

Mariana Amália Figueiredo Costa

Proteção induzida pela imunização de
camundongos BALB/c com proteínas
ribossomais de *Leishmania* (LRPs)
contra a infecção com *L. chagasi*

**Belo Horizonte
Fevereiro/2010**

Mariana Amália Figueiredo Costa

**Proteção induzida pela imunização de
camundongos BALB/c com proteínas
ribossomais de *Leishmania* (LRPs)
contra a infecção com *L. chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui

Co-orientador: Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

**Belo Horizonte
Fevereiro/2010**

Dedicatória

A meus pais, que, em todos os momentos dessa caminhada, apoiaram-me incondicionalmente;

Ao meu namorado, João Paulo, que esteve ao meu lado auxiliando-me em todas as situações,

Aos meus irmãos que sempre me incentivaram a buscar a realização de meus sonhos,

Dedico a vocês a conclusão desse trabalho!!!!

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Carlos Chavez, meu orientador, pelo acolhimento e oportunidade de trabalho em seu laboratório;

Ao meu co-orientador, Professor Eduardo Antônio, por todos os ensinamentos sobre leishmanioses, pela oportunidade de trabalho e pela amizade;

Ao Professor Tomaz Aroldo pela convivência, sempre muito agradável, pelos ensinamentos e pelos conselhos muito sábios;

À professora Andrea Macedo pelos sábios conselhos e pela disponibilidade de auxiliar quando necessário;

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas: Paula, Eric, Miguel, Diogo, Clara, Camila, Ricardo, Christina, Dulcilene, Maria Clara, Iara, Carol, Fabíola, Luciana, Vivian....

Aos colegas do COLTEC: Rejane, Alair, Karine, Landa, Mariana Duarte, Fernanda, Lourena e Gabriela;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (Professor Alfredo Góes) pela amizade, auxílio em todos os momentos e pela ótima convivência;

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia Físico-Química (Professor Marcelo Santoro) pelo carinho, convivência e intermináveis empréstimos de materiais;

Ao Jamil, pelo auxílio, ensinamentos e amizade;

À Betinha e Ilda, pelo carinho e atenção;

Aos colegas de Bases;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia;

Aos amigos da FUNED, Consuelo, Inácia, Paula, Ana e Regina;

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, carinho e por acreditarem no meu potencial;

Ao meu namorado, João Paulo, pelo carinho, amor, paciência e incentivo;

Aos meus irmãos pelo carinho;

Obrigada a todos que de alguma forma participaram dessa caminhada!!!!

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante."

Charles Chaplin

Resumo

A leishmaniose visceral é uma doença causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que são encontrados em países do Velho Mundo e nas Américas. É uma doença grave e que pode levar à morte, se não tratada. A aquisição de imunidade após a cura da infecção causada por *L. major* culmina na proteção contra a re-infecção pelo parasito, indicando a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a doença. Neste trabalho, a imunização com proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs), isoladas da espécie *L. infantum*, associadas ao adjuvante saponina, foi capaz de induzir uma resposta imune celular do tipo Th1, observada pela produção elevada de IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF e de anticorpos do isotipo IgG2a, específicos às LRPs. Observou-se que essa resposta imune foi capaz de induzir proteção nos animais contra a infecção com *L. chagasi*, verificada pela redução significativa da carga parasitária no baço e fígado dos animais imunizados, quando comparados aos grupos controle (salina e saponina). A proteção foi relacionada com a produção elevada de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF e à baixa produção de IL-4 e IL-10, sendo a produção de IFN- γ dependente de IL-12 e proveniente principalmente de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células natural killer. Portanto, as LRPs, como proteínas altamente conservadas entre as diferentes espécies de *Leishmania* sp., podem se constituir em candidatas para compor uma vacina pan-*Leishmania*.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, proteínas ribossomais de *Leishmania*, resposta imune celular, vacina

Abstract

Visceral leishmaniasis is a disease caused by obligate intracellular protozoa of the *Leishmania* (Ross, 1903) genus, which are found in countries of the Old World and in the Americas. It is a severe disease and can lead to death if not treated. The acquisition of immunity after cure of infection caused by *L. major* culminates in protection against re-infection by the parasite, indicating the possibility of developing a vaccine against the disease. In this study, immunization with *Leishmania* ribosomal proteins (LRPs), isolated from the species *L. infantum*, associated with the saponin adjuvant was able to induce a Th1 cellular immune response observed by the high production of IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF and antibody isotype IgG2a, specific for the LRPs. It was observed that the immune response was able to induce protection in animals against *L. chagasi* infection, verified by the parasite burden reduction in spleen and liver of the immunized animals compared to control groups (saline and saponin). Protection was related to high production of IFN- γ , IL-12p70 and GM-CSF and low production of IL-4 and IL-10, and IFN- γ production was IL-12-dependent and mainly from lymphocytes CD4⁺, CD8⁺ and natural killer cells. Therefore, the LRPs, as proteins highly conserved among different species of *Leishmania* sp., can constitute a candidate to form a pan-*Leishmania* vaccine.

Key-words: Visceral leishmaniasis, *Leishmania* ribosomal proteins, cellular immune response, vaccine

Sumário

Lista de Figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xi
1 – Introdução	17
2 – Revisão da Literatura.....	19
2.1 – Epidemiologia.	19
2.2 – A etiologia e o ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i>.....	20
2.3 – Manifestações clínicas das leishmanioses.....	23
2.3.1 – Leishmaniose visceral.	23
2.3.2 – Leishmaniose tegumentar.....	24
2.4 – Diagnóstico da doença.	25
2.4.1 – Testes parasitológicos.	25
2.4.2 – Testes imunológicos.....	26
2.4.3 – Testes moleculares.	28
2.5 – Medidas de controle da leishmaniose visceral.	28
2.5.1 – Tratamento dos casos humanos.	28
2.5.2 – A eliminação de cães soropositivos.	30
2.5.3 – O controle do vetor flebotomíneo.....	31
2.6 – Resposta imune nas leishmanioses.	31
2.7 – Vacinas contra as leishmanioses.....	35
2.8 – Proteínas Ribossomais de <i>Leishmania</i> (LRPs).....	37
2.9 – Perspectivas futuras.....	39
3 – Objetivos.....	41
3.1 – Objetivo Geral.	41
3.2 – Objetivos específicos.....	41
4 – Materiais e Metodologia.....	43
4.1 – Animais de experimentação.....	43

4.2 – Parasitas.....	43
4.3 – Preparação do extrato protéico solúvel de <i>Leishmania</i> (SLA).....	43
4.4 – Obtenção das LRPs de <i>L. infantum</i>	44
4.5 – Esquema das imunizações.	45
4.6 – Infecção desafio.....	45
4.7 – Cultivo celular.....	46
4.8 – Dosagem de citocinas.	47
4.9 – Dosagem de Óxido Nítrico.....	47
4.10 – ELISA para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2a.	47
4.11 – Carga parasitária.....	48
4.12 – Análise estatística.....	48
5 – Resultados.....	49
5.1 – Produção de Citocinas Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LRPs Associadas à Saponina.	49
5.2 – Produção de Anticorpos Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LRPs Associadas à Saponina.	53
5.3 – Avaliação da Carga Parasitária nos Camundongos após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. chagasi</i>	55
5.4 – Produção de Citocinas pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. chagasi</i>	57
5.5 – Produção de Anticorpos pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. chagasi</i>	62
5.6 – Avaliação da Produção de Nitrito pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção Desafio com <i>L. chagasi</i>	64
6 – Discussão.....	66
7 – Conclusões.	72
8 – Perspectivas.	73

9 – Referências Bibliográficas.....	74
Anexo A – Certificado de Aprovação do CETEA	90

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo biológico do parasita <i>Leishmania</i> sp.	22
Figura 2: Esquema das respostas imunes Th1 e Th2 desenvolvidas após a infecção por <i>Leishmania</i>	33
Figura 3: Análise da produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina.....	51
Figura 4: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina.....	52
Figura 5: Análise da produção de IgG total, IgG1 e IgG2a pelos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina.	54
Figura 6: Carga parasitária no fígado e baço dos camundongos imunizados e após a infecção desafio com <i>L. chagasi</i>	56
Figura 7: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....	59
Figura 8: Avaliação da produção de IFN- γ por camundongos imunizados e desafiados com <i>L. chagasi</i> na presença de anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12.....	60
Figura 9: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados.....	61
Figura 10: Análise da produção IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LRPs pelos camundongos imunizados e desafiados.....	63
Figura 11: Análise da produção de nitrito pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados	65

Lista de abreviaturas

% - porcentagem

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

A2 - antígeno da forma amastigota de *Leishmania donovani*

A40 - Grupo de Proteínas A da subunidade 40S dos ribossomos

A60 - Grupo de Proteínas A da subunidade 60S dos ribossomos

AcNH₄ - Acetato de amônio

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

APCs - Antigen-Presenting Cells

B40 - Grupo de Proteínas B da subunidade 40S dos ribossomos

B60 - Grupo de Proteínas B da subunidade 60S dos ribossomos

C40 - Grupo de Proteínas C da subunidade 40S dos ribossomos

C60 - Grupo de Proteínas C da subunidade 60S dos ribossomos

CD4 – Linfócitos T expressando a proteína CD4 em sua superfície

CD8 – Linfócitos T expressando a proteína CD8 em sua superfície

cDNA - Complementary Deoxyribonucleic Acid

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CO₂ - Dióxido de carbono

ConA - Concanavalina A

D40 - Grupo de Proteínas D da subunidade 40S dos ribossomos

D60 - Grupo de Proteínas D da subunidade 60S dos ribossomos

DAT - Direct Agglutination Test

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA - Deoxyribonucleic Acid

E40 - Grupo de Proteínas E da subunidade 40S dos ribossomos

E60 - Grupo de Proteínas E da subunidade 60S dos ribossomos

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

F60 - Grupo de Proteínas F da subunidade 60S dos ribossomos

FAST - Fast Agglutination Screening Test

FML - Fucose- Manose Ligand

g - grama

G60 - Grupo de Proteínas G da subunidade 60S dos ribossomos

GM-CSF - Granulocyte Macrophage Colony- Stimulating Factor

gp - glicoproteína

gp46 - glicoproteína com 46 kDa

gp63 - glicoproteína com 63 kDa

H2A - Proteína Histona

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HCl - Ácido Clorídrico

HIV - Human Immunodeficiency Virus

hsp 70 - Heat-Shock Protein 70 kDa

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFAT - Indirect Fluorescent Antibody Test

IFN- γ - Interferon gama

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgG1 - Imunoglobulina G tipo 1

