMA – EUA. As amostras foram armazenadas em geladeira ao abrigo da luz e analisadas através do software FlwoJo, adquirindo-se 20 mil eventos/tubo em Citômetro de Fluxo (LSR Fortessa TM – BD Biosciences).

Tabela 1- Anticorpos anti CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e seus respectivos fluorocromos

MARCADOR	FLUOCROMO	VOLUME
Anti-CD3	FITC (isotiocianato de fluoresceína)	0,5µl
Anti-CD4	PercpCy55(proteína clorofila peridina)	0,5µl
Anti-CD8	APC (aloficocianina)	1µl

6.9.5 Detecção intracitoplasmática das citocinas IFN- γ e IL-10 produzidas por células esplênicas sob estímulo do extrato antigênico de *Pythium insidiosum*

Para a detecção intracitoplasmática de citocinas, o restante da suspensão de células na concentração de 1×10^6 /mL foi distribuída em placas de cultivo celular de 24 orifícios (Costar). Um poço contendo 1mL de suspensão de células não recebeu estímulo antigênico (controle), no outro as células foram estimuladas com 30 µg de extrato antigênico de *P. insidiosum*. A cultura foi incubada a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 72 horas. Quatro horas antes do término da

incubação, acrescentou-se 1 µL de Brefeldina (10 µg/mL) nos diferentes orifícios. Ao final da incubação, a placa foi centrifugada a 400g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, transferidas para tubos de poliestireno (12 x 75mm), iniciando-se a marcação de superfície das células. Acrescentou-se aos tubos anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC, anti-CD4-PercpCy55 e anti-CD8-APC. Procedeu-se então a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas com PBS contendo 0,5% de Soroalbumina Bovina (SIGMA), 0,1% de Azida Sódica (Merck) e 0,5% de Saponina (SIGMA). Nova etapa de incubação foi realizada a 4°C por 10 minutos. Todos os tubos foram então centrifugados a 330 g por 7 minutos a 4°C e os sobrenadantes decantados. Posteriormente, acrescentou-se aos tubos os anticorpos monoclonais anti-IFN-γ conjugado ao PeCy7 e anti-IL-10 conjugado à PE (BD-Bioscience), previamente titulados, conforme apresentado na **(Tabela 2)**. Procedeu-se nova incubação ao abrigo da luz por 30 minutos, acrescentando-se aos tubos em seguida PBS, contendo 0,5% de Soroalbumina Bovina (SIGMA), 0,1% de Azida Sódica (Merck) e 0,5% de Saponina (SIGMA). Os mesmos foram homogeneizados em Vórtex e então centrifugados a 330 g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com PBS, sob as mesmas condições de centrifugação. Finalmente, as células foram fixadas com a solução fixadora Maxs Facs Fix – MFF e mantidas a 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise, procedida utilizando-se o software FlwoJo, adquirindo-se 20 mil eventos/tubo em Citômetro de Fluxo (LSR Fortessa TM – BD Biosciences).

É importante lembrar que neste estudo foi utilizado o produto BD™ CompBeads Set Anti-Mouse Ig,κ, que são micropartículas de poliestireno utilizadas para otimizar as configurações de compensação de fluorescência quando são utilizados vários fluorocromos para análise por citometria de fluxo. O conjunto contém duas populações de micropartículas: as BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig,κ, as quais se ligam a qualquer cadeia leve κ de imunoglobulina de camundongo marcada, e as CompBeads BD™ Negative Control, que não têm capacidade de ligação.

Quando misturadas com um anticorpo de camundongo conjugado com fluorocromo, as CompBeads BD™ fornecem distinção das populações positivamente e negativamente marcadas (fluorescência de fundo), que são usadas para definir níveis de compensação de fluorescência. Uma vez que os ajustes de compensação são feitos usando o mesmo anticorpo marcado com fluorocromo a ser utilizado no

experimento, o método permite ao investigador estabelecer com mais precisão as correções de compensação para sobreposições espectrais de fluorocromos.

Tabela 2 - Anticorpos anti INF γ e anti IL-10 e seus respectivos fluorocromos

MARCADOR	FLUOCROMO	VOLUME
Anti-INF γ	PE-Cy TM 7(ficoeritrina Cy)	1 μ l
Anti-IL10	PE (ficoeritrina)	1 μ l

6.9.6 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células esplênicas

Para esta finalidade, utilizou-se a suspensão de 5×10^6 células obtidas no item 6.9.3. Assim, distribuiu-se a suspensão celular em 1 mL de RPMI completo. Acrescentou-se à cultura, 30 μ g de extrato antigênico de *P. insidiosum*, 25 μ g do mitógeno Concanavalina A, além de um orifício contendo a mesma concentração de células que não recebeu nenhum tipo de estímulo antigênico. As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 72 horas. Transcorrido o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C até o momento de uso. Utilizou-se kits comerciais da R&D Systems para quantificação das citocinas Interferon- γ , Interleucina 2, Interleucina 4 e Interleucina 10. As reações foram conduzidas conforme orientações do fabricante.

6.9.7 Avaliação da produção de anticorpos no soro dos camundongos imunizados com extrato de *P. insidiosum*

A produção de anticorpos foi analisada no soro obtido conforme descrito no item 6.9.2. Foram determinados os níveis de anticorpos IgG em placas de 96 orifícios (Costar), utilizando como antígeno o extrato de *P. insidiosum*. A placa foi sensibilizada com 2 μ g do extrato por orifício, diluídas em “coating buffer” pH 9,6 (Na₂CO₃ 0,015M; NaHCO₃ 0,03M), incubadas a 4°C por 16 horas. Após a sensibilização, a placa foi lavada 3 vezes em solução de lavagem (PBS 0,15M pH7,4 contendo Tween 20 a 0,05%). Em seguida acrescentou-se a solução de bloqueio

(PBS pH7,4 0,15M contendo caseína 2%). Após 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram lavadas 3 vezes em solução de lavagem. As amostras de soro diluídas em tampão de incubação (PBS 0,15M pH7,4 contendo Tween 20 a 0,05% e Caseína a 0,2%) nas diluições de 1:10 a 1:320 foram adicionadas em duplicatas e incubadas durante 1 hora a 37°C. Para a determinação dos níveis de IgG total, após a incubação e lavagem da placa, foi adicionado o anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:5000 em tampão de incubação. A placa foi novamente incubada a 37°C durante 1 hora e lavada com solução de lavagem por 6 vezes. A solução reveladora constituída de Ortofenilenodiamino (OPD), Peróxido de Hidrogênio e tampão citrato-fosfato pH 5,0 foi adicionada e a reação foi processada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 20 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de Ácido Sulfúrico 2N. A absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas (Molecular Devices – Spectramax 384), utilizando o comprimento de onda de 492nm.

6.10 Análise Estatística

Para a análise dos dados provenientes das medidas das lesões foram utilizados o teste T com múltiplas comparações e o teste Student-Newman-Keuls (SNK), por meio do programa STATA: Data Analysis and Statistical Software.

Para avaliação dos valores de citocinas no sobrenadante do cultivo celular e para resposta humoral foram utilizados os testes One way ANOVA e o Teste T de Student, por meio do programa Prisma.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo nos diferentes testes.

7. RESULTADOS

7.1 Eletroforese do extrato antigênico de *P. insidiosum*

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida, aplicou-se uma concentração de 50 microgramas do extrato proteico para a coloração por Azul de Coomassie e de 20 microgramas para a coloração pelo nitrato de prata.

Tanto a eletroforese corada pelo azul de Coomassie como a corada pela prata, revelaram a presença de bandas de proteínas no extrato antigênico do *P. insidiosum* de alto, médio e baixo peso molecular, podendo-se identificar diferenças qualitativas e quantitativas no perfil proteico. Na coloração pelo método do nitrato de prata, percebeu-se um maior número de bandas, algumas mais *intensamente* expressadas, como aquelas de 45 e 97 kDa.

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul de Coomassie. Canaleta 1 – Padrão de massa molecular (kDa), SDS-6H – Sigma Aldrich. Canaleta 2 – Extrato antigênico de *P. insidiosum*.

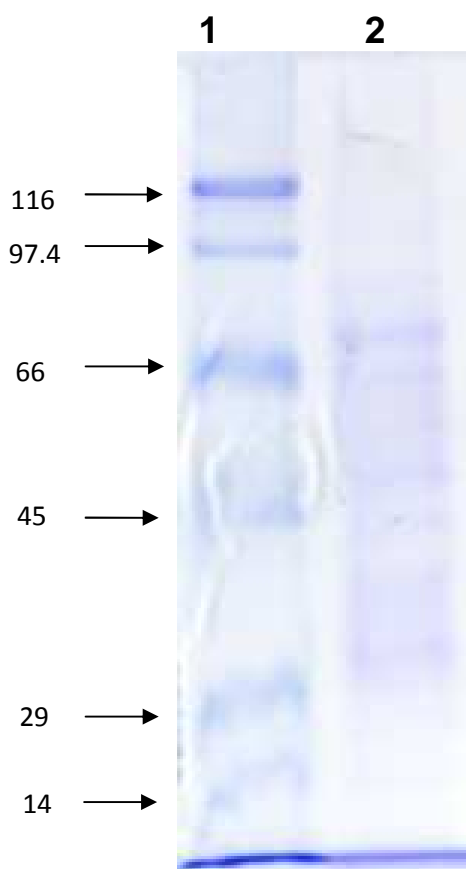
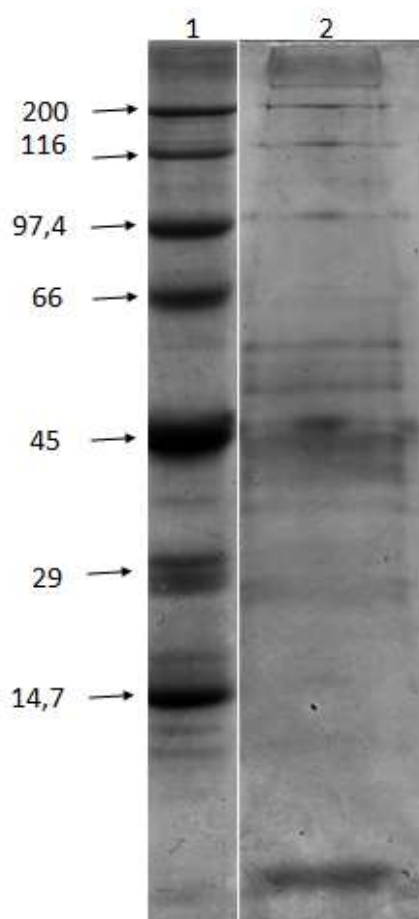


Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo método do nitrato de prata.
Canaleta 1 – Padrão de massa molecular (kDa), SDS-6H – Sigma Aldrich. Canaleta 2 – Extrato antigênico de *P. insidiosum*.

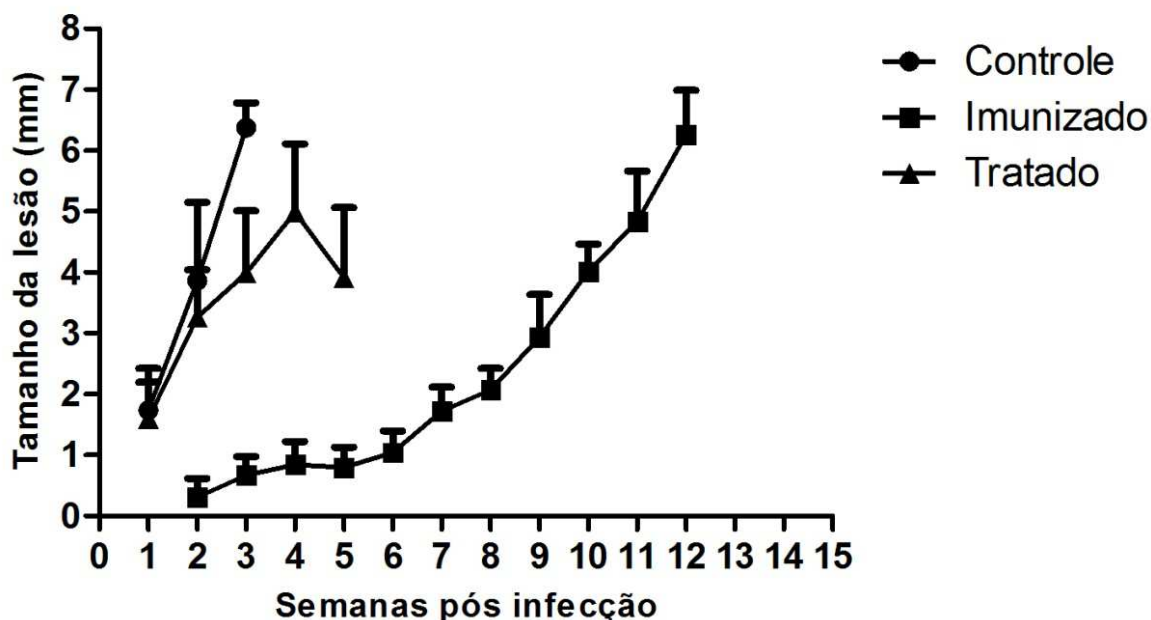


7.2 Medidas das lesões

Após as análises dos dados das medidas dos coxins plantares dos animais ao longo do tempo, constatou-se que houve diferença estatística entre o grupo controle e o imunizado ($p < 0,001$), controle e tratado ($p < 0,05$) e entre os grupos imunizado e tratado ($p < 0,001$).