IgG2a - Imunoglobulina G tipo 2a

IgM - Imunoglobulina M

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-12p70 - Interleucina 12 com subunidades p35 e p40

IL-13 - Interleucina 13

iNOS - Inducible Nitric Oxide Syntase

K9 - Kinesin-related protein (9 kDa)

K26 - Kinesin-related protein (26 kDa)

K39 - Kinesin-related protein (39 kDa)

KCl - Cloreto de Potássio

kDa - KiloDaltons

L - litro

LACK - *Leishmania* Homologue of Receptors for Activated C Kinase

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCR1 - *Leishmania chagasi* Recombiant Antigen 1

LDPK - Leishmaniose Dérmica pós-Kalazar

LiP0 - *Leishmania infantum* Acidic Protein P0

LiP2a - *Leishmania infantum* Acidic Protein P2a

LiP2b - *Leishmania infantum* Acidic Protein P2b

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LOHA - N^0 -hidroxil-L-arginina

LRP - *Leishmania* Ribosomal Protein

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

M - Molar

MHz - Megahertz

min. - minutos

M-CSF - Macrophage Colony- Stimulating Factor

mg - miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MHC - Major Histocompatibility Complex

mL - mililitros

mM - milimolar

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid

N - Normal

NaNO₂ - nitrito de sódio

NH36 - Nucleoside Hydrolase 36 kDa

NK - Natural Killer

nm - nanômetro

NO - Nitric Oxide

NO²⁻ - Nitrito

ODN-CpG - Oligodeoxynucleotides CpG

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPD - Ortho- Phenylenediamine

P0 - Proteína Ácida Ribossomal P0

P1 - Proteína Ácida Ribossomal P1

P2 - Proteína Ácida Ribossomal P2

P4 - Antígeno de amastigota

P8 - Antígeno de amastigota

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR - Polimerase Chain Reaction

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMSF - Phenyl methane sulphonyl fluoride

PSA-2 - Promastigote Surface Antigen 2

rA2 - Recombinant Protein A2

rGM-CSF - Recombinant GM-CSF

rK26 - Recombinant Protein K26

rK39 - Recombinant Protein K39

rLdcccys1 - Recombinant Cysteine Proteinase 30 kDa

rLiP2 - Recombinant *Leishmania infantum* Acidic Protein P2

rpm - rotações por minuto

SLA - Soluble *Leishmania* Antigen

Th1 - Linfócitos T Helper 1

Th2 - Linfócitos T Helper 2

Th3 - Linfócitos T Helper 3

TNF- α - Tumor Necrosis Factor alpha

Treg - Linfócitos T Regulatórios

U - Unidades

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

1 – Introdução.

As leishmanioses são doenças causadas por espécies de protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903). O parasito é transmitido ao hospedeiro mamífero, no qual se enquadram o homem e o cão, no momento do repasto sanguíneo, por vetores flebotomíneos infectados.

A doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 milhões de novos casos a cada ano e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas situadas em cerca de 88 países tropicais e subtropicais, sendo a maioria subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html).

As manifestações clínicas das leishmanioses no homem podem variar desde uma lesão cutânea única até a forma visceral da doença, fatal, se não tratada. Dentre o espectro clínico das leishmanioses, a forma tegumentar é causada principalmente pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* e a forma visceral é causada pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (Grimaldi & Tesh, 1993; Herwaldt, 1999). Atualmente, *L. chagasi* é considerada geneticamente idêntica a *L. infantum* (Mauricio *et al.*, 2000).

O controle das leishmanioses está baseado principalmente no tratamento de casos humanos e controle do vetor. Além disso, em áreas onde ocorre leishmaniose visceral zoonótica, a eliminação de cães positivos é uma medida frequentemente adotada (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Entretanto, em muitas localidades, apesar dos programas de controle, o número de casos está aumentando consideravelmente. Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses seria uma ótima alternativa no combate a essa doença.

Atualmente, existem alguns antígenos isolados do parasito que vem sendo testados como candidatos à vacina contra as leishmanioses. Os mesmos podem ser divididos em três gerações:

a primeira geração, que é composta por extratos totais dos parasitos; a segunda geração, que inclui vacinas que utilizam organismos geneticamente modificados, bactérias recombinantes expressando proteínas do parasito e antígenos recombinantes e a terceira geração, composta pelas vacinas de DNA (ácido desoxirribonucléico) e sintéticas (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Proteínas ribossomais de *Leishmania* (LRPs) são estruturas protéicas imunologicamente relevantes durante a infecção, sendo consideradas “pato-antígenos”, uma vez que participam do estabelecimento da doença no hospedeiro mamífero. Através de “screening” de biblioteca de cDNA (DNA complementar) com soro de cães infectados com *L. infantum*, foram identificadas proteínas denominadas P0, P1 e P2 com similaridade às proteínas ácidas ribossomais de outros eucariotos (Soto *et al.*, 1993b), tais como *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae* (Shimmin *et al.*, 1989). Essas proteínas, utilizadas como antígenos vacinais, apresentaram resultados promissores.

Empregando um extrato total de LRPs obtidas de *L. major* como antígeno vacinal em camundongos (BALB/c e C57BL/6), foi observado que os mesmos apresentaram imunoproteção contra a infecção experimental por essa mesma espécie do parasito (Iborra *et al.*, 2008).

LRPs provenientes de *L. infantum* foram recentemente avaliadas para o diagnóstico sorológico de LV (leishmaniose visceral) canina causada pelas espécies *L. infantum* e *L. chagasi*. Os valores encontrados de sensibilidade e especificidade mostraram que as LRPs e o extrato protéico solúvel dos parasitos apresentaram sensibilidade similar para cães com LV e sintomáticos, entretanto, para a detecção de cães com LV, mas assintomáticos e oligossintomáticos, as LRPs mostraram melhor sensibilidade, além de maior especificidade quando os soros de cães com outras parasitoses foram incluídos nas análises (Coelho *et al.*, 2009).

As LRPs são, portanto, moléculas com potencial para estudos vacinais contra infecção com várias espécies causadoras de leishmaniose.

2 – Revisão da Literatura.

2.1 – Epidemiologia.

As leishmanioses são doenças endêmicas em 88 países no mundo, compreendendo principalmente países tropicais e subtropicais com baixas condições sócio-econômicas. Anualmente, cerca de 2 milhões de novos casos são registrados e estima-se que 12 milhões de pessoas atualmente sejam clinicamente afetadas pela doença. Acrescenta-se ainda o fato de que aproximadamente 350 milhões de pessoas residem em áreas endêmicas da doença (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html).

Clinicamente existem dois grandes grupos de leishmanioses: a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A grande maioria dos casos de LV é registrada nos países Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão e de LT ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Grimaldi & Tesh, 1993).

No Brasil, cerca de 28.000 casos de LT e 3.000 de LV são registrados anualmente em todas as regiões geográficas (Lindoso & Lindoso, 2009). Em estudo epidemiológico realizado em nosso país, observou-se uma correlação positiva entre a maior incidência dos casos da doença com as precárias condições sanitárias e econômicas das populações analisadas (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Cabe ainda ressaltar que a LV é a quarta doença parasitária oportunista mais frequente em indivíduos portadores do vírus causador da imunodeficiência humana (HIV) em alguns países no mundo, inclusive na Europa. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos de co-infecção entre a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a LV humana já foram notificados em 33 países. No sul da Europa, cerca de 25 a 70% dos casos de LV estão associados à infecção por HIV e nas Américas, a maioria dos casos de co-infecção ocorre no

Brasil. A infecção pelo HIV é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento da LV em cerca de 100 a 1000 vezes nas áreas endêmicas, reduzir a resposta ao tratamento quimioterápico e aumentar a possibilidade de casos de recidiva à doença (Paredes *et al.*, 2003).

2.2 – A etiologia e o ciclo biológico do parasito *Leishmania* sp.

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

Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas ao homem e existem mais de 30 espécies de flebotomíneos que apresentam a capacidade de atuar como transmissores do parasito (Desjeux, 2004).

As espécies causadoras de LV, normalmente, compreendem *L. donovani* e *L. infantum* nos países do Velho Mundo e *L. chagasi* nas Américas (Herwaldt, 1999).

A LT é normalmente causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* nos países do Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* nas Américas. A LT pode se manifestar sob diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Grimaldi & Tesh, 1993; Herwaldt, 1999).

O parasito *Leishmania* possui três formas principais em seu ciclo biológico, promastigota, paramastigota e amastigota (Figura 1). Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, formas amastigotas são transmitidas ao vetor e, no trato

gastrointestinal do mesmo, desenvolvem-se em formas alongadas e flageladas, livres ou aderidas ao epitélio, denominadas promastigotas e paramastigotas, respectivamente. Posteriormente, pelo menos parte dessas formas extracelulares, altamente replicativas e não infectivas, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, essas, sem a capacidade replicativa, mas altamente infectivas, que são as responsáveis pela infecção inicial no hospedeiro vertebrado. O vetor, agora infectado, no momento de um novo repasto sanguíneo, injeta, junto com a sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas, em sua grande maioria metacíclicas, no hospedeiro mamífero. Os parasitos podem ser fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, nas quais são formados os fagossomos, que recebem as enzimas dos lisossomos e originam os fagolisossomos. Dentro dessas organelas, há a diferenciação das formas promastigotas metacíclicas em amastigotas. Essas formas contêm flagelo rudimentar, são parasitos intracelulares obrigatórios, altamente infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro. Outro vetor, não infectado, poderá ingerir células fagocíticas parasitadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, completando-se, assim, o ciclo biológico do parasito (Grimaldi *et al.*, 1989; Sacks, 2001).