Também houve diferença estatística entre o tempo referido em semanas ($p < 0,05$).

Figura 4 - Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c imunizados e tratados com extrato antigênico de *P. insidiosum* e desafiados com 1×10^7 promastigotas de *L. major*.



A evolução do tamanho das lesões foi monitorada através de medidas semanais da espessura da pata infectada e da não infectada. Cada ponto representa os valores médios e o desvio padrão (em mm) obtidos pela diferença da espessura entre pata infectada e não infectada. Diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste T com múltiplas comparações, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

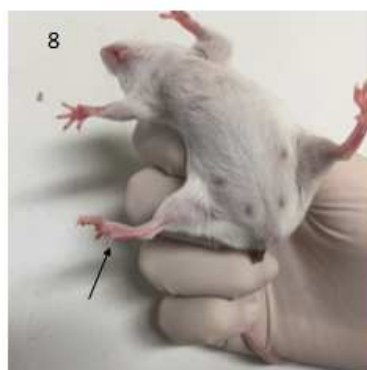
7.3 Aspecto macroscópico das lesões

As (Figuras 5 a 14) mostram aspectos macroscópicos das patas de camundongos BALB/c representativos dos diferentes grupos de estudo, na terceira, quinta, sétima e décima primeira semanas pós-infecção desafio.

Figuras 5 e 6 - Aspectos macroscópicos das patas (seta) infectadas de camundongos pertencentes ao grupo controle na terceira semana pós-infecção.



Figuras 7, 8 e 9 - Aspectos macroscópicos das patas infectadas (seta) de camundongos pertencentes ao grupo imunizado, na terceira semana pós-infecção.



Figuras 10 e 11 - Aspectos macroscópicos das patas (seta) infectadas de camundongos pertencentes ao grupo tratado após o desafio, na terceira semana pós-infecção.

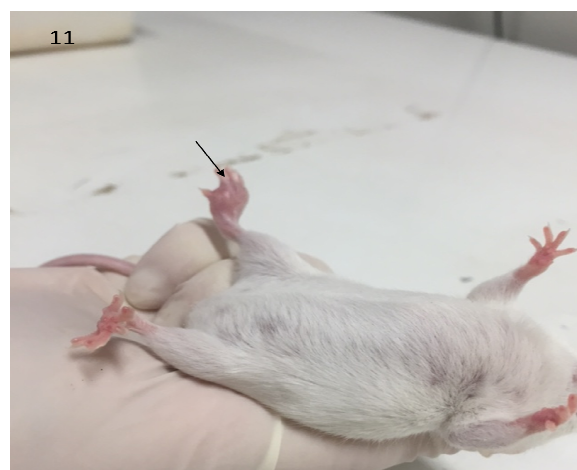
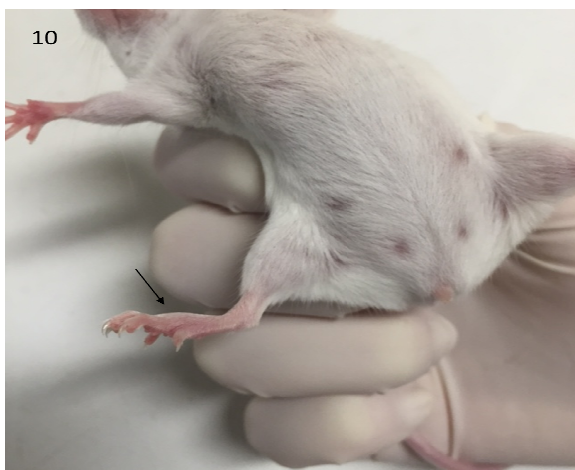


Figura 12 - Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo imunizado, na sétima semana pós-infecção.

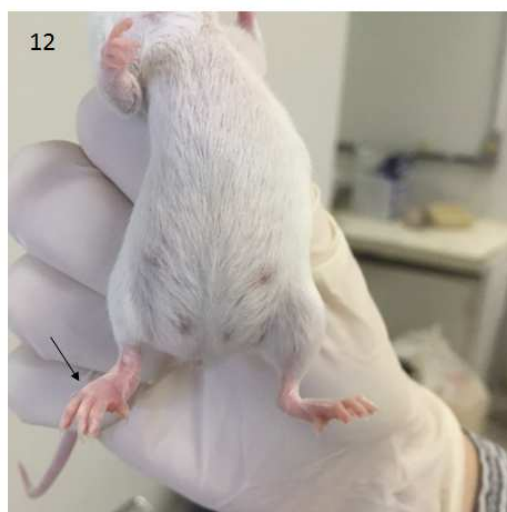


Figura 13 - Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo tratado, na quinta semana pós-infecção.

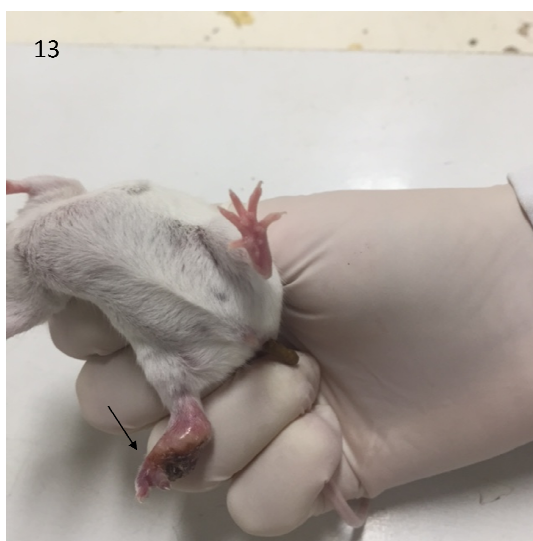


Figura 14 - Aspecto macroscópico da pata infectada (seta) de camundongo pertencente ao grupo imunizado, na décima primeira semana pós-infecção.



7.4 Estudo Histopatológico

A análise histopatológica efetuada em toda a extensão dos cortes histológicos possibilitou a semi-quantificação de aspectos como infiltrado inflamatório e presença de formas amastigotas de *Leishmania*, conforme representado na **(Tabela 3)**. Além disso, as fotomicrografias **(Figuras 15 a 22)** de amostras teciduais dos coxins plantares dos animais do grupo imunizado e do grupo controle ilustram os dados encontrados.

Tabela 3 - Resultados da avaliação histopatológica nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Infiltrado inflamatório	Leishmanias
Controle	+++	+++
Imunizado	+++	+++

Legenda dos dados semi-quantificados: presença de reação inflamatória e sua intensidade - ausente (0), leve (+), moderada (++) e acentuada (+++). Presença de leishmanias - ausente (0), escassa (+), moderada (++) e intensa (+++).

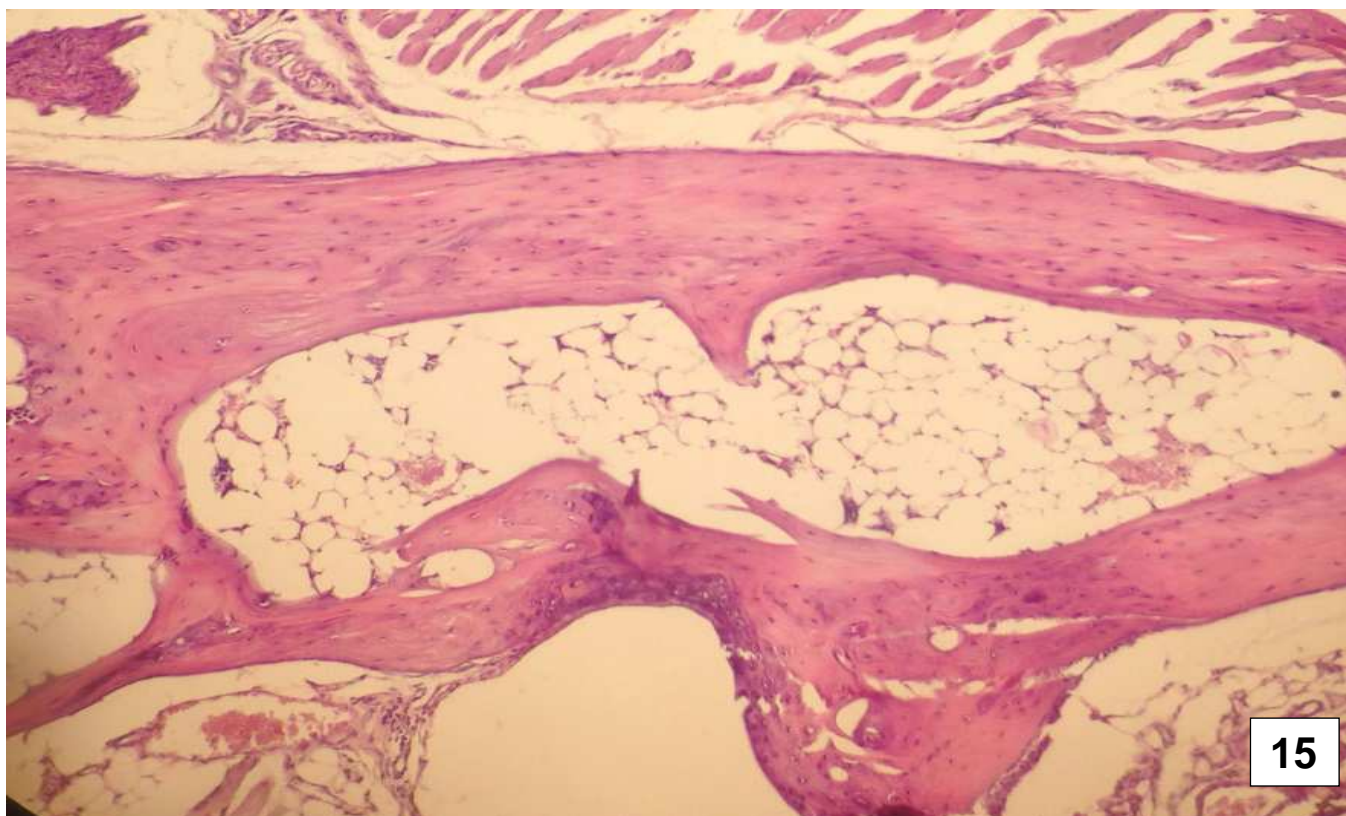


Figura 15 – Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata não infectada de camundongo, exibindo tecidos subcutâneo, muscular estriado e ósseo normais. Ausência de leishmanias ou processo inflamatório. Coloração: Método HE, aumento 100X.

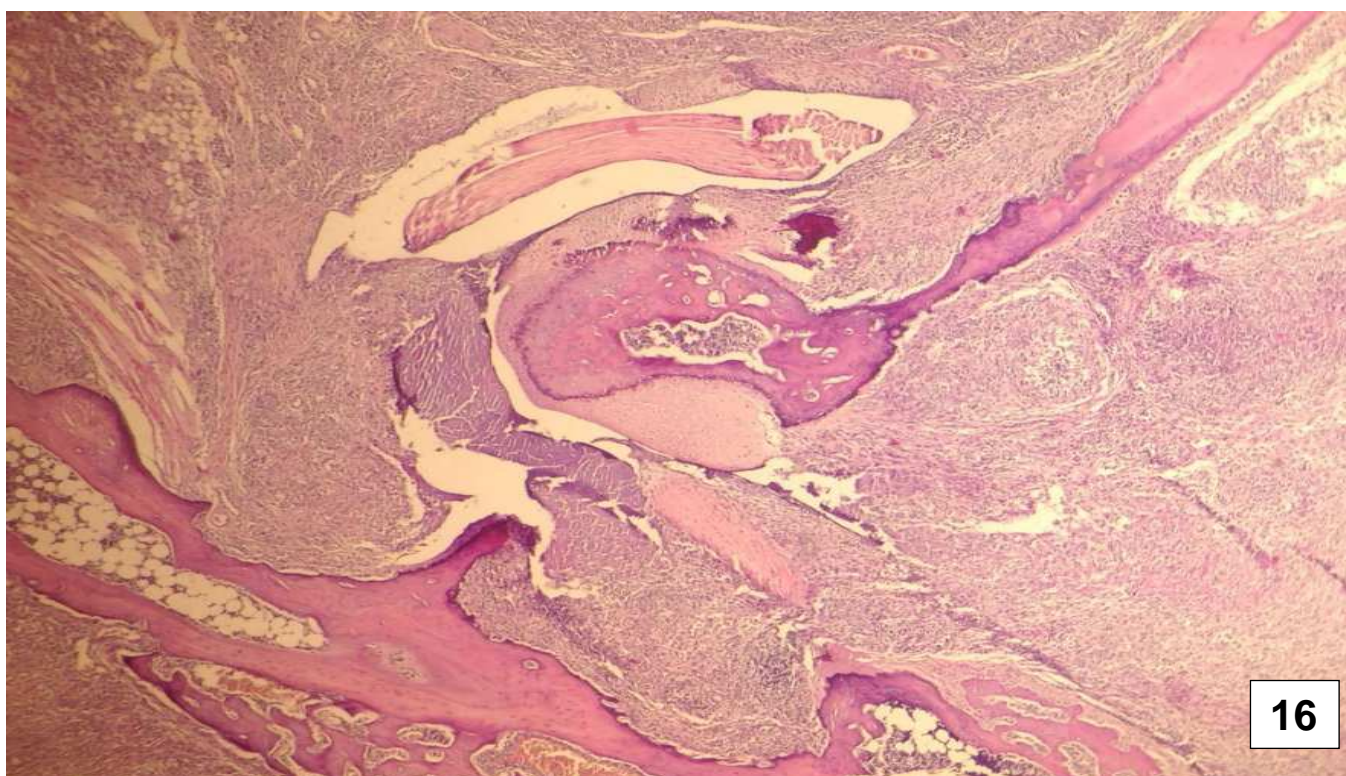


Figura 16 – Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata de camundongo do grupo imunizado exibindo tecidos subcutâneo, muscular estriado e ósseo com intenso processo inflamatório. Coloração: Método HE, aumento 40X.