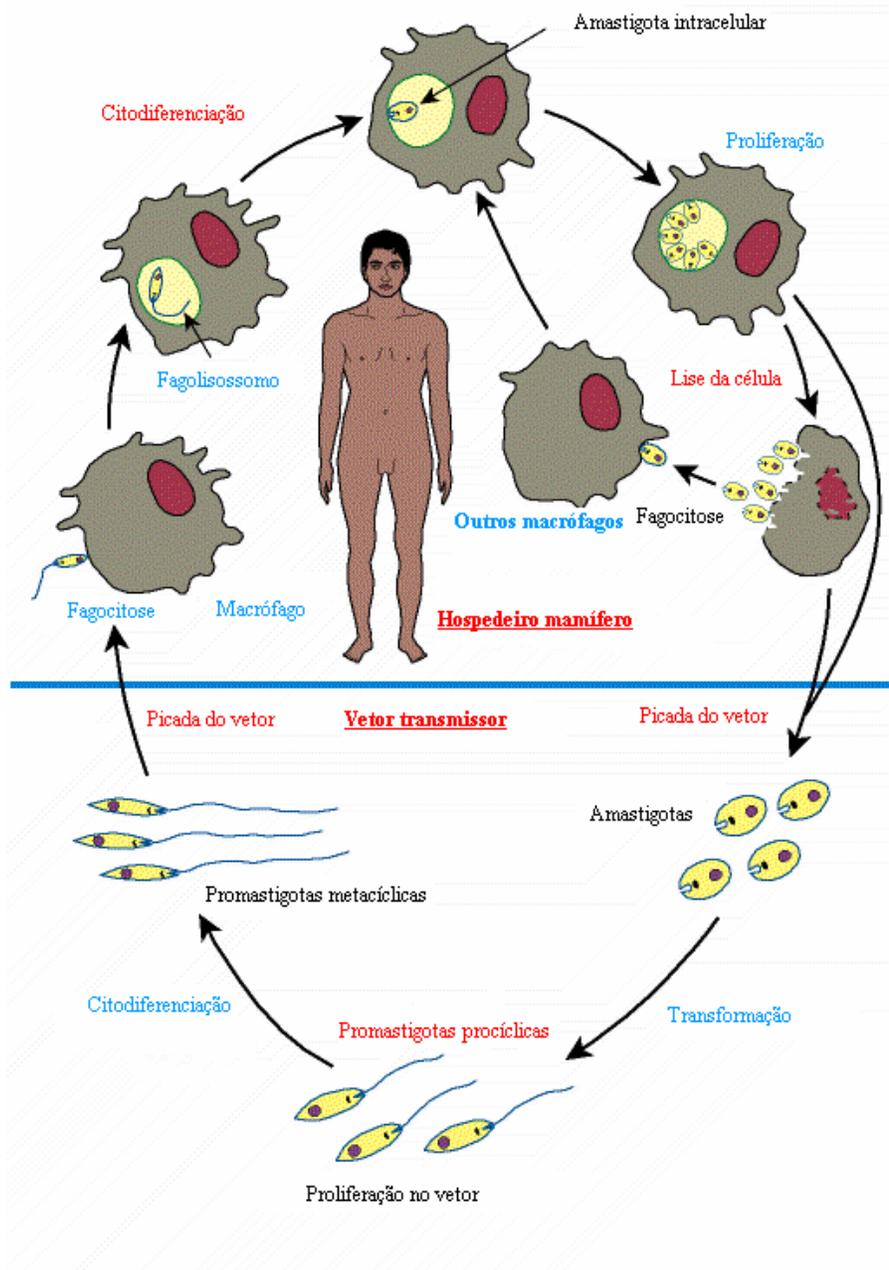


Figura 1: Ciclo biológico do parasito *Leishmania* sp. As formas promastigotas do parasito são transmitidas para o hospedeiro mamífero após a picada de um vetor flebotomíneo infectado. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitos podem ser fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear e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

2.3 – Manifestações clínicas das leishmanioses.

2.3.1 – Leishmaniose visceral.

A LV humana, também conhecida como kala-azar, pode apresentar-se como uma doença sintomática que é fatal, se não tratada. Entretanto, alguns indivíduos desenvolvem poucos sintomas, sendo considerados oligossintomáticos ou não apresentam sintomas clínicos, sendo chamados de assintomáticos. Recentemente, foi proposto que sejam reconhecidas cinco classificações: infecção subclínica resistente, infecção assintomática, infecção inicial indeterminada, infecção subclínica oligossintomática e infecção sintomática (Crescente *et al.*, 2009).

Na forma sintomática da doença, os pacientes apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente, tais como febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e peso. A disseminação dos parasitos pelo sangue e sistema retículo-endotelial pode causar aumento do baço, fígado e linfonodos. A febre, geralmente, é acompanhada por calafrios e pode ser intermitente. Em alguns casos ocorre anemia, decorrente do estado inflamatório persistente do paciente (Chappuis *et al.*, 2007). Pode ocorrer também hipoalbuminemia e hiper-gamaglobulinemia (principalmente das classes de anticorpos IgG (Imunoglobulina G), IgM (Imunoglobulina M) e IgE (Imunoglobulina E)). O nome kala-azar, que significa “febre negra”, é decorrente dos casos nos quais ocorre hiperpigmentação da pele (Awasthi *et al.*, 2004). Na medida em que a infecção avança e o paciente não recebe tratamento, pode ocorrer caquexia, doença multi-sistêmica, sangramentos decorrentes da trombocitopenia, maior suscetibilidade às infecções secundárias e evoluir ao óbito (Murray *et al.*, 2005).

Após o tratamento da LV e o desaparecimento dos sinais e sintomas clínicos, cerca de 3 a 10% dos pacientes desenvolvem a leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK), na qual ocorre o

desenvolvimento de nódulos não-ulcerosos, principalmente na região oro-faríngea do indivíduo (Awasthi *et al.*, 2004). O tratamento para esse tipo clínico da doença é longo e tem custo financeiro elevado (Desjeux, 2004).

Com relação ao modo de transmissão, a leishmaniose visceral pode ser classificada como zoonótica ou antroponótica. Na primeira, os humanos são hospedeiros ocasionais, enquanto outros mamíferos, principalmente cães, são os principais reservatórios do parasito. Já na leishmaniose antroponótica, a transmissão ocorre de humano para vetor e deste novamente para humano (Chappuis *et al.*, 2007). A leishmaniose visceral antroponótica ocorre nas áreas de transmissão de *L. donovani*, como por exemplo, na Índia, nos casos de LDPK (Herwaldt, 1999 ; Chappuis *et al.*, 2007).

2.3.2 – Leishmaniose tegumentar.

A LT é caracterizada por lesões localizadas em áreas expostas do corpo, que podem ser únicas ou múltiplas e que, geralmente, são ulcerosas. As lesões evoluem de pápulas para nódulos e, posteriormente, para lesões ulceradas com margens elevadas. Algumas lesões não se tornam ulcerosas, mas permanecem como nódulos ou placas (Herwaldt, 1999).

Após meses ou anos da cura da LT, ou mesmo concomitantemente à infecção causada por *L. braziliensis*, podem surgir lesões nas regiões da boca, nariz, faringe e laringe causando, geralmente, obstrução nasal e epistaxe, caracterizando a LMC, também conhecida como “espúndia” (Awasthi *et al.*, 2004). A LMC inicia-se com eritema e ulcerações nas narinas, progredindo para a perfuração do septo nasal, podendo também ocorrer lesões inflamatórias destrutivas, causando obstrução da faringe e laringe (Murray *et al.*, 2005).

A LCD ocorre em pessoas que apresentam deficiência na imunidade mediada por células. Neste caso, podem ocorrer lesões disseminadas que lembram aquelas da lepra lepromatosa e que não se curam espontaneamente (Desjeux, 2004).

2.4 – Diagnóstico da doença.

O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base em dados clínicos, epidemiológicos e associação com testes laboratoriais. Entretanto, um diagnóstico conclusivo da doença, atualmente, requer o encontro do parasito na amostra laboratorial coletada do hospedeiro.

2.4.1 – Testes parasitológicos.

A demonstração direta de parasitos na amostra biológica, necessária para o diagnóstico definitivo da doença, pode ser feita por meio da visualização microscópica de formas amastigotas em aspirados e/ou biópsias de tecidos ou das lesões. A coloração microscópica pode ser feita pelos métodos de Romanowsky (Giemsa ou Leishman's) ou hematoxilina-eosina. A visualização dos parasitos deve ser feita com cautela, a fim de permitir o diagnóstico diferencial com outras doenças. Algumas características das formas amastigotas precisam ser observadas, tais como o tamanho (2-4 μm), a forma (arredondada ou oval) e a presença do cinetoplasto, organela característica dos tripanossomatídeos (Singh, 2006).

O material para a preparação do esfregaço em lâminas microscópicas pode ser obtido de aspirados de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, nos casos da LV. Também pode ser realizada a biópsia dos órgãos para a elaboração de cortes histológicos. No caso da LT, é realizada a biópsia no local da lesão. Fragmentos triturados de órgãos e aspirados podem ser

utilizados para o cultivo *in vitro* dos parasitos, em meio de cultura. Além disso, tais materiais podem ser utilizados para o inóculo em animais experimentais, como o hamster (Singh, 2006).

Apesar da elevada especificidade, a sensibilidade do diagnóstico parasitológico é variável, sendo maior no baço (93-99%), seguida pela medula óssea (53-86%) e nos linfonodos (53-65%) nos casos da LV (Chappuis *et al.*, 2007). Tais métodos são, entretanto, invasivos e considerados inapropriados para triagens epidemiológicas.

2.4.2 – Testes imunológicos.

Os testes imunológicos baseiam-se na detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos ao parasito *Leishmania*. Os testes mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (IFAT), o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) e o teste de Montenegro.

IFAT é um teste comumente usado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, por meio do uso de formas promastigotas fixadas. A técnica, entretanto, apresenta especificidade comprometida pela reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos. A sensibilidade pode variar de 28.4% a 86.6%, porém, pode ser melhorada utilizando-se formas amastigotas fixadas (Singh, 2006).

DAT é um teste com elevada sensibilidade e especificidade, sendo também considerado de manejo técnico simples, o que permitiria seu emprego tanto no campo quanto em um laboratório. É um teste semi-quantitativo, no qual placas de microtitulação são utilizadas para a realização de diluições seriadas do soro do paciente incubadas com formas promastigotas coradas. Uma desvantagem do teste é o tempo gasto para sua realização (cerca de 18 horas). Além disso, é necessária a utilização de equipamentos específicos e a presença de técnicos experientes. Uma versão mais rápida do DAT, denominada de teste rápido de aglutinação

(FAST), no qual os resultados ficam prontos entre 2 e 3 horas foi desenvolvida, entretanto, ainda são necessárias mais análises para sua validação (Chappuis *et al.*, 2007).

ELISA é uma técnica laboratorial que apresenta elevada sensibilidade, entretanto, quando o antígeno utilizado é o extrato total ou solúvel dos parasitos, pode ocorrer reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, o que compromete a especificidade do exame. Antígenos purificados, recombinantes e sintéticos de *Leishmania* estão sendo avaliados na busca do aumento da especificidade do teste (Singh, 2006).