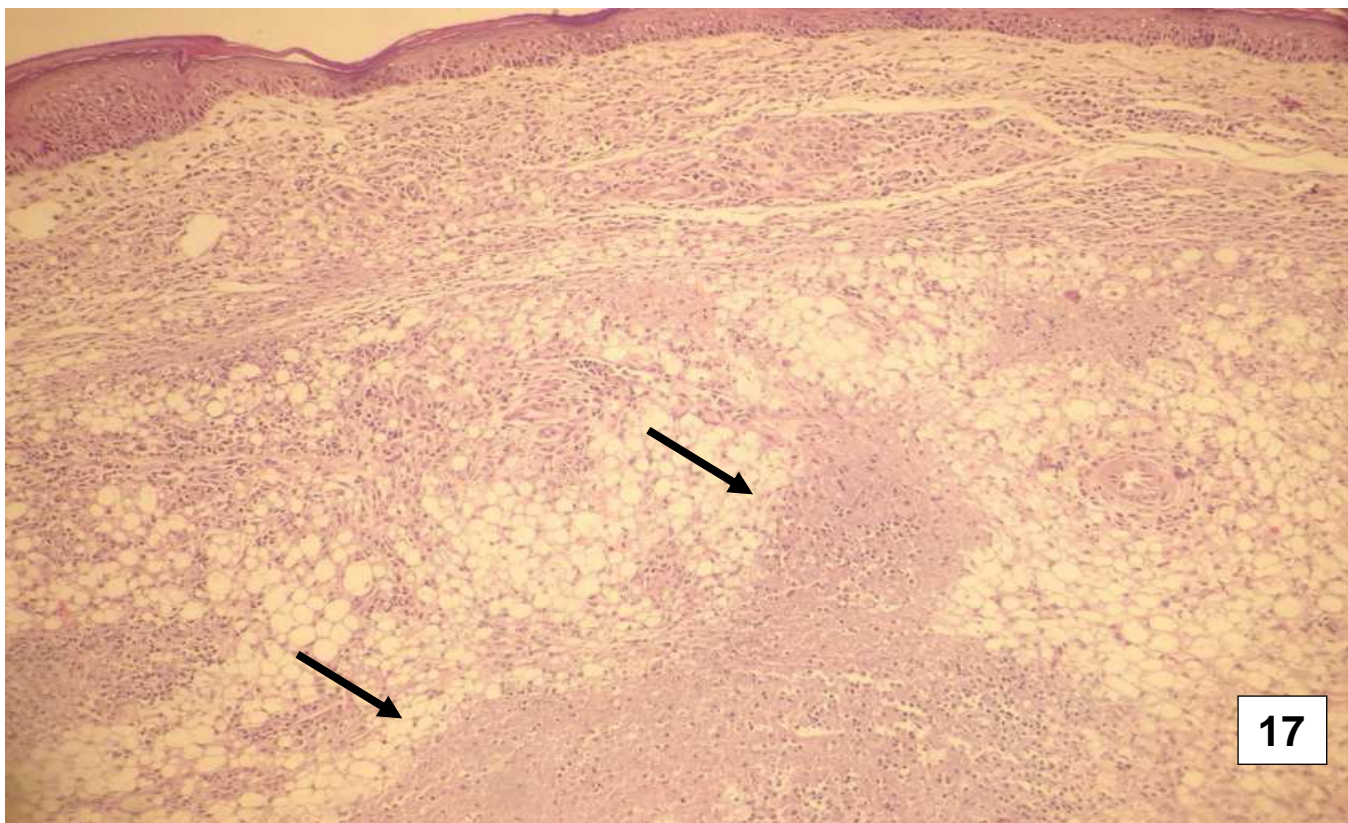
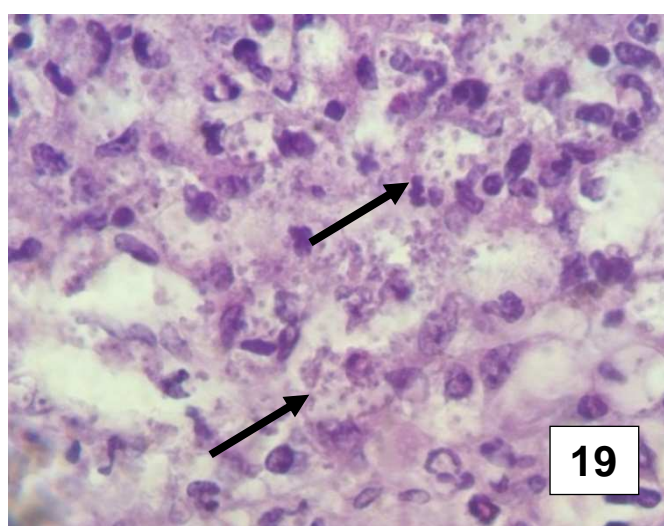
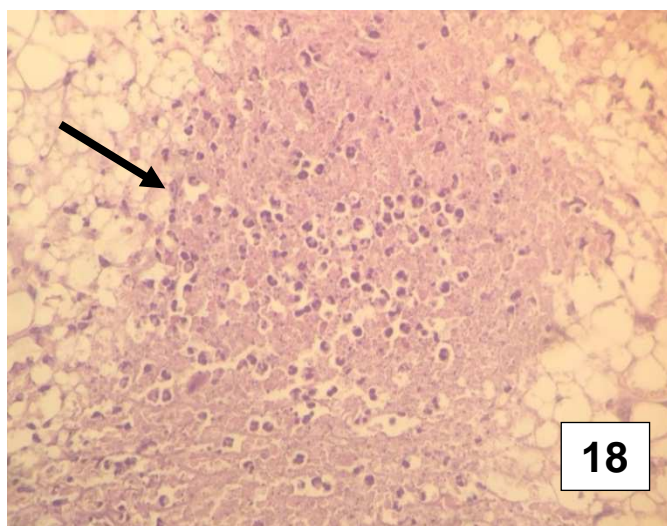
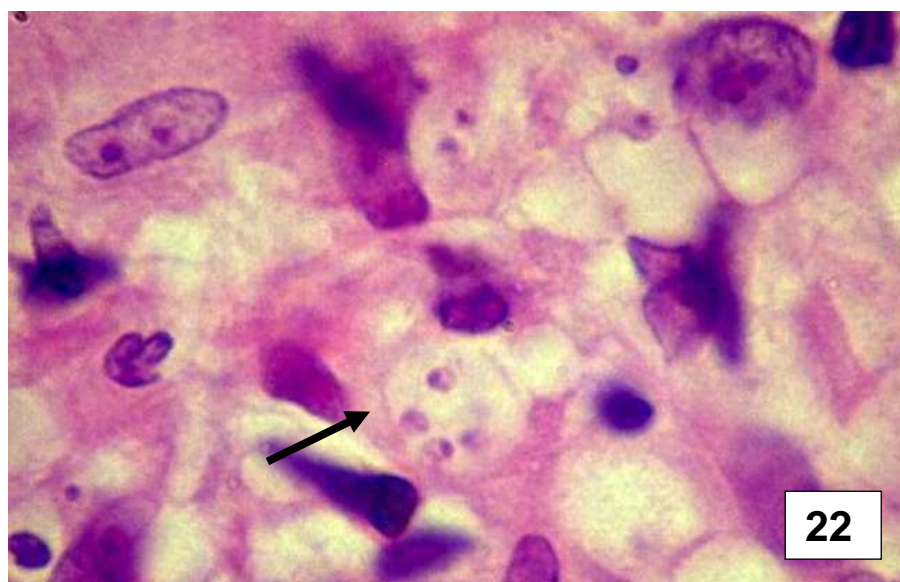
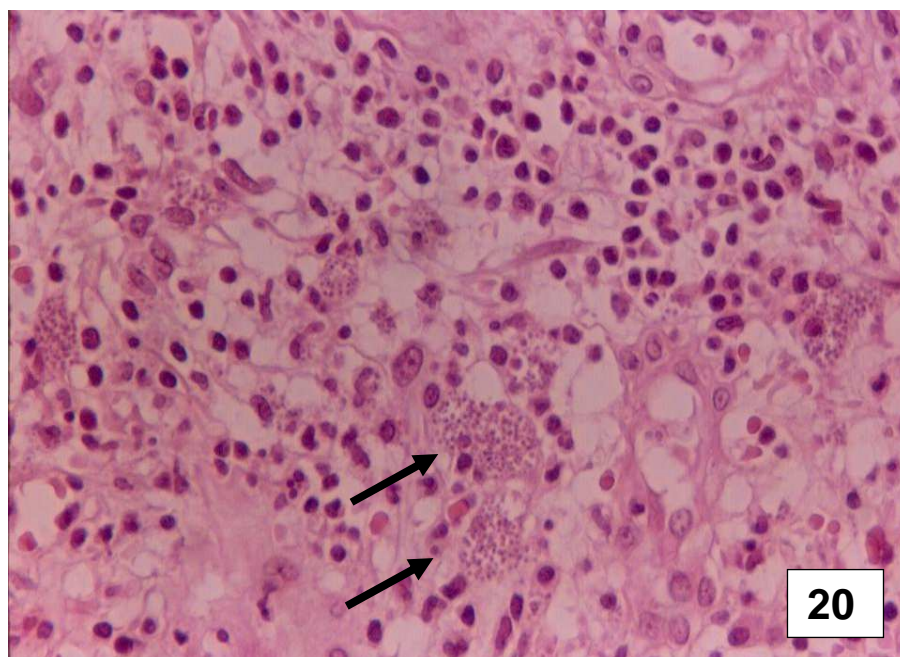


Figura 17 – Fotomicrografia de corte histológico obtido a partir de amostra colhida de pata de camundongo do grupo imunizado exibindo epiderme, derme e subcutâneo. Presença de áreas de necrose com processo inflamatório (setas). Coloração: Método HE, aumento 100X.



Figuras 18 e 19 – Fotomicrografias de detalhe de uma das áreas de necrose (seta na Fig. 18) da derme e subcutâneo com processo inflamatório do grupo imunizado. Coloração: Método HE, aumento 200X e imagem ampliada da mesma área em coloração pelo Giemsa para visualização de formas amastigotas de leishmanias no interior de macrófagos e dispersas no interstício (setas na Fig 19) em aumento de 1000x.



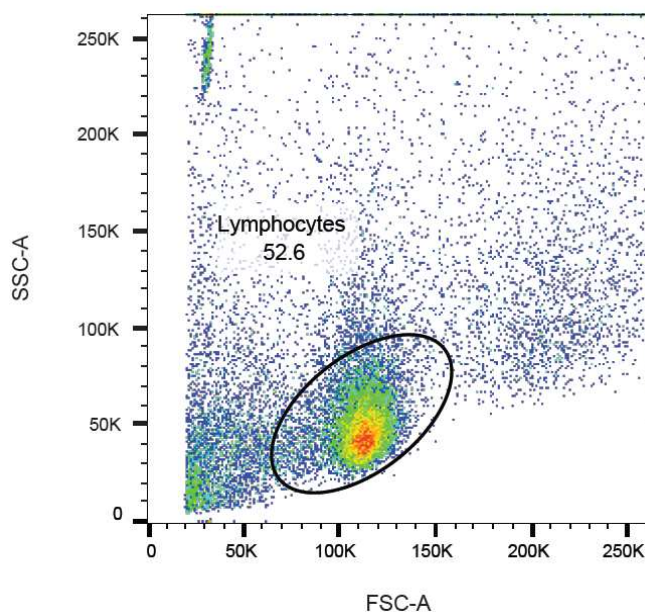
Figuras 20, 21 e 22 – Fotomicrografias de corte histológico obtido a partir de amostra colhida da pata de camundongo do grupo controle exibindo ninhos de formas amastigotas de leishmanias na derme e subcutâneo (setas) e processo inflamatório. Coloração pela HE, aumentos de 200X, 400X e 1000X.

7.5 Caracterização imunofenotípica de células esplênicas de camundongos BALB/c após imunização com a VPI

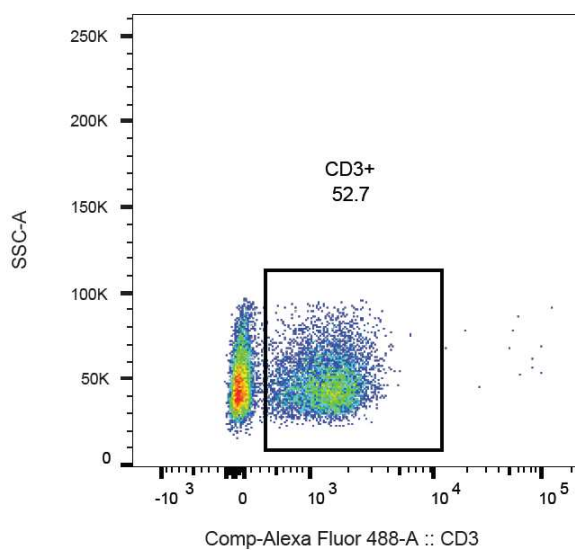
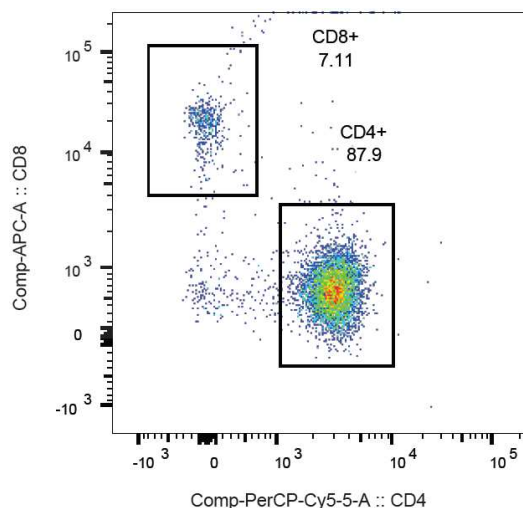
As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária na gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC), conforme a **(Figura 23)**. A partir dessa região os gráficos de fluorescência foram construídos, delimitando-se os quadrantes de análise. Os limites dos mesmos foram sempre baseados na população negativa e os valores considerados para análise de fluorescência foram os do porcentual da região linfocitária para cada quadrante.

Para cada amostra, 20.000 eventos foram adquiridos e para o ajuste da voltagem, beads foram monomarcadas com cada um dos anticorpos utilizados.

Figura 23 - Exemplo de gráfico de FSC (tamanho celular) x SSC (complexidade celular) em células mononucleares esplênicas com delimitação na região linfocitária.

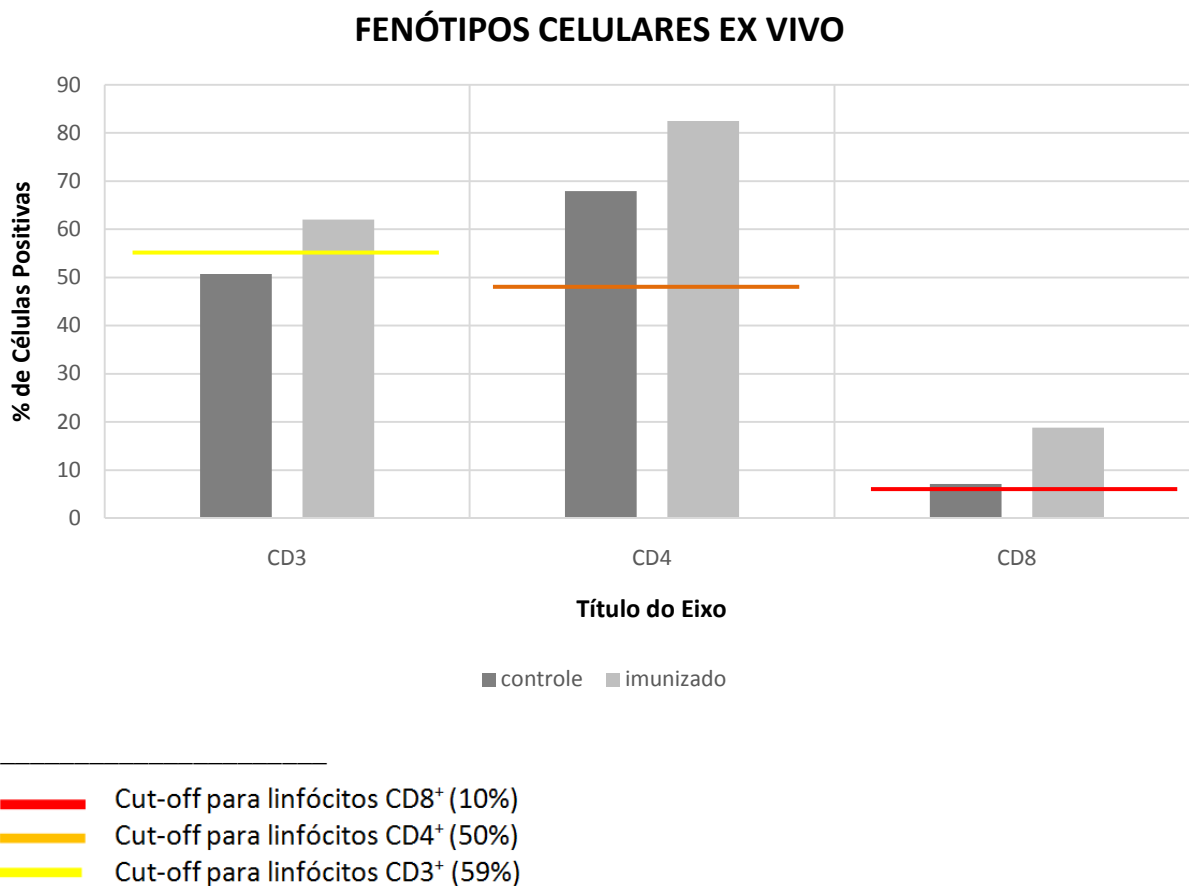


Posteriormente foi feita uma janela de aquisição na região das células CD3⁺, seguida de duas janelas de aquisição para caracterizar as populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, conforme ilustrado nas **(Figuras 24 e 25)**, respectivamente. A partir de cada uma destas populações foi feita uma janela de aquisição para a determinação das células produtoras de citocinas.

Figura 24 - Aquisição de janela para células CD3⁺.**Figura 25 - Aquisição de janelas para células CD4⁺ e CD8⁺.**

Os percentuais de linfócitos determinados nas células esplênicas antes da estimulação antigênica estão representados na **(Figura 26)**. Araújo *et al.* (2015), determinaram em um estudo com diversas linhagens de camundongos, inclusive BALB/c, valores basais de parâmetros hematológicos, bioquímicos e de linfócitos CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, sendo que estes últimos estão representados pelos valores de cut-off abaixo.

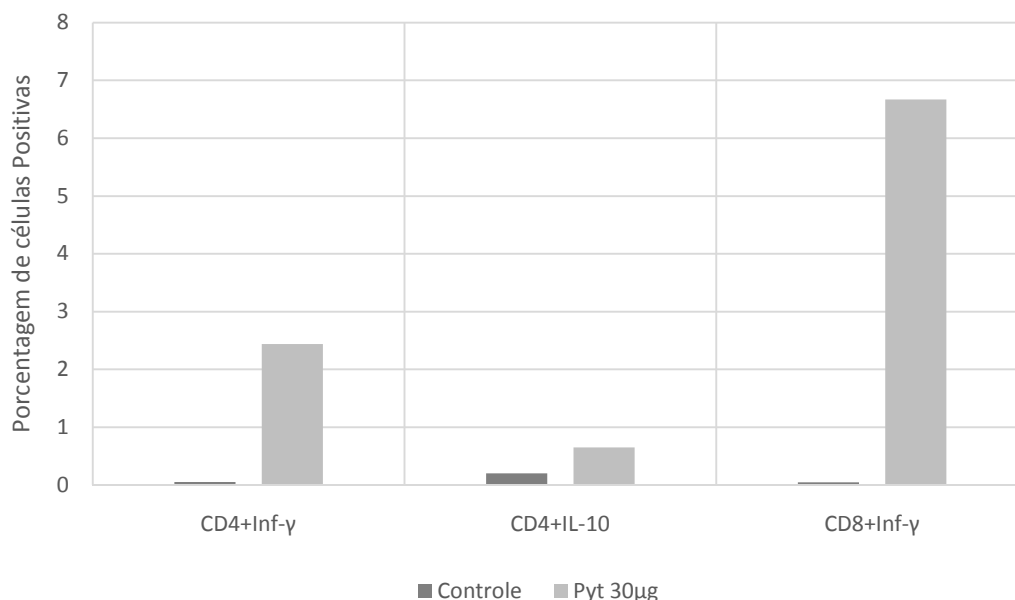
Figura 26 - Porcentagem de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ presentes em células esplênicas de camundongos BALB/c dos grupos controle e imunizado sem estímulo antigênico.



Também foram quantificados os linfócitos produtores das citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN γ . Os percentuais dos linfócitos produtores das respectivas citocinas estão representados na **(Figura 27)**.

Figura 27 - Porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-10 e INF γ presentes no cultivo de células esplênicas de animais do grupo controle (sem estímulo) e do grupo imunizado (com estímulo de 30 μ g/ml de *P. insidiosum*).

MARCAÇÃO DE LINFÓCITOS PRODUTORES DE CITOCINAS



7.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas

Para a quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos Balb/c, utilizou-se o kit comercial da R&D Systems, que adota o sistema de ensaio imunoenzimático de captura e revelação colorimétrica.

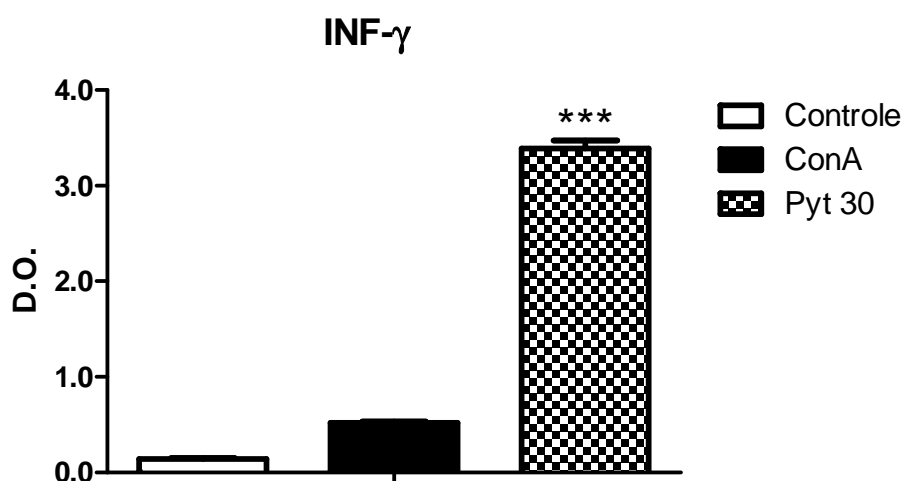
Cerca de 5×10^6 células espênicas de um pool de 10 camundongos Balb/c previamente imunizados com extrato antigênico de *P. insidiosum*, foram incubadas por 72 horas em diferentes condições de estimulação antigênica (sem estímulo, estimuladas com Concanavalina A – 25 microgramas/orifício e com antígenos de *P. insidiosum* – 30 microgramas/orifício).

A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura, após 72 horas, do cultivo celular por meio do ensaio imunoenzimático foi executada conforme instruções do fabricante para as diferentes citocinas. A densidade óptica (D.O) a 590 nm foi medida em duplicata e tais resultados estão representados nas figuras seguintes.

7.6.1 – Dosagem de IFN- γ

Na (**Figura 28**), observa-se a produção de Interferon gama por células esplênicas de camundongos Balb/c imunizados com o extrato antigênico de *P. insidiosum*. A concentração da citocina no sobrenadante de células não estimuladas estava abaixo do limiar de sensibilidade do kit da R&D Systems utilizado para esta avaliação, enquanto que o estímulo inespecífico por Concanavalina A induziu a produção de 111pg/mL de Interferon gama. O estímulo das células esplênicas por antígenos de *P. insidiosum* gerou a produção de 660pg/mL da citocina.