Proteínas recombinantes, como por exemplo, os antígenos relacionados à cinesina de *L. infantum* de 39 e 26 kDa, denominados rK39 e rK26 (Porrozzi *et al.*, 2007), a proteína ácida ribossomal P2 de *L. infantum*, denominada rLiP2 (Soto *et al.*, 1996), a proteína isolada de formas amastigotas de *L. donovani* (rA2) (Carvalho *et al.*, 2002) e uma cisteíno proteinase (rLdcccys1) de *L. donovani* (Pinheiro *et al.*, 2009) foram testadas com resultados promissores. Ainda foram avaliadas com sucesso proteínas extraídas diretamente dos parasitos, como as LRPs de *L. infantum* (Coelho *et al.*, 2009), além dos antígenos quiméricos, como epitopos das proteínas LiP2a-LiP2b-LiP0-H2A (proteínas ácidas ribossomais LiP2a, LiP2b e LiP0 e a histona H2A) (Soto *et al.*, 1998) e epitopos de K9-K26-K39 (antígenos relacionados à cinesina de 9, 26 e 39 kDa) (Boarino *et al.*, 2005), ambos de *L. infantum*.

O teste de Montenegro avalia a reação de hipersensibilidade mediada por células, do tipo 4 ou do tipo tardia. É usado como indicador da LC, LMC e LV. O teste consiste na inoculação do extrato protéico do parasito na face interna do braço e, nos casos de reação positiva (inflamação local), ocorre a formação de um nódulo ou pápula no local (Genaro & Reis, 2005). Entretanto, durante a LV ativa, a resposta imune celular no hospedeiro pode apresentar-se suprimida, não sendo, então, adequada a utilização deste teste (Singh, 2006).

2.4.3 – Testes moleculares.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método altamente sensível e específico para o diagnóstico das leishmanioses e é realizado pela detecção do DNA dos parasitos na amostra laboratorial. A técnica possui algumas vantagens sobre os outros exames, tais como a possibilidade de detecção de uma pequena quantidade de parasitos e o fato de que as amostras podem ser obtidas de uma forma menos invasiva em relação à coleta empregada para os testes parasitológicos (Reithinger & Dujardin, 2007). Entretanto, a tecnologia ainda é inacessível, devido ao custo elevado, além de necessitar de equipamentos especiais e técnicos experientes, não sendo possível sua aplicação em triagens epidemiológicas.

2.5 – Medidas de controle da leishmaniose visceral.

No Brasil, o programa de controle da leishmaniose visceral é baseado em três ações: o tratamento dos casos humanos; a detecção e eliminação de cães soropositivos e o controle do vetor flebotomíneo (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Tais medidas são importantes, porém, consideradas incapazes de conter o avanço das leishmanioses nos centros peri-urbanos e urbanos.

2.5.1 – Tratamento dos casos humanos.

A identificação inicial do parasito causador das leishmanioses ocorreu na Índia por Cunningham, em 1885, em indivíduos acometidos por LV. Em 1903, o agente etiológico foi descrito simultaneamente por Willian Leishman e Charles Donovan. Apesar de ser uma doença

conhecida há décadas, até os dias atuais o arsenal terapêutico para o tratamento da doença ainda é insatisfatório.

Os fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam vários problemas no seu uso, entre eles, a elevada toxicidade, os efeitos colaterais diversos, principalmente nos rins, fígado, coração e pâncreas e as vias invasivas de administração (parenteral ou endovenosa). Tais fatores fazem com que o paciente, ao sinal de alguma melhora clínica, abandone o tratamento e, conseqüentemente, ocorra o aumento da resistência dos parasitos aos fármacos (Santos *et al.*, 2008).

A primeira opção terapêutica para o tratamento das leishmanioses, desde a década de 1940, são os antimoniais pentavalentes. Em muitos países, utiliza-se o estibogliconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®), sendo esse empregado no Brasil (Santos *et al.*, 2008).

Em casos de resistência ao produto, outras drogas, como a pentamidina, anfotericina B e paramomicina, são utilizadas como segunda opção, apesar de sua toxicidade também elevada e alto custo. Uma alternativa para a redução da toxicidade é o uso de drogas associadas a moléculas de lipossomas. Atualmente, existem formulações comerciais de associação da anfotericina B com moléculas lipídicas, denominadas de Ambisome®, Abelcet® e Amphotec®. Infelizmente, a produção de tais formulações tem custo elevado, inviabilizando seu uso em países com condições econômicas dificultadas. Entretanto, novos estudos estão sendo realizados para a produção dos fármacos com outros lipídeos que apresentem um custo financeiro reduzido (Santos, *et al.*, 2008).

A miltefosina, inicialmente desenvolvida para o tratamento de câncer, é a primeira droga oral empregada para o tratamento das leishmanioses. Em alguns estudos, o fármaco apresentou eficácia satisfatória, entretanto, alguns pacientes apresentaram toxicidade gastrointestinal e

níveis sanguíneos elevados das enzimas aspartato-aminotransferase, alanina aminotransferase e creatinina (Chappuis, *et al.*, 2007).

2.5.2 – A eliminação de cães soropositivos.

A LV zoonótica tem o cão como principal reservatório doméstico de parasitos. A presença de cães infectados pelo parasito constitui um fator de risco importante para a infecção humana, devido ao elevado parasitismo encontrado no tecido cutâneo e a relação estreita dos cães com humanos (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Cães infectados podem desenvolver doença sintomática que pode resultar em morte, enquanto outros podem permanecer assintomáticos. Os animais infectados ainda podem desenvolver poucos sintomas, sendo denominados de oligossintomáticos. As manifestações clínicas mais comuns incluem: linfadenopatia, anemia, diarreia, alopecia, dermatites, onicogribose, perda de peso, caquexia, dificuldades de locomoção, conjuntivite, atrofia de músculos e acometimento renal, esse, considerado a principal causa de morte nos animais (Barbieri, 2006; Gomes *et al.*, 2008).

Cães sintomáticos e assintomáticos são capazes de transmitir parasitos para o vetor flebotomíneo, entretanto, a infecciosidade parece ser proporcional à presença e intensidade dos sinais clínicos encontrados. Em um estudo realizado em nosso país, no ano de 2008, cerca de 28% de cães soropositivos e sintomáticos foram capazes de transmitir o parasito para o vetor *Lutzomyia longipalpis*, enquanto que apenas 5.4% dos cães assintomáticos assim o foram (Baneth *et al.*, 2008).

O tratamento da leishmaniose canina apresenta pouca eficácia com os fármacos que são usados em humanos, pois os cães apresentam recidivas frequentes e, mesmo após a cura clínica, ainda podem apresentar parasitos na pele, dessa forma, sendo ainda capazes de transmitir o

parasito para o vetor. Assim, o uso veterinário de drogas que são usadas para o tratamento em humanos pode levar à seleção de parasitos resistentes, o que complicaria ainda mais o tratamento da doença no homem (Chappuis *et al.*, 2007).

A eliminação de cães soropositivos tem ainda alguns obstáculos: não existe um teste imunológico adequado para o diagnóstico preciso da doença; há a oposição dos proprietários dos cães, principalmente quando seus cães são assintomáticos e também o fato de que não existem evidências suficientes de que o sacrifício dos animais seria mesmo eficiente para a redução do número de casos da LV humana (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

2.5.3 – O controle do vetor flebotomíneo.

O controle do vetor consiste, principalmente, na aplicação de inseticidas. O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) foi o primeiro inseticida utilizado contra o flebotomíneo, entretanto, seu uso oferece riscos à saúde humana e ao meio-ambiente (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Os piretróides são utilizados atualmente, possuindo ação efetiva e baixa toxicidade em mamíferos (Amora *et al.* 2009). Coleiras em cães impregnadas com deltametrina mostram-se efetivas na redução da infecção. Inseticidas e repelentes de aplicação tópica também podem ser utilizados para tal fim (Miró *et al.*, 2008). Entretanto, o fato dos vetores residirem especialmente em áreas abertas e florestais, diminui a eficácia dessa medida de controle da doença.

2.6 – Resposta imune nas leishmanioses.

O modelo murino de infecção com *L. major* é o mais estudado, até o momento, envolvendo a resposta imune do hospedeiro à infecção por *Leishmania*. Camundongos das

linhagens C3H/He, CBA, C57BL/6, C57BL/10 e 129Sv/Ev desenvolvem uma lesão cutânea simples, que evolui após algumas semanas à cura espontânea. Estas linhagens não desenvolvem lesões após uma segunda inoculação do parasito e, assim, pertencem ao fenótipo resistente (Gumy *et al.*, 2004). O controle da lesão é mediado pela resposta imune celular do tipo Th1 (T helper tipo 1). Linfócitos T CD4⁺ do tipo 1 produzem citocinas como o IFN- γ (Interferon-gama) em resposta aos antígenos de *Leishmania* apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs)(Figura 2) (Liew, 2002).

A ativação de macrófagos por IFN- γ é o principal mecanismo efetor anti-*Leishmania* conhecido (Gumy *et al.*, 2004). Macrófagos ativados por tal citocina convertem L-arginina em N^o-hidroxil-L-arginina (LOHA) e, posteriormente, em citrulina e óxido nítrico (NO), por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (Melby, 2002). O NO é um produto tóxico para muitos microorganismos intracelulares, dentre os quais se inclui a *Leishmania*. (Gordon, 2003).

Outras linhagens de camundongos, como BALB/c e Swiss, quando infectados com *L. major*, desenvolvem lesões graves e progressivas, que podem levar à morte do animal, pertencendo, dessa forma, ao fenótipo suscetível (Gumy *et al.*, 2004). Esse perfil de evolução da doença é caracterizado pelo desenvolvimento de uma resposta celular tipo Th2 (T helper tipo 2) com participação de linfócitos T CD4⁺ do tipo 2 que produzem citocinas como IL-4 (Interleucina 4), IL-5 (Interleucina 5) e IL-6 (Interleucina 6) (Figura 2) (Liew, 2002). Outra citocina reguladora, IL-10 (Interleucina 10), é considerada uma potente inibidora da produção de IFN- γ e desativadora de macrófagos, contribuindo assim para o desenvolvimento da doença (Tripathi *et al.*, 2007).

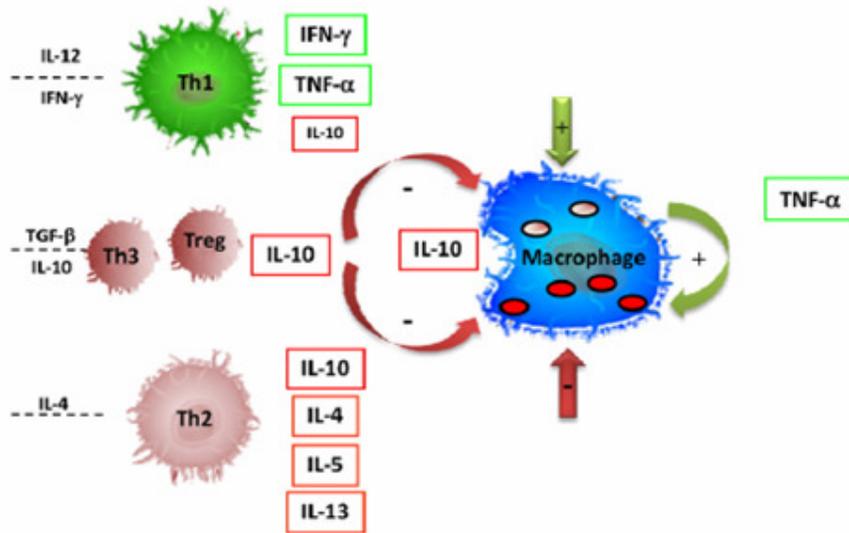


Figura 2: Esquema das respostas imunes Th1 e Th2 desenvolvidas após a infecção por *Leishmania*. Classicamente, na resposta imune Th1, ocorre a produção de IFN- γ que ativa o mecanismo microbicida dos macrófagos. Inversamente, células Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que desativam macrófagos e evitam a eliminação dos parasitos. IL-10 pode ser produzido por vários tipos celulares (Th1, Th2, Treg (células T regulatórias) e Th3 (T helper tipo 3)). TNF- α (Fator de necrose tumoral-alfa) pode ser produzido por células Th1 ou por macrófagos ativados e, no último caso, atua de forma autócrina na célula. Modificado de Gollob *et al.*, 2008.

Enquanto vários estudos sobre a resposta imune na LT estão disponíveis, o modelo de resposta imune na LV ainda não é bem definido. Entretanto, como na infecção por *L. major*, a indução de uma resposta celular do tipo Th1 é importante para o controle da infecção pelas espécies causadoras de LV. Em camundongos capazes de controlar a infecção por *L. donovani*, observou-se a formação de granuloma e a produção de IFN- γ e IL-12 (Interleucina 12). O tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* utilizando a citocina IL-12 recombinante reduziu significativamente a carga parasitária nestes animais; sendo observada a participação de células CD4⁺, CD8⁺ e Natural Killer (NK) com consequente produção de IFN- γ ,

IL-12 e TNF- α (Goto & Lindoso, 2004). A importância do IFN- γ na resolução da infecção por *L. donovani* foi demonstrada também a partir da redução de carga parasitária e pela maior produção desta citocina em camundongos de fenótipo resistente C3H e C57BL/6 infectados com essa espécie do parasito (Lehmann *et al.*, 2000).

A produção de IL-4 foi detectada em fases consistentes com o pico elevado de carga parasitária em animais suscetíveis à LV, enquanto sua produção não foi encontrada em camundongos resistentes (Saha *et al.*, 1993). Entretanto, o papel de IL-4 na resposta imune à LV é controverso. Camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-4 não apresentaram controle da infecção (Goto & Lindoso, 2004). Vilela *et al.* (2007) demonstrou que camundongos BALB/c imunizados com o extrato solúvel de *L. amazonensis* associado ao *Corynebacterium parvum*, como adjuvante, foram protegidos contra a infecção desafio com *L. chagasi*, mesmo sendo observada uma produção elevada de IFN- γ e IL-4 (Vilela *et al.*, 2007).

IL-10 também foi relacionada com a progressão da doença na LV humana e murina (Goto & Lindoso, 2004). Camundongos BALB/c e C57BL/6 que não expressavam o gene codificador da IL-10 se mostraram resistentes à infecção pelo parasito e produziram quantidades elevadas de IFN- γ e IL-12 (Awasthi *et al.*, 2004). Murphy *et al.* (2001) demonstrou que camundongos BALB/c com gene IL-10^{-/-}, infectados com *L. donovani*, foram resistentes à infecção pelo parasito e apresentaram produção elevada de IFN- γ e NO (Murphy *et al.*, 2001).

Em áreas endêmicas, pacientes com LV podem desenvolver ou não sinais e sintomas clínicos da doença. A capacidade de produzir IFN- γ e outras citocinas Th1 está associada com a infecção assintomática ou subclínica. Paralelamente, pessoas nas quais linfócitos T não produzem IFN- γ após seu estímulo com antígenos de *Leishmania*, normalmente desenvolvem LV aguda ou uma infecção que progride para a doença clínica clássica (Malla & Mahajan, 2006).

2.7 – Vacinas contra as leishmanioses.

Ao longo dos anos, preparações vacinais diversas têm sido propostas e estudos têm sido conduzidos com a finalidade de se desenvolver uma vacina que apresente resultados satisfatórios na proteção contra a infecção por *Leishmania*. As preparações incluem desde formas promastigotas mortas pelo calor ou por fenol associadas a diferentes adjuvantes e promastigotas vivos atenuados ou irradiados (Handman, 2001).

Antígenos purificados têm sido utilizados, na forma de proteínas nativas ou recombinantes (Wilson *et al.*, 1995; Paraguai-de-Souza *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007). Vetores de expressão em eucariotos (vacinas de DNA), sistemas de expressão de imunógenos em bactérias, assim como peptídeos sintéticos também têm sido avaliados (Méndez *et al.*, 2001; Gonzalo *et al.*, 2001; Ramiro *et al.*, 2003; Sukumaran *et al.*, 2003; Aguilar-Be *et al.*, 2005; Marques-Da-Silva *et al.*, 2005).

Um antígeno candidato à vacina deve, preferencialmente, ser compartilhado por diferentes espécies do parasito, ser imunogênico contra a maioria dessas espécies e não interferir na imunogenicidade induzida por outros antígenos (Grimaldi & Tesh, 1993).

A escolha de um antígeno para utilização em uma vacina recombinante é regida, principalmente, pela imunogenicidade da proteína e dos epitopos que a constituem. O desenvolvimento de vacinas recombinantes (proteína ou DNA) ou mesmo as vacinas de peptídeos sintéticos apresentam a vantagem de permitir a utilização de epitopos determinados e caracterizados, uma vez que é possível modificar tais moléculas e evitar os inconvenientes de epitopos não necessários ao desenvolvimento de proteção e imunidade contra o parasito, como mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-ímmunes e mecanismos de evasão típicos do microrganismo (Handman, 2001; Skeiky *et al.*, 2002).

Dentre os antígenos candidatos à vacina e extensivamente estudados, citam-se: glicoproteína (gp) de 63 KDa (gp63) (Xu & Liew, 1995), gp46 (McMahon-Pratt *et al.*, 1993), antígeno de superfície do parasita 2 (PSA-2) (Handman *et al.*, 1995), proteína homóloga a receptores da proteína cinase C em *Leishmania* (LACK) (Mougneau *et al.*, 1995), antígenos amastigota específicos como A2, P4 e P8 (Soong *et al.*, 1995), antígeno flagelar de *L. chagasi* 1 (LCR1) (Wilson *et al.*, 1995) ligante fucose–manose (FML) (Paraguai-de-Souza *et al.*, 1994), bem como as diferentes frações protéicas constituintes da Leishvacin® (proteínas de peso molecular variando de 42 a 160 kDa) (Cardoso *et al.*, 2003).

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

A indução de uma resposta imune após a administração de plasmídeo recombinante, contendo um promotor de expressão em eucarioto e o gene de interesse, ocorre após a transfecção de células somáticas, como miócitos ou queratinócitos, que sintetizam e secretam o antígeno para o ambiente extracelular. Células dendríticas podem captar o antígeno para ser processado e apresentado por moléculas MHC de classe II a células T CD4+ e/ou por MHC de classe I para ser apresentado a células T CD8+ iniciando, assim, a resposta imune (Donnelly *et al.*, 1997).

2.8 – Proteínas Ribossomais de *Leishmania* (LRPs).

Evidências sugerem que proteínas ribossomais de *Leishmania* são moléculas imunologicamente relevantes na infecção humana e canina por esse protozoário. Durante a infecção pela espécie *L. infantum*, níveis elevados de anticorpos específicos a proteínas altamente conservadas em *Leishmania* são encontrados, dentre as quais se destacam a proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), a histona H2A e proteínas ácidas ribossomais (Requena *et al.*, 2000).

Por meio de “screening” realizado em uma biblioteca de cDNA de *L. infantum* com soros de cães infectados por esse parasito, clones com elevada similaridade para com os genes codificadores de proteínas ácidas ribossomais, as chamadas proteínas “P”, foram identificados (Soto *et al.*, 1993b). Os clones identificados foram denominados de LiP e LiP’ e, posteriormente, reclassificados como LiP2a e LiP2b, devido à sua elevada similaridade com a proteína P2 de eucariotos (Soto *et al.*, 1995a).

Ribossomos eucarióticos possuem, aproximadamente, 70 proteínas, sendo 30 delas presentes na subunidade menor e 40 na subunidade maior. As proteínas da subunidade maior são divididas em 7 grupos (A60, B60, C60, D60, E60, F60 e G60) (Tsurugi *et al.*, 1976). Já as da subunidade menor são divididas em 5 grupos (A40, B40, C40, D40 e E40) (Collatz *et al.*, 1977).

Proteínas ácidas ribossomais encontram-se no grupo A60 (Tsurugi *et al.*, 1978) e localizam-se em uma protuberância lateral dos ribossomos. São caracterizadas por um ponto isoelétrico pequeno e, por isso, são chamadas de proteínas ácidas, sendo fosforiladas por proteínas cinases e, assim, denominadas proteínas “P”. As proteínas “P” formam um complexo pentamérico composto por duas unidades P1, duas P2 e uma P0 (Tchórzewski, 2002).

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

Por meio do mapeamento de epitopos da proteína P2, foi demonstrado que seu reconhecimento por anticorpos presentes no soro de cães com LV não ocorre na região C-terminal conservada e, assim, não demonstra reatividade cruzada com proteínas P2 de *Trypanosoma cruzi*, P2 no lúpus e a P2 humana, que reconhecem a região C-terminal (Soto *et al.*, 1995a). Dessa forma, demonstraram potencial para diagnóstico da LV. Avaliando-se a imunogenicidade da P2, foi verificado que a imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante de P2, denominada LiP2a, induziu uma resposta celular e humoral elevada (Soto *et al.*, 2000).