Figura 28 - Valores de D.O. para IFN γ .



Significativamente diferente do (*) grupo controle. Teste t de Student ($p < 0,05$).

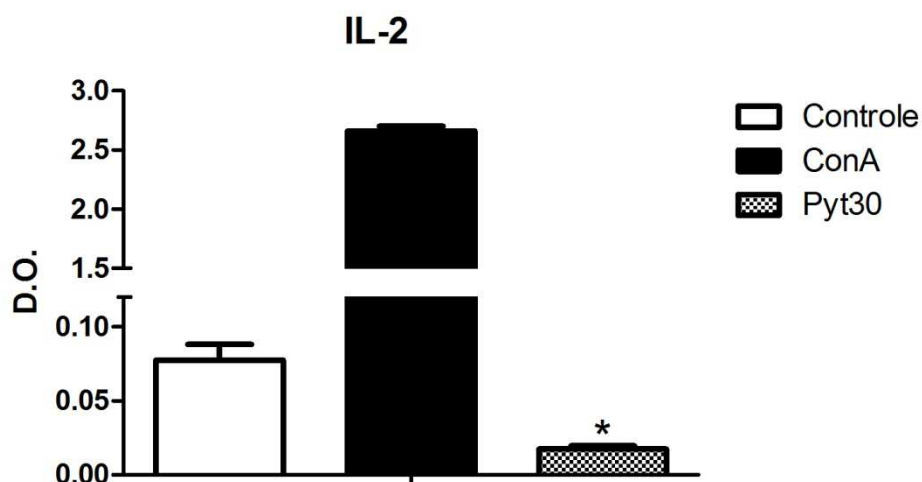
A citocina foi dosada no sobrenadante do cultivo celular após 72 horas de estímulo, utilizando-se o sistema da R&D Systems. A figura expressa os valores das densidades ópticas a 590 nm.

7.6.2 – Dosagem de IL-2

Na (**Figura 29**), observa-se a produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos Balb/c imunizados com o extrato antigênico de *P. insidiosum*. A concentração da citocina no sobrenadante de células não estimuladas foi de 15pg/ml, enquanto que o estímulo inespecífico por Concanavalina A induziu a

produção de 1000pg/mL. O estímulo das células esplênicas por antígenos de *P. insidiosum* gerou a produção de 150pg/mL da citocina.

Figura 29 - Valores de D.O. para IL-2.



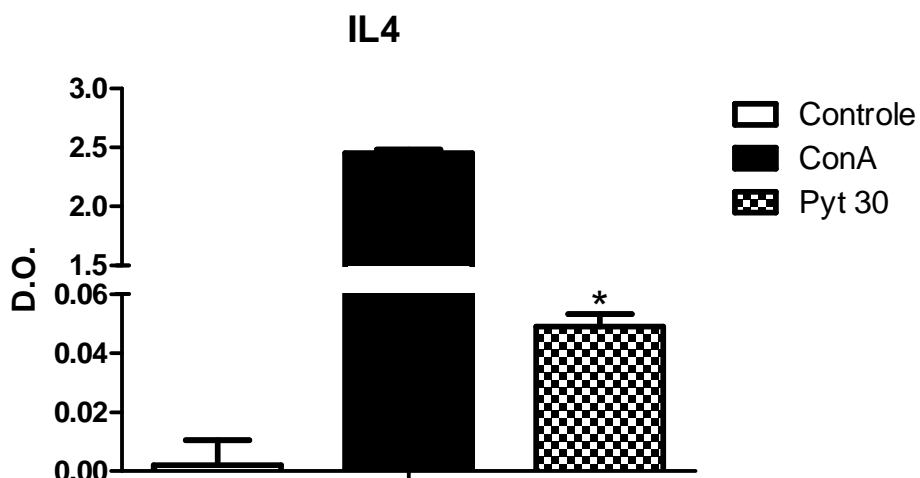
Significativamente diferente do (*) grupo controle. Teste t de Student ($p < 0,05$).

A citocina foi dosada no sobrenadante do cultivo de células após 72 horas de estímulo, utilizando-se o sistema da R&D Systems. A figura expressa os valores das densidades ópticas a 590 nm.

7.6.3 – Dosagem de IL-4

Na (**Figura 30**), observa-se a produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos Balb/c imunizados com o extrato antigênico de *P. insidiosum*. A concentração da citocina no sobrenadante de células não estimuladas estava abaixo do limiar de sensibilidade do kit da R&D Systems utilizado para esta avaliação, enquanto que o estímulo inespecífico por Concanavalina A induziu a produção de 500pg/mL. O estímulo das células esplênicas por antígenos de *P. insidiosum* gerou a produção de 177,5pg/mL da citocina.

Figura 30 - Valores de D.O. para IL-4



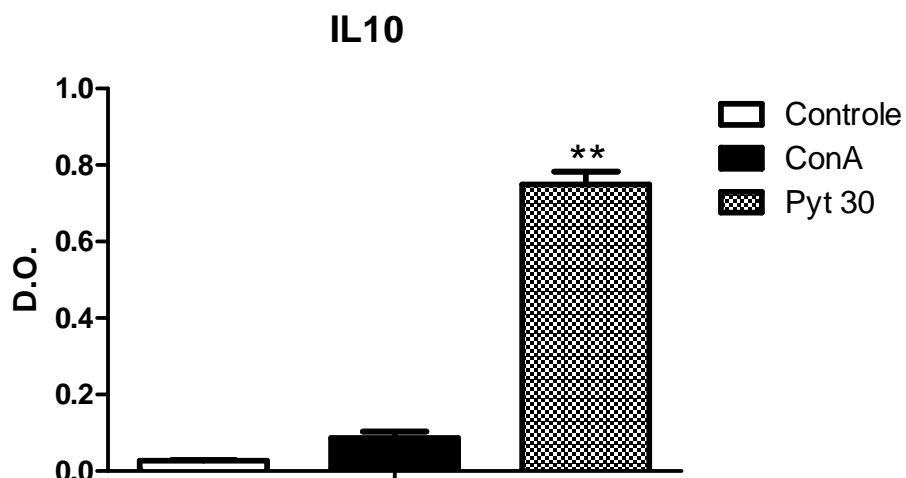
Significativamente diferente do (*) grupo controle. Teste t de Student ($p < 0,05$).

A citocina foi dosada no sobrenadante do cultivo de células após 72 horas de estímulo, utilizando-se o sistema da R&D Systems. A figura expressa os valores das densidades ópticas a 590 nm.

7.6.4 – Dosagem de IL-10

Na (Figura 31), observa-se a produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos Balb/c imunizados com o extrato antigênico de *P. insidiosum*. A concentração da citocina no sobrenadante de células não estimuladas foi de 15pg/ml, enquanto que o estímulo inespecífico por Concanavalina A induziu a produção de 55pg/mL. O estímulo das células esplênicas por antígenos de *P. insidiosum* gerou a produção de 45pg/mL da citocina.

Figura 31 - Valores de D.O. para IL-10.

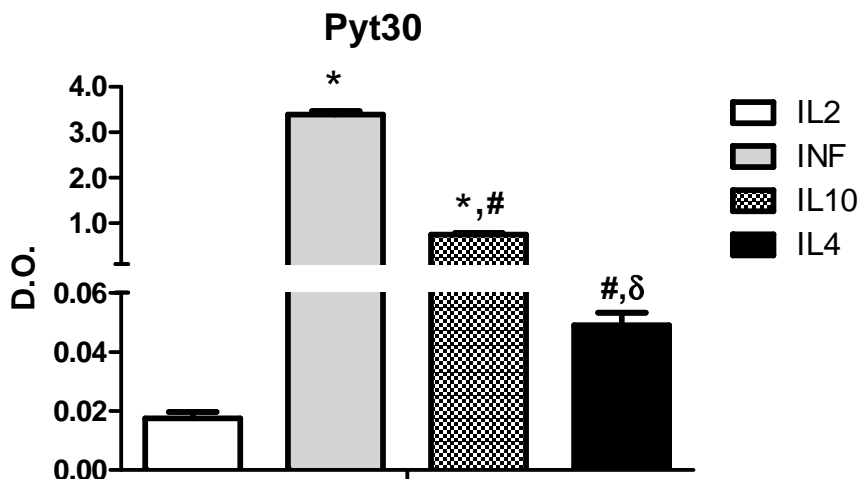


Significativamente diferente do (*) grupo controle. Teste t de Student ($p < 0,05$).

A citocina foi dosada no sobrenadante do cultivo de células após 72 horas de estímulo, utilizando-se o sistema da R&D Systems. A figura expressa os valores das densidades ópticas a 590 nm.

Na **(Figura 32)** abaixo estão representados comparativamente os valores das densidades ópticas obtidas quando das dosagens das citocinas produzidas por esplenócitos estimulados com 30 μ g do extrato de *P. insidiosum*. Desta forma, é possível observar um perfil misto de citocinas, uma vez que foi identificadas citocinas produzidas pelos fenótipos celulares do tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10), contudo com diferenças significativas em seus níveis.

Figura 32 - Valores de D.O. para INF γ , IL-2, IL-4 e IL-10.



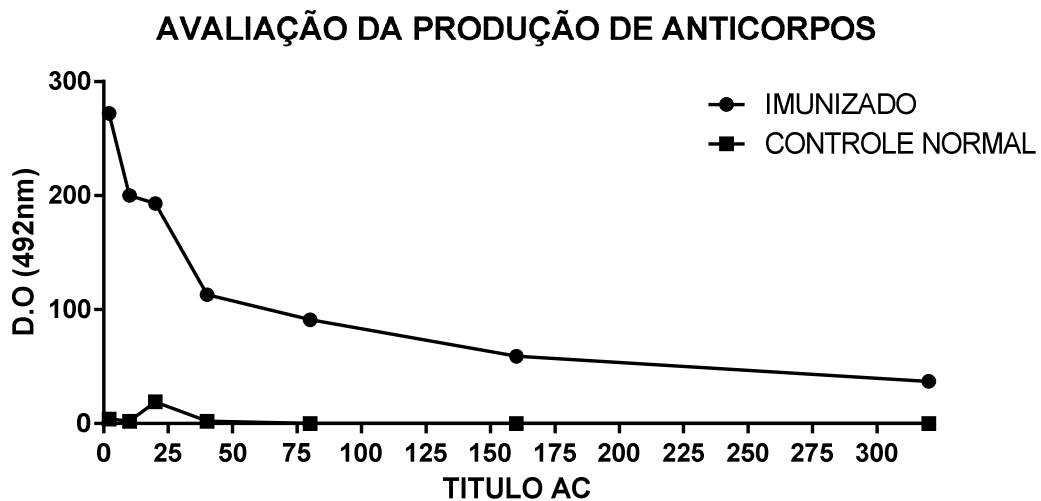
Significativamente diferente do (*) IL2, (#) grupo INF- γ e (δ) IL10. One-way Anova, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A citocina foi dosada no sobrenadante do cultivo de células após 72 horas de estímulo, utilizando-se o sistema da R&D Systems. A figura expressa os valores das densidades ópticas a 590 nm.

7.7 Dosagem de anticorpos IgG em soro de animais imunizados e controle

A dosagem de anticorpos IgG presentes no soro de animais imunizados e do grupo controle revelou um baixo título de anticorpos específicos para antígenos de *P. insidiosum*. É importante ressaltar que a quantidade de anticorpos no grupo imunizado foi considerada estatisticamente maior do que do grupo controle ($p < 0,05$), conforme ilustra a (Figura 33), com maiores leituras sendo registradas entre as diluições de 1:10 até 1:320 do soro dos animais imunizados.

Figura 33 - Avaliação dos níveis de anticorpos IgG no soro de camundongos BALB/c imunizados com extrato antigênico de *P. insidiosum* por reação imunoenzimática indireta.



Os soros imune e controle foram diluídos de 1:5 a 1:320 e após a revelação a leitura foi realizada a 492nm.

8. DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário intracelular, o qual é transmitido através de um vetor. As manifestações da doença vão desde lesões localizadas que algumas vezes se curam espontaneamente, formas mucocutâneas mais agressivas, até a forma visceral, em que há risco de morte. É considerada uma doença negligenciada que aflige principalmente pessoas de baixo nível socioeconômico em países em desenvolvimento (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

O controle da doença baseia-se em medidas de combate ao vetor e as opções de tratamento são limitadas, por questões de toxicidade, resistência e duração do mesmo. Desta forma, é grande a demanda de terapias inovadoras e alternativas para o tratamento da leishmaniose, assim como a necessidade de desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes. Estudos que abordam a estratégia da imunoterapia têm demonstrado sucesso em animais e também em casos da doença em humanos. Entretanto, os imunoterápicos ainda não são utilizados amplamente na clínica médica (OKWOR *et al.*, 2012).