A proteína P0 de *L. infantum* foi clonada e caracterizada, apresentando uma região C-terminal com pouca similaridade em relação às proteínas de outros eucariotos (Soto *et al.*, 1993a). O mapeamento de epitopos mostrou que o determinante antigênico dessa proteína é uma região próxima à porção C-terminal (Soto, *et al.*, 1995b). A administração da proteína LiP0 como vacina de DNA foi capaz de induzir proteção parcial em camundongos BALB/c contra o desafio com *L. major*. Houve uma redução no tamanho da lesão e na carga parasitária na pata e nos linfonodos dos animais. A proteção foi relacionada à produção de IFN- γ , principalmente, por linfócitos T CD4⁺ (Iborra *et al.*, 2003). A mesma proteína, agora sob a forma recombinante, quando administrada junto aos oligodeoxinucleotídeos ODN-CpGs, como adjuvante, induziu proteção em camundongos C57BL/6 contra o desafio com *L. major*, proteção essa correlacionada com a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e IL-12-dependente (Iborra *et al.*, 2005).

A co-administração de um complexo de proteínas ribossomais (LRPs) de *L. major* associadas ao adjuvante ODN-CpGs, induziu proteção em dois modelos experimentais de LT, utilizando uma quantidade elevada de parasitos inoculados na pata de camundongos BALB/c pela via subcutânea e uma baixa quantidade de parasitos inoculados na orelha de camundongos

C57BL/6 pela via intradérmica. Em ambos os casos, houve proteção nos animais imunizados e desafiados com *L. major* (Iborra, *et al.*, 2008).

LRPs provenientes de *L. infantum* foram recentemente avaliadas para o diagnóstico sorológico de LV canina causada pelas espécies *L. infantum* e *L. chagasi*. Os valores encontrados de sensibilidade e especificidade mostraram que as LRP e o extrato protéico solúvel dos parasitas apresentaram sensibilidade similar para cães com LV e sintomáticos, entretanto, para a detecção de cães com LV, mas assintomáticos e oligossintomáticos, as LRP mostraram melhor sensibilidade, além de maior especificidade quando os soros de cães com outras parasitoses foram incluídos nas análises (Coelho *et al.*, 2009).

2.9 – Perspectivas.

As vacinas contra leishmaniose podem ser divididas em três gerações: a primeira geração, composta pelos extratos dos parasitos; as de segunda geração, compostas por frações protéicas e organismos geneticamente modificados, como bactérias expressando proteínas recombinantes e as de terceira geração, compostas pelas vacinas de DNA e peptídeos sintéticos (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Proteínas ribossomais de *Leishmania* correspondem a um grupo de proteínas encontradas nos ribossomos de *Leishmania* e que apresentam similaridade elevada nas diferentes espécies do parasito. Verificou-se que as LRP são imunologicamente importantes para o desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero, sendo consideradas “pato-antígenos”, pois induzem uma resposta celular e humoral que relaciona-se com o fenótipo da doença no hospedeiro (Requena *et al.*, 2000).

Estudos utilizando as LRPs de *L. major* como antígeno vacinal em camundongos demonstraram que as mesmas foram capazes de induzir proteção contra a infecção experimental com essa mesma espécie (Iborra *et al.*, 2008).

Devido à similaridade das LRPs, deve-se considerar a possibilidade de seu uso em protocolos vacinais para verificação da eficácia protetora induzida contra diferentes espécies do gênero *Leishmania*.

3 – Objetivos.

3.1 – Objetivo Geral.

Avaliar os níveis de proteção induzida em camundongos BALB/c imunizados com proteínas ribossomais purificadas de *L. infantum* (LRPs) contra a infecção por *L. chagasi*.

3.2 – Objetivos específicos.

- 1- Imunizar grupos de camundongos BALB/c com LRPs de *L. infantum* associadas à saponina, como adjuvante, ou apenas com saponina. A inoculação de PBS será utilizada como controle da infecção.
- 2- Realizar a infecção desafio dos camundongos com 1×10^5 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi* pela via subcutânea.
- 3- Avaliar a resposta imune celular antes e após a infecção por *L. chagasi* por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos), IL-4 e IL-10. Realizar a dosagem de NO nos sobrenadantes das culturas celulares pelo método de Griess.
- 4- Avaliar a resposta humoral antes e após a infecção por *L. chagasi* por meio de ELISA para detecção de IgG total, IgG1 (Imunoglobulina G tipo 1) e IgG2a (Imunoglobulina G tipo 2a)

- 5- Avaliar a eficácia protetora das LRPs por meio da quantificação da carga parasitária no baço e fígado dos animais imunizados com as LRPs associadas à Saponina e desafiados com *L. chagasi*.

4 – Materiais e Metodologia.

4.1 – Animais de experimentação.

Camundongos BALB/c, fêmeas, com cerca de 6 semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, sob as devidas condições de manejo. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (ver anexo A).

4.2 – Parasitas.

As amostras MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* e MCAN/ES/1996/BCN/150/MON-1 de *L. infantum* foram utilizadas neste trabalho. Os parasitos foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitos permaneceram em cultivo a 24°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados quando os parasitos encontravam-se na fase logarítmica de crescimento.

4.3 – Preparação do extrato protéico solúvel de *Leishmania* (SLA).

O extrato protéico solúvel de *L. chagasi* foi preparado a partir de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento do parasito, cultivadas em meio de Schneider's completo. Para tal, uma cultura com 10⁸ parasitos/mL foi centrifugada por 15 min. e a 5000 rpm, a 4°C. O

pellet foi ressuspensionado em 5 mL de PBS (Salina tamponada em fosfato)1x e centrifugado a 5000 rpm por 10 min. a 4°C. O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de PBS 1x e submetido a um processo de choque térmico, no qual foram realizados 6 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 42°C. Em seguida, o lisado foi sonificado em 6 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos e amplitude de 38 MHz. O produto foi, então, centrifugado a 10000 rpm durante 30 min. e o sobrenadante, que corresponde ao SLA, foi retirado, a concentração das proteínas foi dosada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o material foi armazenado a -70°C.

4.4 – Obtenção das LRPs de *L. infantum*.

As LRPs de *L. infantum* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Manuel Soto, do Departamento de Biologia Molecular, Universidade Autónoma de Madrid, Madrid, Espanha.

Resumidamente, as LRPs de *L. infantum* foram obtidas da seguinte forma (Iborra *et al.*, 2008). Os parasitos foram cultivados em meio de Schneider's completo na temperatura de 24°C e utilizados em sua fase logarítmica de crescimento. As formas promastigotas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. e a 4°C. O pellet foi ressuspensionado em 5 mL de PBS 1x gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O processo de lavagem foi realizado por 2 vezes. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspensionado em solução de lise, a qual foi constituída por tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 7.4, KCl 40 mM, MgCl₂ 25 mM, detergente NP40 10%, PMSF 0.1 M, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 0.5 mg/mL e β-mercaptoetanol 0,034%.

Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 3000 rpm por 2 min. e a 4°C para sedimentar o núcleo. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 13000 rpm por 15 min. a 4°C.

Novamente, o sobrenadante foi coletado e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi, então, centrifugado a 90000 rpm por 1 hora e a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 200 µL de tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 100 mM, AcNH₄ 0.5 M, PMSF 0.1 M, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 0.5 mg/mL e β-mercaptoetanol 0,034%, utilizando uma seringa de vidro. O produto foi centrifugado a 90000 rpm por 2 horas a 4°C em gradiente de sacarose 20-40%, preparado no mesmo tampão citado anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet, no qual as LRPs estavam presentes, foi ressuspenso em 500 µL de PBS 1x, a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o material foi armazenado a -70°C.

4.5 – Esquema das imunizações.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea no coxim plantar esquerdo, com 3 doses e intervalos de 15 dias entre as mesmas. Os camundongos foram divididos em 3 grupos de 10 camundongos cada, a saber: um grupo foi imunizado com 12 µg de LRP de *L. infantum* associados a 25 µg do adjuvante saponina obtido da espécie *Quillaja saponaria*, em um volume final de 20 µL; outro grupo foi imunizado com 25 µg de saponina em um volume final de 20 µL e o último grupo foi inoculado com 20 µL de PBS 1x.

4.6 – Infecção desafio.

Trinta dias após a última imunização, a metade dos camundongos de cada grupo foi sacrificada para a avaliação da resposta imune celular e humoral. Os outros animais remanescentes foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi* por via subcutânea e no coxim plantar direito dos animais.

4.7 – Cultivo celular.

Após 4 semanas da última dose de imunógenos, metade dos camundongos de cada grupo foi sacrificada para o cultivo de células esplênicas. A outra metade dos camundongos foi infectada com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi* por via subcutânea e no coxim plantar direito. Cerca de 8 semanas após a infecção desafio, os camundongos foram sacrificados para a avaliação da eficácia da vacina através de dosagem de citocinas liberadas pelas células do baço e da carga parasitária do baço e fígado. Baço, fígado e amostras de sangue dos camundongos foram retirados de forma asséptica.

O baço de cada um dos animais sacrificados, antes e após o desafio, foi diluído e macerado em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), composto por 4,5 g/L de glicose, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, pH 7.4. O material foi centrifugado a 1200 rpm por 10 min. e o sobrenadante foi descartado. As hemácias foram lisadas com 3 mL de tampão de lise, constituído de Tris-HCl 17 mM pH 7.3 e cloreto de amônio 144 mM, que agiu durante 4 min. a temperatura ambiente. Foi então acrescentado meio DMEM, para um volume final de 10 mL para cessar a lise celular. O material foi centrifugado a 1200 rpm por 10 min. e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então ressuspenso em 1 mL de DMEM completo (o qual era acrescido de 20% de soro fetal bovino inativado).

Para o cultivo dos esplenócitos, foram utilizadas placas de 24 wells (Nunclon, Nunc, Denmark), nas quais 2×10^6 células/mL foram incubadas em meio DMEM completo. Os esplenócitos foram estimulados com as LRPs (12 µg), SLA (50 µg) ou com a concanavalina A (ConA, 5 µg), utilizada como controle positivo. Para controle negativo, as células foram incubadas sem estímulo. A incubação foi feita a 37°C, com 5% de CO₂ por 48 horas e, após esse período, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas.

Para avaliar a participação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e a dependência de IL-12 na produção de IFN- γ , os esplenócitos estimulados com as LRPs ou com o SLA foram também incubados na presença de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12 (BD (Becton, Dickinson and Company) na concentração 5 μ g/mL (5 μ g/well) nos experimentos realizados após a infecção desafio.

4.8 – Dosagem de citocinas.

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

4.9 – Dosagem de Óxido Nítrico.

A liberação de NO foi determinada pelo método de Griess. Em uma placa de 96 wells (Falcon), 100 μ L do reagente de Griess foram misturados com 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de esplenócitos. Após incubação durante 10 min. a temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540 nanômetros (nm) e comparada a uma curva-padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

4.10 – ELISA para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2a.

As amostras de soro coletadas dos animais imunizados e/ou desafiados foram utilizadas para avaliação da resposta humoral. Para tal, placas de 96 wells (Falcon) foram sensibilizadas com 2 μ g/well das LRPs em tampão carbonato de sódio pH 9.6, overnight e a 4°C. Após 3

lavagens com PBS 1x/Tween 20 0.05%, as placas foram bloqueadas com 2% de caseína por 1 hora e a 37°C. Soros dos camundongos diluídos 1:100 em tampão contendo caseína 0,25% e Tween 20 0,05% foram adicionados e a incubação ocorreu por 2 horas a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo, todos marcados com a enzima peroxidase, diluídos a 1:5000 em tampão contendo caseína 0,25% e Tween 20 0,05%, por 1 hora e a 37°C. As placas foram novamente lavadas por 5 vezes e incubadas com *orto*-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato pH 5.0 e H₂O₂ 30 volumes, por 30 minutos e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a leitura feita em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 492 nm.

4.11 – Carga parasitária.

A avaliação da carga parasitária foi realizada pelo método da diluição limitante no baço e fígado dos animais desafiados. A técnica consiste em determinar a maior diluição na qual parasitos vivos podem ser visualizados (Coelho *et al*, 2003). Para tal, um fragmento do baço e fígado dos animais foi retirado e pesado. Os tecidos foram, então, macerados em meio de Schneider's completo e os tecidos macerados foram serialmente diluídos em placas de 96 wells. A incubação foi feita por 7 dias, a 24°C e a maior diluição na qual parasitos vivos podiam ser visualizados foi determinada pela visualização em um microscópio invertido.

4.12 – Análise estatística.

Os dados foram comparados através do teste *t* de Student não pareado e os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 – Resultados.

5.1 – Produção de Citocinas Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LRPs Associadas à Saponina.

Camundongos BALB/c foram imunizados com LRPs, obtidas da espécie *L. infantum*, associadas ao adjuvante saponina. Os animais experimentais, pertencentes aos grupos PBS, Saponina e LRP/Saponina, receberam 3 doses de imunizações em intervalos de 15 dias entre elas. Cerca de 30 dias após a última dose, a resposta imune celular e humoral gerada, específicas às LRPs ou ao extrato protéico solúvel de *L. chagasi* (SLA), foram avaliadas, antes da infecção desafio.

A resposta imune celular induzida pelas imunizações foi avaliada pela quantificação das citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, esses, estimulados com as LRPs ou com o SLA.

Na análise da figura 3, pode-se observar que os animais imunizados com LRP/Saponina produziram níveis significativamente elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, em comparação aos grupos controle (PBS e Saponina). Entretanto, quando avaliamos a produção de tais citocinas apenas no grupo LRP/Saponina com os diferentes estímulos, observa-se que as LRPs foram capazes de estimular uma maior produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF em relação ao estímulo com o SLA.

Nos grupos controle, os níveis encontrados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF foram reduzidos e não houve diferença significativa na produção dessas citocinas, na presença ou ausência dos estímulos.

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

Na análise destes resultados, portanto, pode-se concluir que a imunização de camundongos BALB/c com as LRPs associadas à saponina foi capaz de gerar uma resposta imune Th1, por meio da produção de citocinas como IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, verificada após o estímulo com as LRPs ou o SLA.

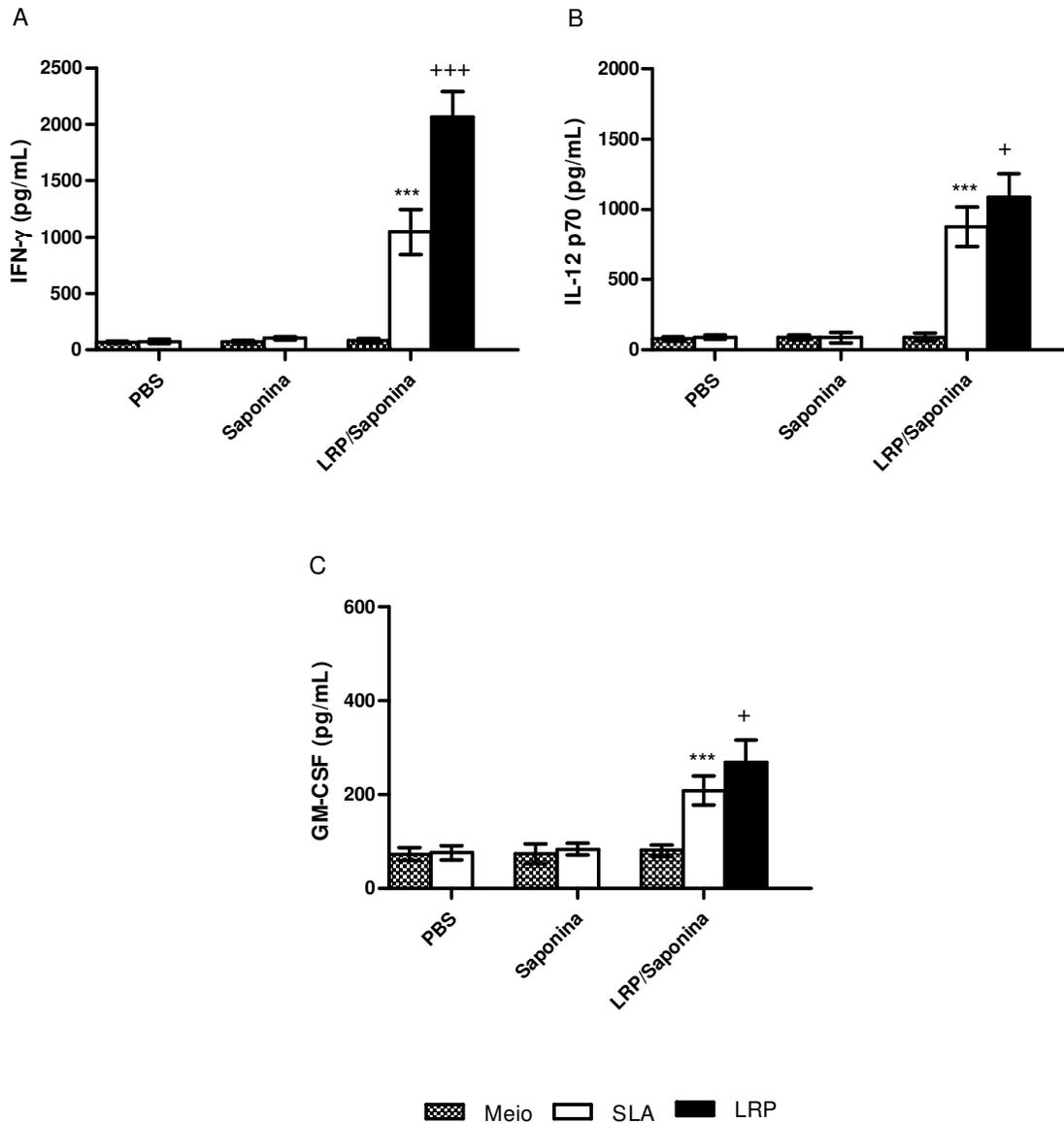


Figura 3: Análise da produção de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os esplenócitos dos camundongos foram estimulados com 50 μ g de SLA, 12 μ g de LRPs ou não foram estimulados (meio) e, posteriormente, incubados por 48 horas a 37°C e com 5% de CO₂. A resposta imune celular foi avaliada pela quantificação de IFN- γ (A), IL-12p70 (B) e GM-CSF (C) nos sobrenadantes das culturas. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** indica $P < 0,0001$ no grupo LRP/Saponina em comparação aos grupos controle (PBS e saponina). +++ indica $P < 0,0001$ e + indica $P < 0,05$ após o estímulo de LRPs, quando comparado ao estímulo com SLA, no grupo LRP/Saponina. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

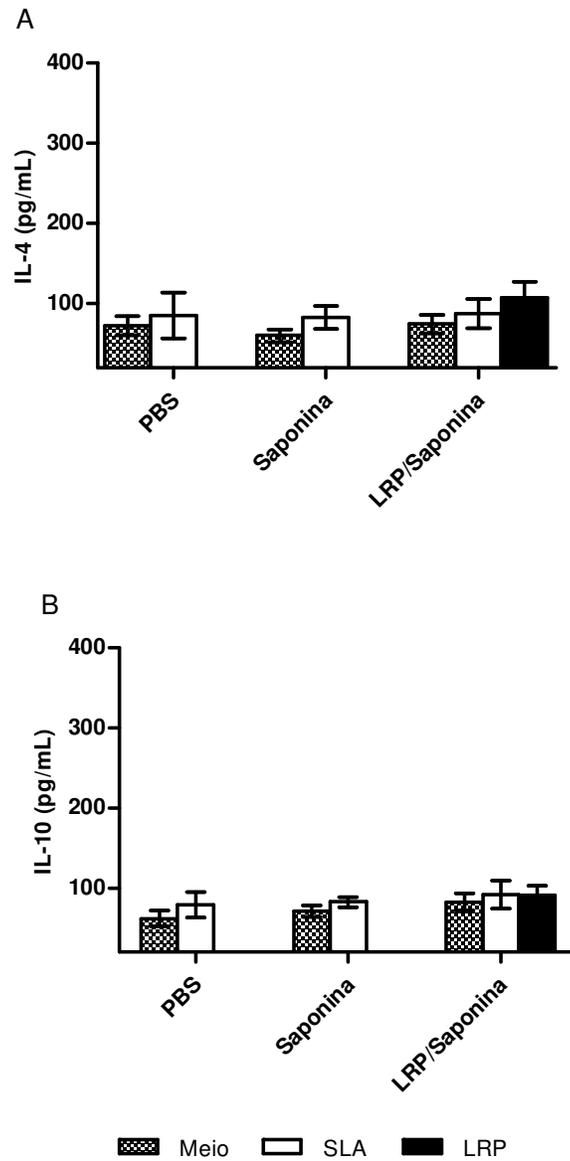


Figura 4: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os esplenócitos dos camundongos foram estimulados com 50 µg de SLA, 12 µg de LRPs ou não foram estimulados (meio) e, posteriormente, incubados por 48 horas a 37°C e com 5% de CO₂. A resposta imune celular foi avaliada pela quantificação de IL-4 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante das culturas. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

5.2 – Produção de Anticorpos Induzida pela Imunização de Camundongos BALB/c com LRPs Associadas à Saponina.