No presente estudo, avaliamos a capacidade de um extrato antigênico do oomiceto *P. insidiosum* atuar como um modulador da resposta imune na Leishmaniose Tegumentar causada por *L. major*.

Antes de iniciarmos os experimentos com animais, avaliamos o padrão eletroforético do extrato de *P. insidiosum*. As eletroforeses coradas pelo azul de Comassie e pela prata revelaram a presença de bandas proteicas de baixo, médio e alto peso molecular. Ressalta-se que as eletroforeses foram realizadas após mais de um ano de acondicionamento do extrato proteico a -20°C, obtendo-se sempre o mesmo perfil eletroforético, o que permite-nos inferir que o extrato, tal como é obtido é estável, mantendo-se íntegro mesmo após alguns ciclos de congelamento e descongelamento.

Nas **(Figuras 2 e 3)**, é possível observar as bandas de proteínas com massa molecular entre 29 e 200 kDa, similares aos achados relatados por Mendoza *et al.*, (1992). Tais evidências refutam nossos resultados e garantiram as boas condições de uso do extrato nos experimentos.

O *P. insidiosum* pode ser considerado um patógeno emergente em humanos e, portanto, é esperado que a frequência de infecções causadas por este agente

aumente futuramente. Devido à rápida progressão da doença, testes rápidos e sensíveis são necessários para o correto diagnóstico e monitoramento da mesma, o que permanece sendo um desafio, uma vez que não há um padrão ouro para tal (SALIPANTE et al.; 2012). Muitos dos estudos voltados para elucidação de um teste diagnóstico eficaz evidenciaram a presença de proteínas imunodominantes em amostras de animais e humanos infectados pelo *P. insidiosum* (VANITTANAKOM et al.; 2004).

Mendoza *et al.*, (1992) avaliaram reações de amostras de soro de cavalos com pitiose ativa curados por vacinação, além de animais saudáveis, através de SDS-PAGE e imunoblotting contra cinco cepas do oomiceto. Após transferência para membrana de nitrocelulose, os antígenos reagiram com as amostras de soro. As amostras de cavalos com pitiose ativa reconheceram pelo menos 20 antígenos em todas as cepas do patógeno e três antígenos com peso molecular de 30, 32 e 28 Kd pareceram ser imunodominantes e específicos. Para as amostras de soro de animais curados, apenas 5 bandas reagiram fracamente e para os animais saudáveis não foi observada reação com nenhuma banda. Os autores consideraram que tal achado seria importante para fins de diagnóstico e imunoterapia.

Krajaejun *et al.*, (2006) analisaram 16 cepas de *P. insidiosum* provenientes de indivíduos infectados e 12 amostras de soro de pacientes tailandeses com diferentes manifestações clínicas da doença. Eles observaram a presença de anticorpos contra um antígeno imunodominante de 74kDa em todas as amostras utilizando Western blot (WB) e desta forma, defenderam a ideia de que a proteína pode ser um alvo auxiliar em testes diagnósticos e desenvolvimento de vacinas contra a doença.

Mendoza *et al.*, (1992), observaram também, que a adição dos antígenos imunodominantes de peso molecular de 30, 32 e 28kDa na vacina de *P. insidiosum*, aumentou a eficácia da mesma no tratamento de equinos.

O reconhecimento de proteínas imunodominantes presentes nos extratos da VPI e sua futura caracterização certamente ajudarão no entendimento acerca das questões imunológicas e imunoterapêuticas relacionadas aos antígenos do *P. insidiosum*, assim como no desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficazes.

Após a constatação de que o extrato antigênico estava apto para ser usado nos experimentos, avaliamos, portanto, sua capacidade de proteção frente a uma infecção desafio causada por *L. major*, assim como seu papel imunoterápico em animais infectados com promastigotas de *L. major*. Tal análise foi realizada por meio

da comparação entre as diferenças das medidas do coxim plantar sadio e infectado de camundongos BALB/c (n=10) em milímetros. A avaliação da proteção contra a forma tegumentar da doença, por meio do acompanhamento do tamanho das lesões em camundongos susceptíveis e também em outras linhagens resistentes, tem sido extensamente utilizada em estudos com quimioterápicos, imunoterápicos ou a combinação dos dois. Geralmente, o que se percebe é uma correlação entre a diminuição das lesões e a diminuição da carga parasitária no local (CORWARE *et al.*, 2011; OHKUSU *et al.*, 2000; UDAIKUMAR *et al.*, 2002).

Após as semanas de acompanhamento e medida das lesões, foi possível observar que houve diferença estatística entre os grupos imunizado e tratado, além da diferença dos dois grupos isolados em relação ao grupo controle. Houve um retardamento no surgimento do edema e de lesões no grupo imunizado, o qual foi sacrificado na décima segunda semana pós-infecção. Já o grupo tratado com o extrato de *P. insidiosum* revelou um desenvolvimento rápido das lesões, menos intenso do que no grupo controle, o qual precisou ser sacrificado na terceira semana pós-infecção.

De acordo com os resultados encontrados, é possível presumir que o uso do extrato antigênico do *P. insidiosum*, apesar de não impedir o surgimento das lesões, teve participação na redução do tamanho e no tempo de desenvolvimento das mesmas. Seria interessante, portanto, realizar tal experimento utilizando uma associação entre um fármaco e o extrato antigênico do *P. insidiosum*, ou então de um antígeno proveniente da *L. major* ou uma citocina ativadores do perfil Th1, a fim de avaliar algum efeito sinérgico na proteção e/ou terapia contra a infecção.

De acordo com estudos de Okwor *et al.* (2012), Kaye e Scott (2011), o papel das células envolvidas na imunidade inata é considerado primordial na resolução da leishmaniose tegumentar, por atuarem nos estágios iniciais da infecção. O reconhecimento do patógeno e a ativação de células fagocitárias e/ou apresentadoras de antígenos são de extrema importância para produção de citocinas e ativação posterior de células T efetoras.

Os neutrófilos atuam nos primeiros eventos após a infecção, como foi demonstrado por Peters *et al.*, (2008). As células dendríticas, por sua vez, são consideradas críticas para o início de uma resposta imune efetiva contra o patógeno, por meio da apresentação de antígenos, da ativação celular e da regulação de células co-estimulatórias (STEBUT *et al.*, 1998). Em nosso trabalho, encontramos

altos títulos de IgG, o que indica a ativação de células dendríticas pelos imunógenos de *P. insidiosum*.

Já as células NK acumulam-se rapidamente no sítio de inoculação do parasita e a proteção induzida pelas mesmas contra a infecção pode ser evidenciada pelo seu recrutamento em pacientes que respondem ao tratamento. No entanto, os macrófagos são considerados os principais fagócitos de promastigotas e o maior nicho de amastigotas. Quando ativados, principalmente por meio de IFN γ , há produção de reativos do nitrogênio, responsáveis por eliminar os parasitas internalizados nos vacúolos lisossômicos (PEREIRA et al.; 2009).

Acredita-se que os antígenos do *P. insidiosum* possam modular a resposta imune estimulando a produção de IFN γ e de radicais de nitrogênio, além de ativar a resposta citotóxica das células DC8⁺, facilitando a eliminação do patógeno. Vários autores utilizaram e aprovaram o modelo de infecção através das medidas de lesões desenvolvidas no coxim plantar de camundongos após desafio, por diferentes espécies de leishmanias, de modo semelhante ao desenvolvido em nosso trabalho (KHALILI et al., 2011; KUMARI et al., 2011; SALEHABADI et al., 2014).

A proteção induzida pelo extrato do *P. insidiosum* pôde ser verificada também por meio da análise histopatológica dos coxins plantares dos grupos imunizado e controle, a qual nos permite dimensionar também a extensão da carga parasitária no sítio da infecção. Ressalta-se que esta análise histopatológica em camundongos BALB/c imunizados com a VPI ainda não foi descrita na literatura, sendo nossa análise pioneira.

Verificou-se por meio das amostras preparadas em micrótomo e coradas por HE e por Giemsa que o grupo controle apresentou uma reação inflamatória acentuada com intensa quantidade de formas amastigotas de leishmania intracelulares e no interstício tecidual. Os dados encontrados estão de acordo com Rocha-Vieira et al., (2003), os quais sugerem que a infecção de camundongos BALB/c por *L. major* leva ao desenvolvimento de lesões cutâneas progressivas, com grande infiltrado inflamatório, as quais se correlacionam com o estabelecimento de uma resposta imunológica Th2 e ineficiência da resposta imune celular.

O infiltrado mononuclear das análises histopatológicas evidenciaram a presença de macrófagos e linfócitos, além de uma reação granulomatosa, os quais são esperados em infecções já crônicas, de acordo com Stebut et al. (2015).

No grupo imunizado com o extrato de *P. insidiosum* foi observada uma reação inflamatória também acentuada, com intensa quantidade de parasitas. Apesar da demora na manifestação das lesões e do edema, a análise histopatológica foi feita em uma amostra colhida na décima primeira semana de acompanhamento, período no qual as ulcerações já começavam a se desenvolver. Presume-se que se tal análise tivesse sido efetuada em amostras das semanas iniciais de acompanhamento, a quantidade de parasitas e do infiltrado inflamatório seria menor, em comparação ao grupo controle.

A modulação da resposta imune consiste em um fator importante no desfecho e evolução clínica da leishmaniose. No caso da infecção tegumentar em camundongos, é possível observar a polarização da resposta imune e o benefício da resposta do tipo celular, na leishmaniose tegumentar humana, às vezes uma resposta do tipo Th1 muito exarcebada pode ser prejudicial ao paciente (SANTOS e BRODSKYN, 2014).

As células CD4⁺ e CD8⁺ são a maior fonte de IFN γ , e tal citocina, assim como o TNF α , controlam a multiplicação do parasita nas primeiras fases da infecção. Entretanto, são também responsáveis por mediar o dano tecidual em humanos (SANTOS e BRODSKYN, 2014).

Oliveira *et al.*, (2014) relatam que a produção aumentada de IFN γ e TNF α na leishmaniose tegumentar causada por *L. brazilienses* é associada ao aumento da reação inflamatória e desenvolvimento de úlceras, enquanto o TGF β tem a propriedade de diminuir a proliferação de linfócitos, macrófagos, células dendríticas e NK, além de diminuir a produção de citocinas. A neutralização do IFN γ diminui a produção de TNF α e desta forma é possível controlar a inflamação exarcebada. A IL-10 também é importante no controle da reação inflamatória, já que possui propriedade de diminuir a ação do IFN γ .

Na LMC, observa-se uma resposta imune mais eficaz, até mesmo exacerbada, que pode contribuir para o dano tecidual muitas vezes observado em tais pacientes. Bacellar *et al.*, (2002) observaram que células de pacientes com LMC estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania* secretam altas concentrações de TNF α e IFN γ quando comparadas com CL e especulam que uma resposta Th1 aumentada ocorra, em partes, devido a participação diminuída de citocinas Th2, como IL-10 e TGF.

Na LCD, entretanto, observa-se que há alta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 e pouca produção de IFN γ na fase ativa da doença. Devido a tais características, a leishmaniose cutânea difusa é conhecida como uma forma anérgica da leishmaniose, em que há pouca produção de citocinas pró-inflamatórias (BONFIM et al., 1996). Neste caso, a VPI poderia ter bons resultados, conforme nossos resultados de ativação de linfócitos produtores de IFN γ e IL-2 após estímulo com os antígenos do oomiceto.

No entanto, nos modelos murinos de infecção da leishmaniose, a polarização da resposta imune no sentido de Th1 é considerada uma ótima evidência, pois são tais células que atuarão de forma orquestrada no combate contra o patógeno intracelular. Como existem vários relatos do potencial do *P. insidiosum* estimular esta via da resposta imunológica, nesse trabalho avaliamos também o balanço de células esplênicas CD4⁺ e CD8⁺ e seu perfil de citocinas intracelulares após estimulação antigênica pelas frações solúveis do *P. insidiosum*, por meio da citometria de fluxo.

Para a execução deste experimento foi utilizado um pool de células esplênicas de dez camundongos tanto do grupo imunizado como do grupo controle. Foi possível observar no ensaio de marcação “ex vivo” que no grupo imunizado a quantidade de linfócitos foi maior que no grupo controle, assim como em relação aos fenótipos CD4⁺ e CD8⁺.

Já a produção de citocinas intracitoplasmáticas do cultivo de células esplênicas, estimuladas ou não com o extrato do *P. insidiosum*, foi analisada com o intuito de se identificar a origem das citocinas produzidas sob estímulo antigênico. Qualitativamente, observou-se uma maior produção de IFN γ em relação a IL-10. Além disso, houve comprometimento tanto de células CD4⁺ como de CD8⁺ na produção de IFN γ , sendo a principal fonte desta citocina as células CD8⁺.

A ativação de células CD8⁺ virgens é dependente da ação de uma célula apresentadora de antígeno, a qual o processa por via endógena e o apresenta através do MHC de classe I nos linfonodos. Essa interação permite então que células CD8⁺ tornem-se ativadas e iniciem a produção de citocinas, principalmente de INF γ (MACHADO et al., 2002).

Antígenos solúveis do extrato de *P. insidiosum* parecem, portanto, reunir um significativo potencial estimulatório desta natureza, considerando-se a elevação do percentual dessas células no sangue periférico de camundongos imunizados com o

extrato proteico. Tal fato é extremamente importante no contexto das leishmanioses tegumentares, tendo em vista as características citolíticas desempenhadas por células CD8⁺ (DA-CRUZ *et al.*, 2002).

Um estudo que utilizou o modelo de infecção causada por baixo número de parasitas, demonstrou que as células CD8⁺ são importantes para o controle primário da infecção em cepas resistentes infectadas por *L. major*. Em tal modelo, as células CD8⁺ produzem INF γ e promovem a mudança inicial do fenótipo Th2 para uma resposta do tipo Th1 (BELKAID *et al.*, 2002). O mesmo já foi observado em células de pacientes saudáveis cultivadas por 96 horas e estimuladas por *L. amazonensis*: as células CD8⁺ foram as primeiras a apresentarem marcadores de ativação importantes para a ativação Th1 (POMPEU *et al.*, 2001).

Tais propriedades das células T CD8⁺ evidenciam seu papel na cura da forma tegumentar da leishmaniose, assim como sua importância na proteção em casos de reinfecção da doença. (COUTINHO *et al.*, 1996; RUIZ; BECKER, 2007; TOLEDO *et al.*, 2001; KEMP *et al.*, 1999; DA-CRUZ *et al.*, 1994). Os nossos resultados são animadores, uma vez que demonstram, em tese, a capacidade dos antígenos de *P. insidiosum* ativarem linfócitos, tanto CD8⁺ como CD4⁺.

Em relação ao fenótipo CD4, seus níveis no grupo controle mostraram-se acima do valor de cut-off, possivelmente, pelo fato de que no pool formado por células esplênicas de dez camundongos, algum(ns) dele(s) poderia(m) apresentar esse fenótipo inespecificamente elevado, contribuindo para o aumento do percentual celular final neste grupo. Ainda assim, seus níveis foram maiores no grupo imunizado com o extrato antigênico. Em camundongos, a resistência à infecção está relacionada à ativação de células CD4⁺ produtoras de IFN γ , principalmente via IL-12, enquanto a susceptibilidade está relacionada à produção de IL-4 pelas mesmas no início da infecção (LOCKSLEYE *et al.*, 1995). A contenção e eliminação dos parasitas dependem, portanto, diretamente destas células efetoras do fenótipo Th1.

Além da marcação de superfície no *ex vivo*, avaliamos também a concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de células para identificarmos aquelas que estavam sendo efetivamente secretadas. Observou-se que a citocina produzida em maior quantidade foi o INF γ : com 600pg/ml. Já a concentração de IL-2 foi 150pg/ml; enquanto para IL-4 foi 177,5pg/ml e para IL-10 foi de 45pg/ml.

A razão entre INF γ /IL-4 e INF γ /IL-10 demonstra uma produção três e treze vezes maior de INF γ , respectivamente. Desta forma, sete dias após o término do

esquema de imunização, constata-se a existência de um perfil misto de citocinas com tendência à polarização Th1, pois os níveis de IL-4 e IL-10 são menores que os de IFN- γ . Presume-se que se esta análise fosse procedida em um período de tempo maior após o término da imunização, definir-se-ia melhor o perfil de citocinas com possíveis diminuições de IL-4 e IL-10, citocinas do perfil Th2.

O perfil misto de citocinas já foi relatado também em outros estudos de proteção vacinal, como, por exemplo, com o uso de uma fração proteica de *Candida* contra *Staphylococcus aureus*. Spellberg *et al.*, (2008) observaram que a imunização protegeu camundongos contra a infecção pela bactéria mesmo com a presença de citocinas do perfil Th2. Como no nosso estudo, a razão de células Th1/Th2 mostrou-se proeminente para o fenótipo Th1.

A imunização de camundongos com o extrato antigênico de *P. insidiosum* foi capaz também de produzir baixos níveis de anticorpos IgG, o que pode sugerir que o ramo da imunidade efetivamente atuante na indução da proteção seja do tipo celular. Outras classes de imunoglobulinas, por outro lado, podem estar presentes em elevados títulos, como a IgE.

A imunoterapia e a imunoquimioterapia têm sido utilizadas como novas abordagens no tratamento da leishmaniose. A imunoterapia tem a capacidade de acelerar a resposta imune em pacientes imunocompetentes e de estabelecer uma resposta satisfatória nos imunossuprimidos. Já na imunoquimioterapia, o que se observa é que o imunoterápico aumenta a resposta imune em um efeito sinérgico e, desta forma, possibilita a diminuição da dose da quimioterapia, a qual muitas vezes é tóxica (EL-ON, 2009).

O desenvolvimento de fármacos e vacinas eficazes contra a leishmaniose apresentam algumas dificuldades, visto que diferentes cepas e espécies causadoras da doença podem desenvolver diferentes padrões de respostas imunológicas (ASADPOUR *et al.*, 2013). Por isso, o uso de uma substância que possa ser empregada como adjuvante e estimuladora da resposta imune celular é de extrema importância para o desenvolvimento de métodos alternativos e/ou auxiliares na prevenção ou tratamento da doença.

O sucesso da terapia em animais e pacientes com o uso da VPI em casos de pitiose fornecem evidências suficientes para investigações do seu papel imunomodulador na leishmaniose, assim como em outros tipos de infecções causadas por patógenos intracelulares.

9. CONCLUSÃO

1. A demonstração de bandas proteicas obtidas por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida evidenciou que o extrato antigênico de *P. insidiosum* estava íntegro e, portanto, assegurou seu uso em nossos experimentos;
2. A demora na manifestação do desenvolvimento de edema e de ulcerações no grupo imunizado com o extrato proteico de *P. insidiosum* sugere a imunomodulação promovida pelo extrato e seu papel na estimulação e ativação da resposta imune celular, primordial para o extermínio do patógeno intracelular;
3. A presença de citocinas IFN- γ e IL-10, principalmente, sugere um perfil misto de citocinas induzidas pelo extrato de *P. insidiosum*. Porém, os valores aumentados da razão entre as citocinas INF γ /IL-4 e INF γ /IL-10, indicam uma tendência ao deslocamento para o perfil Th1;
4. A baixa quantidade de imunoglobulinas IgG presente no soro de animais imunizados contra antígenos presentes no extrato antigênico confirma, em tese, a tendência para o predomínio do fenótipo Th1;
5. A produção proeminente de IFN γ principalmente pelas células CD8⁺ sugere, como em outros estudos, um papel importante destas células na proteção contra infecção por *L. major*;

10. PERSPECTIVAS

O presente estudo teve por objetivo central demonstrar que antígenos de *P. insidiosum* possuem importante efeito modulador na imunidade celular servindo assim, como base para a validação do uso do extrato antigênico como agente vacinal, imunoterapêutico ou adjuvante. Entretanto, outras análises tornam-se necessárias para o pleno esclarecimento de outras propriedades imunobioquímicas do extrato antigênico em questão:

1. Obtenção de uma fração molecularmente definida que contenha as principais atividades imunomoduladoras do extrato antigênico;
2. Realizar um estudo de predição de epitopos capazes de induzir a estimulação de células T e B, através de estudos de imunoproteômica;
3. Definir o significado imunológico da presença de IgE já demonstrado por outros autores como um importante marcador da atividade humoral em animais imunizados com antígenos de *P. insidiosum*;
4. Investigação do potencial imunomodulador em outros modelos de infecção intracelular em que há predomínio da resposta Th2.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. P.; BRITO, J.; MACHADO, P. L.; JESUS, A. R. de.; SCHRIEFER, A. GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 73(1), p. 79-81, 2005.

ALVAR, J.; CROFT, S. L.; KAYE, P.; KHAMESIPOUR, A.; SUNDAR, S.; REED, S. G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, vol. 31, p. 244-249, 2013.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, vol. 35, p. 699–705, 2010.

ASADPOUR, A.; RIAZI-RAD, F.; KHAZE, V.; AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H. Distinct strains of *Leishmania major* induce different cytokine Mrna expression in draining lymph node of BALB/c mice. **Parasite Immunology**, vol. 35, p. 35, 42–50, 2013.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W. O. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**, vol. 70, p. 6734-40, 2002.

BARROSO, P. A.; MARCO, J. D.; CALVOPINA, M.; KATO, H.; KORENAGA, M.; HASHIGUCHI, Y. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 59, p. 1123-1129, 2007.

BELKAID, Y; STEBUT, V; MENDEZ, S; LIRA, R; CALER, E; BERTHOLET, S. CD8+Tcells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J Immunol**, vol. 168, p. 3992–4000, 2002.

BIRNBAUM, R.; CRAFT, N. Innate Immunity and *Leishmania* Vaccination Strategies. **Dermatol Clin**. vol. 29, p.89–102, 2011.

BONFIM, G.; NASCIMENTO, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. A variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **ExpParasitol**, vol. 84, p. 188-194, 1996.

CHINDAMPORN, A.; VILELA, R.; HOAG, K. A.; MENDOZA, L. Antibodies in the Sera of Host Species with Pythiosis Recognize a Variety of Unique Immunogens in Geographically Divergent *Pythium insidiosum* Strains. **Clinical and vaccine immunology**, vol. 16, p. 330-336, 2009.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitol.** vol.21, no5, p. 244-249, 2005.

CONCEA, Diretrizes da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, (BRASIL, 2013). Disponível em <<file:///C:/Users/tatimif/Saved%20Games/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%20C3%81TICA%20DE%20EUTAN%20C3%81SIA%20DO%20CONCEA.pdf>>

Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **WHO technical report series**, no. 949, p.104-106, 22-26 de março de 2010.

CONVIT, J.; CASTELLANOS, P.L. ; RONDON, A. ;PINARDI, M.E. ; ULRICH, M. ;CASTES, M.;BLOOM, B.;GARCIA, L. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, vol.1, p.401-405, 1987.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; POLEGRE, M. A.; AVILA, A.; RODRIGUESZ, N.; MAZZEDO, M. I.; BLANCO, B. Therapy of Venezuelan Patients with Severe Mucocutaneous or Early Lesions of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis with a Vaccine Containing Pasteurized *Leishmania* Promastigotes and *Bacillus Calmette-Guerin* - Preliminary Report. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Vol. 99(1), p. 57-62, 2004.

CORWARE, K.; HARRIS, D.; TEO, IAN.; ROGERS, M.; NARESH, K.; MULLER, I.; SHAUNAK, S. Accelerated healing of cutaneous leishmaniasis in non-healing BALB/c mice using water soluble amphotericin B-polymethacrylic acid. **Biomaterials**, vol. 32, p.8029-8039, 2011.

COUTINHO, S. G. et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Experimental Parasitology**, v. 84, p.144-155, 1996.

DA-CRUZ, A. M. et al. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, 1994.

DANTAS, M. L.; OLIVEIRA, J. C.; CARVALHO, L.; PASSOS, S. T.; QUEIROZ, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.; ARRUDA, S. CD8⁺ T cells *in situ* in different forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev da Soc Bras de Med Trop**, vol 46(6), p. 728-734, 2013.

ELMAHALLAWY, E. K.; AGIL, A. Treatment of Leishmaniasis: A Review and Assessment of Recent Research. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 21, p. 2259-2275, 2015.

EL-ON, J. Current Status and Perspectives of the Immunotherapy of Leishmaniasis. **IMAJ** , vol, 11, 2009.

FARIA, D. R.; SOUZA, P. E. A.; DURFFIES, F. V.; CARVALHO, E. M.; GOLLOB, K. J.; MACHADO, P. R.; DUTRA, W. O. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, vol. 31, p. 432–439, 2009.

ARAÚJO, F. T. M.; TEIXEIRA, A. C. P.; ARAÚJO, M. S. S.; SILVA, C. H.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; MARTINS-FILHO, O.; PERYHYPE-MAGALHÃES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ – MINAS GERAIS. **RESBCAL**, vol.3, p. 95-102, 2015.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A.; COCK, A. W. A. M. de.; EXEL, T. K.; PEGGE, R. B. G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An overview. **Vet. Microbiol.** vol. 146, p. 1-16, 2010.

GARCIA, R. B.; PASTOR, A.; MENDOZA, L. Mapping of *Pythium insidiosum* hyphal antigens and ultrastructural features using TEM. **Mycological research**, p. 1352-1360, aug. 2007.

GENARO, O.; TOLEDO, V. P. C. P.; COSTA, C. A. da.; HERMETO, M. V.; AFONSO, L. C. C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clinics in dermatology**, v. 14, p. 503-512, 1996.

GILL, V.; GILL, P. Immunotherapy and Immunochemotherapy for Leishmaniasis: An Overview. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, vol. 2, p.2277-5005, 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin**, vol. 26, p. 293-307, 2012.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (2008). Disponível em < <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>>

HERMETO, M.V; GENARO, O; COSTA, C.A; TOLEDO, V. P. C. P; MICHALICK, M. S. M; MELO, M.N; MAGALHÃES, P. A; RESENDE, F. S; DIAS, M; WILLIAMS, P; MAYRINK, W. Immunotherapy for American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil, using Leishvacin. Workshop National sobre Leishmanioses, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Recife, 1993.

JIMÉNEZ, M. C. C.; DÍAZ, N. B.; MONTERO, J.; PACUAL, A. Pythium insidiosum ocular infection. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. vol. 31, p. 118-122, 2013.

JOSHI, J.; MALLA, N.; KAUR, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, 63, p. 612–620, 2014.

KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: Emerging tropical diseases. **Mycopathol**. vol. 143, p. 3–7, 1998.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature**, p. 604-6015, v.9, 2011.

KEMP, K. et al. Interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 49, n. 6, p. 655- 659, 1999.

KHALILI, G.; DOBAKHTI, F.; NIKNAM, H. M.; KHAZE, V.; PARTOVI, F. Immunotherapy with Imiquimod Increases the Efficacy of Glucantime Therapy of Leishmania major Infection. **Iran.J.Immunol**. Vol.8, N.1, 2011.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S; GAAFAR, A; KURTZHALS, J. A. L; HASSAN, A. M; THEANDER, T. G; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol let**. vol. 65, p.105-108, 1999.

KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; PRACHARKTAM, R.; CHONGTRAKOOL, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; VANITTANAKOM, N.; CHINDAMPORN, A.; MOOTSIKAPUN, P. Identification of a novel 74-kilodalton Immunodominant antigen of Pythium insidiosum Recognized by Sera from Human Patients with Pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1674-1680, 2006.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, vol. 3, 2014.

KUMARI, S.; SINGH, S.; SAHA, B.; PALIWAL, K. *Leishmania major* MAP kinase 10 is protective against experimental *L. major* infection. **Vaccine**, vol. 29, p.8783-8787, 2011.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIESE, J.; SCHLEICHERA, B.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**. vol. 213, p. 377–387, 2008.

LOMBONA-GONZALEZ, C. Z; SANTIAGO, H. C; MACEDO, J. P; SEIXAS, J. P; RUSSO, R. C; TAFURI, W. L; AFONSO, L. C. C; VIEIRA, L. Q. Early infection with *Leishmania major* restrains pathogenic response to *Leishmania amazonensis* and parasite growth. **Acta Tropica**, vol. 106, p. 27-38, 2008.

MACHADO, P; KANITAKIS, J; ALMEIDA, R. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **Eur J Dermatol**, vol. 12, p. 449-451, 2002.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFAS, W. T.; NASCIMENTO, E.; COELHO, G. L. L. M. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Ver. da Soc. Bras. de Med.Tropical**, vol. 39(1), p. 14-21, jan-fev, 2006.

MAYRINK, W.; MAGALHAES, P. A.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, C. A.; LIMA, A. O.; MELO, M. N.; TOLEDO, V. P. C. P.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O.; HERMETO, M. V.; WILLIAMS, P. Immunotherapy as a treatment of american cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parasitologia**, vol. 34: p. 159-165, 1992.

MAYRINK, W.; SANTOS, G. C. dos.; TOLEDO, V. P. C. P.; GUIMARÃES, T. M. P. D.; COELHO, G. L. L. M.; GENARO, O.; COSTA, C. A. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p. 125-132, mar-abr, 2002.

MCSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F.Y. Immunology of murine leishmaniasis. **Clinics in Dermatol.** vol. 14, p. 451-464, 1996.

MENDOZA, L; HERNANDEZ, F; AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **J Clin Microbiol.** p. 2967-2973, nov 1993.

MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol. 6, p.715, 2011.

MENDOZA. L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**, vol. 21, p. 2797–2804, 2003.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Med. Mycol.** vol. 43, p. 477-486, sept. 2005.

MENDOZA, L., NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J. F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 30, p. 2980–2983, 1992.

MILON, G.; GIUDICE, G. D.; LOUIS, J. A. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Today.** p. 244-247, vol. 11, no 7, 1995.

MULLER, I.; PEDRAZZINI, T.; KROPF, P.; LOUIS, J.; MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+Tcells. **IntImmunol**, vol. 3, p. 587-97, 1991.

NOAZIN, S.; MODABBER, F.; KHAMESIPOUR, A. SMITH, P. G.; MOULTON, L. H.; NASSERI, K.; SHARIF, I.; KHALIL, E. A. G.; BERNAL, I. D. V.; ANTUNES, C. M. F.; KIENY, M. P.; TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, 26, p. 6759-6767, 2008.

OHKUSU, K.; YOSHIMOTO, T.; TAKEDA, K.; OGURA, T.; KASHIWAMURA, S-C.; IWAKURA, Y.; AKIRA, S.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. Potentiality of Interleukin-18 as a Useful Reagent for Treatment and Prevention of *Leishmania major* Infection. **Infection and immunity**, p. 2449–2456, 2010.

OKWOR, I.; MOU, Z.; LIU, D.; UZONNA, J. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Front Immunol.** vol.8, p. 1-13, 2012.

OLIVEIRA, C. I.; TEIXEIRA, M.J.; GOMES, R.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discov. Today: Disease Models**, vol.1, no 1, p. 81-86, 2004.

OLIVEIRA, M. A. P.; SANTIAGO, H. C.; LISBOA, C. R.; CERAVOLLO, I. P.; TRINCHIERI, G.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. Leishmania sp: Comparative Study with Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi in Their Ability to Initialize IL-12 and IFN- γ Synthesis. *Experimental Parasitology*, vol.95, p. 96-105, 2000.

OLIVEIRA, W. N.; RIBEIRO, L. E.; SCHRIEFFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, vol. 66, p. 127–132, 2014.

PALATNIK-de-SOUZA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, 26, p. 1709—1724, 2008.

PEREIRA, L. I.; DORTA, M. L.; PEREIRA, A. J.; BASTOS, R. P.; OLIVEIRA, M. A.; PINTO, S. GALDINO, H.; MAYRINK, W.; BARCELOS, W. TOLEDO, V. P. C. P.; LIMA, G. M. C. A.; RIBEIRO-DIAS, F. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. **AmJTropMedHyg**, vol. 81, p. 378–83, 2009.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunological Reviews**, vol. 213, p.159-179, 2006.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, p. 321, 2008.

POMPEU, M. M; BRODSKYN, C; TEIXEIRA, M. J; CLARÊNCIO, J; VANWEYENBERG, J; COELHO, C. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infect Immun**, vol. 69, p. 7453–60, 2001.

RAMAN, V. S.; BHATIA, A.; PICONE, A.; WHITTLE, J.; BAILOR, H. R.; O'DONNELL, J.; PATTABHI, S.; GUDERIAN, F. A.; MOHAMATH, R.; DUTHIE, M.

S.; REED, S. Applying TLR Synergy in Immunotherapy: Implications in Cutaneous Leishmaniasis. **J Immunol**, 185, p.1701-1710, 2010.

ROCHA-VIEIRA, E.; FERREIRA, E.; VIANNA, P.; FARIA, D.; GAZE, S. T.; DUTRA, W. O; GOLLOB, K. J. Histopathological outcome of Leishmania major-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-cysteine. **Immunology**, vol. 108, p. 401-408, 2003.

RUIZ, J.H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, vol. 29, p. 671-678, 2007.

SALEHABADI, A.; KARAMIAN, M.; FARZAD, M. H.; NAMEI, M. N.; Effect of root bark extract of Berberis vulgaris L. on Leishmania major on BALB/c mice. **Parasitol Res**, vol. 133, p. 953-957, 2014.

SALIPANTE, S.; HOOGESTRAAT, D. R.; SENGUPTA, D. J.; MURPHEY, D.; PANAUIDES, K.; HAMILTON, E.; CASTANEDA-SANCHEZ, I.; KENNEDY, J. MONSAAS, P. W.; MENDOZA, L.; STEPHENS, K. DUNN, J.J.; COOKSON, B. T. Molecular diagnosis of Subcutaneous Pythium insidiosum infection by use of PCR screening an DNA sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, p. 1480, 2012

SANTOS, C da S.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, vol. 2, 2014.

SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTE, J. S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Sci Vet**. vol. 34, p. 1-14, 2006.

SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; FESTUGATTO, R.; LUBECK, I.; SALLIS, E. S. V.; COPETTI, M. V.; ALVES, S. H.; FERREIRO, L. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiososi developed and evaluated. **Vaccine**, vol. 21, p. 2535-2540, 2003.

SIMON, J. C. Leishmaniasis. **Deutsche Dermatologische Gesellschaft (JDDG)**, vol. 9, p. 754–765, 2008.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, 30, p. 3834-3842, 2012.

SPELLBERG, B.; IBRAHIM, A. S.; YEAMAN, M. R.; LIN, L.; FU, Y.; AVANESIAN, V.; BAYER, A. S.; FILLER, S. G.; LIPKE, P.; OTOO, H.; EDWARDS, J. E. The Antifungal

Vaccine Derived from the Recombinant N Terminus of Als3p Protects Mice against the Bacterium *Staphylococcus aureus*. *INFECTION AND IMMUNITY*, p. 4574–4580, 2008.

STEBUT, E. BELKAID, Y. JACOB, T. SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J ExpMed*, vol. 188, p. 1547–52, 1998.

STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Deutsche Dermatologische Gesellschaft (JDDG)**, vol. 1303, p. 1610, 2015.

THE JORDAN REPORT. Accelerated development of vaccines National Institute of Health, USA, p. 139-140, 2002.

THITITHANYANONT, A.; MENDOZA, L.; CHUANSUMRIT, A.; PRACHARKTAN, R.; LAOTHAMATAS, J.; SATHAPATAYAVONGS, B.; LOLEKHA, S.; AJELLO, L. Use of an Immunotherapeutic Vaccine to Treat a Life-Threatening Human Arteritic Infection Caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 18, p. 1394-1400, 1998.

TOLEDO, V. P. C. P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K. J.; OLIVEIRA, M. A. P.; COSTA, C. A. da.; GENARO, O.; PINTO, J. A.; AFONSO, L. C. C. Immunochemotherapy in american cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Mem Inst Oswald Cruz**, v. 96, p. 89-98, Rio de Janeiro, jan. 2001.

TONDOLO, J. S. M.; LORETO, E. S.; DENARDI, L. B.; MARIO, D. A. N.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, p. 52-54, 2013.

TRUNOVA, G. V; MAKAROVA, O. V; DIATROPTOV, M. E; BOGDANOVA, I. M; MIKCHAILOVA, L. P; ABDULAEVA, S. O. Morphofunctional Characteristic of the Immune System in BALB/c and C57Bl/6 Mice. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, vol. 151, p. 112-115, 2011.

VANITTANAKOM, N.; SUPABANDHU, J.; KHAMWAN, C.; PRAPARATTANAPAN, J.; THIRACH, S.; PRASERTWITAYAKJI, N.; LOUTHRENOO, W.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT, N. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3970-3974, 2004.

VEER, M. J.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T. M.; DIDONATO, J. A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **Eur. J. Immunol.**, 33 (10), p. 2822–2831, 2003.

WANACHIWANAWIN, W.; MENDOZA, L.; VISUTHISAKCHAI, S.; MUTSIKAPAN, P.; SATHAPATAYAVONGS, B.; CHAIPRASERT, A.; SUWANAGOOOL, P.; MANUSKIATTI, W.; RUANGSETAKIT, C.; AJELLO, L. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, vol. 22, p. 3613–3621, 2004.

WHO – Leishmaniasis. Fact sheet N°375, fevereiro de 2015. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>

WRAY, W.; BOULIKAS, V. P.; HANCOCK, R.; **Anal. Biochem.**, vol. 118, p.197–205, 1981.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no uso de animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 313 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Análise do potencial imunomodulador de um extrato antigênico do oomiceto *Pythium insidiosum* em modelo murino da leishmaniose tegumentar", que tem como responsável VICENTE DE PAULO COELHO PEIXOTO DE TOLEDO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2015. Este certificado expira-se em 26/05/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 313 / 2014, related to the Project entitled "Analysis of immunomodulatory potential of an antigenic extract of the oomycete *Pythium insidiosum* in a murine model of cutaneous leishmanias", under the supervision of VICENTE DE PAULO COELHO PEIXOTO DE TOLEDO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 26/05/2015. This certificates expires in 26/05/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 26/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