Um indicativo da geração de uma resposta imune Th1 ou Th2, em camundongos BALB/c, diz respeito à produção dos isotipos IgG1 e IgG2a. Citocinas secretadas por células do sistema imune tais como linfócitos T, atuam sobre linfócitos B induzindo à mudança de isotipos dos anticorpos IgGs produzidos por tais células. Nesta linhagem de camundongo, a citocina IL-4 induz, preferencialmente, a produção de IgG1, enquanto que o IFN- γ induz a produção de IgG2a (Coffman, 1993).

Sendo assim, a produção de anticorpos pelos camundongos imunizados com as LRPs associadas à saponina e dos grupos controle foi avaliada para a verificação do perfil de isotipos de IgGs gerados frente às LRPs.

Pode-se observar, na análise da figura 5, que no grupo imunizado com LRP associadas à saponina a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LRPs foi maior em relação aos grupos controle. Pode-se verificar também que a produção de IgG2a anti-LRP foi significativamente maior em relação aos níveis de IgG1 anti-LRPs, no grupo LRP/Saponina.

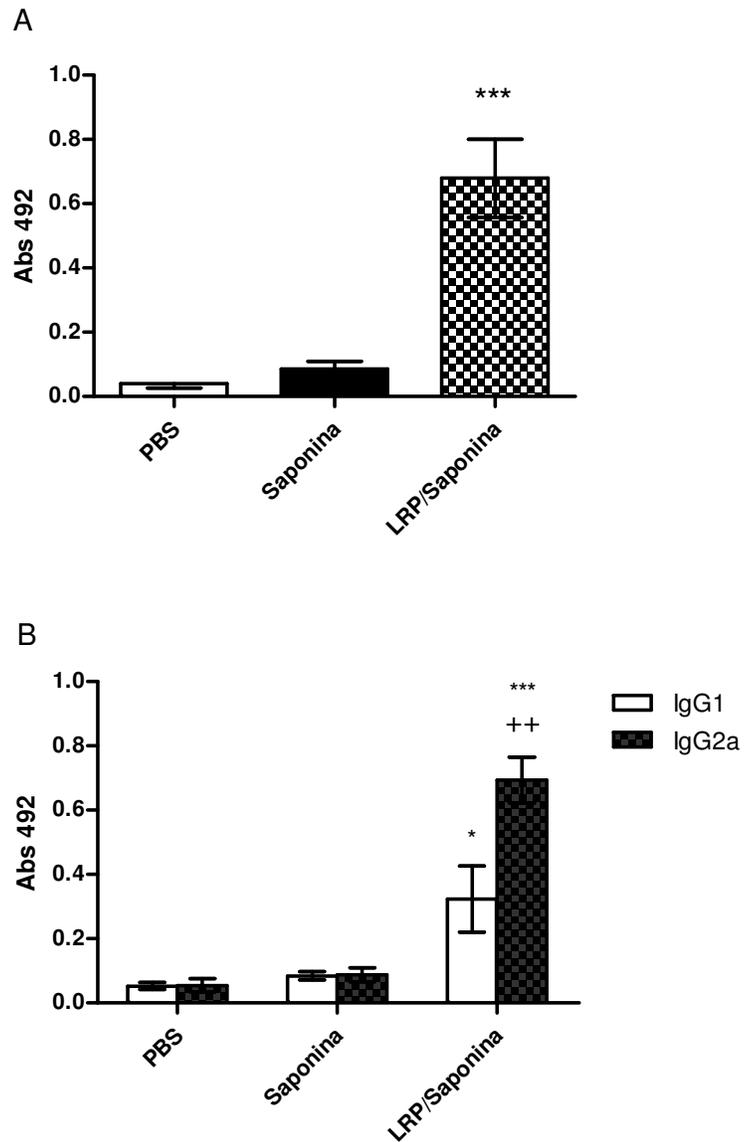


Figura 5: Análise da produção de IgG total, IgG1 e IgG2a pelos camundongos imunizados com LRPs associadas à saponina. Cerca de 30 dias após a última imunização, os soros dos camundongos foram coletados e analisados para a produção de anticorpos IgG total (A), IgG1 e IgG2a (B) anti-LRPs. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. *** indica $P < 0,0001$ e * indica $P < 0,05$ no grupo LRP/Saponina, em comparação aos grupos controle. ** indica $P < 0,001$ quando comparados a produção de IgG1 e IgG2a no grupo LRP/Saponina. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

5.3 – Avaliação da Carga Parasitária nos Camundongos após as Imunizações e a Infecção Desafio com *L. chagasi*.

Para avaliar a eficácia de proteção decorrente da imunização com LRPs associadas à saponina, os camundongos foram infectados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*, que foram inoculadas no coxim plantar direito dos animais e pela via subcutânea.

Na avaliação da carga parasitária, cerca de oito semanas após a infecção, o baço e fígado dos animais foram coletados e avaliados para detecção dos parasitos, por meio da técnica de diluição limitante. É considerado um método sensível, que permite a detecção de uma carga de parasitos cerca de 50 a 100 vezes menor em relação à carga mínima detectada pela técnica de coloração de cortes histológicos ou de aspirados de tecidos (Buffet *et al.*, 1995).

Na análise dos resultados, pode-se observar que a carga de parasitos observada no baço e fígado dos animais imunizados com LRP/Saponina foi significativamente menor em relação aos grupos controle, indicando que tais animais apresentavam-se protegidos contra a infecção. Houve uma redução de, aproximadamente, 85% na carga parasitária dos animais imunizados com LRP/saponina em relação ao grupo PBS (Figura 6). Portanto, a imunização de camundongos BALB/c com as LRPs associadas à saponina foi capaz de conferir proteção significativa contra a infecção desafio com *L. chagasi*.

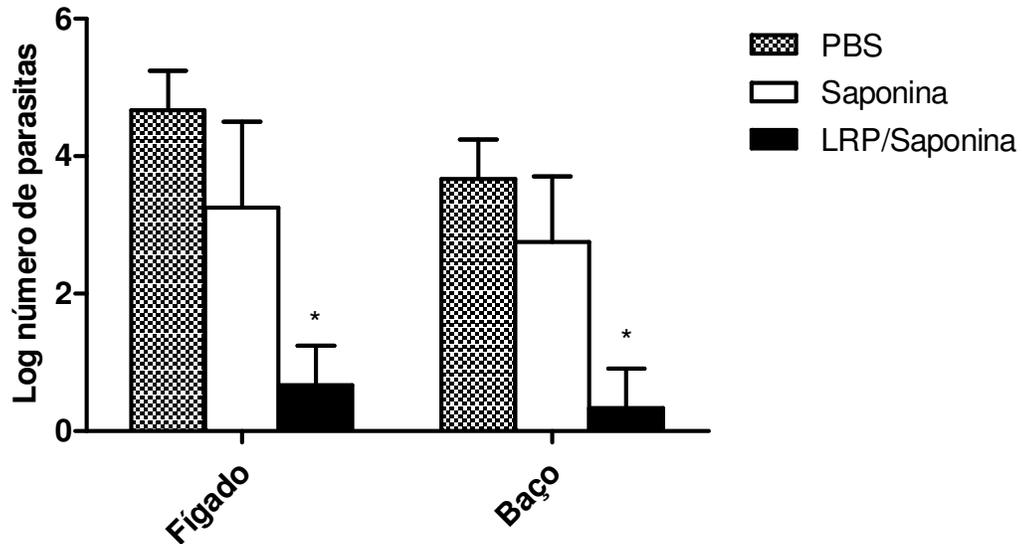


Figura 6: Carga parasitária no fígado e baço dos camundongos imunizados e após a infecção desafio com *L. chagasi*. Cerca de 30 dias após a última imunização, os camundongos foram infectados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi* por via subcutânea. Cerca de oito semanas após o desafio, a carga parasitária foi avaliada pelo método da diluição limitante no fígado e baço dos animais dos grupos PBS, Saponina e LRP/Saponina. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos. * indica $P < 0,05$ no grupo LRP/Saponina, quando comparado aos grupos controle. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

5.4 – Produção de Citocinas pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção Desafio com *L. chagasi*.

Pela avaliação da carga parasitária, verificou-se que a imunização de camundongos BALB/c com as LRPs purificadas de *L. infantum* associadas à saponina foi capaz de induzir proteção contra a infecção desafio com *L. chagasi*. Portanto, para determinar os parâmetros imunológicos associados a essa proteção, a resposta imune celular foi avaliada cerca de oito semanas após o desafio. As citocinas IFN- γ , IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram novamente dosadas nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos, após seu estímulo com as LRPs ou com o SLA.

Os animais do grupo LRP/Saponina, que apresentaram carga parasitária no baço e fígado significativamente menor que os controles, produziram níveis elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, quando comparados com os grupos PBS e Saponina. Os níveis de tais citocinas foram elevados tanto após o estímulo com as LRPs quanto com o SLA (Figura 7). Dessa forma, os resultados indicam que a proteção dos animais correlacionou-se com a indução de uma resposta imune Th1.

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

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

Podemos observar, na figura 8, que a produção de IFN- γ foi significativamente reduzida na presença dos anticorpos monoclonais, indicando que a produção de tal citocina ocorreu por ambos os tipos celulares e, em ambos os casos, houve a dependência da IL-12.

Entretanto, quando analisamos estatisticamente a produção de IFN- γ na presença do anticorpo monoclonal anti-CD4 em relação ao monoclonal anti-CD8, verificamos que neste último a produção foi maior do que na presença de anti-CD4 (Figura 8). Assim, aparentemente, a maior produção de IFN- γ parece estar ocorrendo via células T CD4⁺ nos animais imunizados e desafiados.

A produção de IL-4 e IL-10 no grupo LRP/Saponina foi reduzida em relação aos grupos controle, após o estímulo com o SLA (Figura 9). Assim, a proteção observada nesse grupo pode também ser relacionada a uma baixa produção de citocinas relacionadas à resposta imune Th2. Por outro lado, os animais dos grupos PBS e Saponina, que apresentaram elevada carga parasitária e baixos níveis de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, produziram níveis significativamente elevados de IL-4 e IL-10 após o estímulo com o SLA, indicando que a resposta imune Th2 exacerbada estava relacionada à suscetibilidade à infecção nestes animais.

Dessa forma, pode-se concluir que a proteção efetuada pela imunização com LRP/Saponina nos camundongos BALB/c contra a infecção desafio com *L. chagasi* foi relacionada à indução de uma resposta imune Th1, com a participação de citocinas como IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF e que a produção de IFN- γ se deu por ambos os tipos celulares CD4⁺ e CD8⁺ e foi dependente de IL-12.

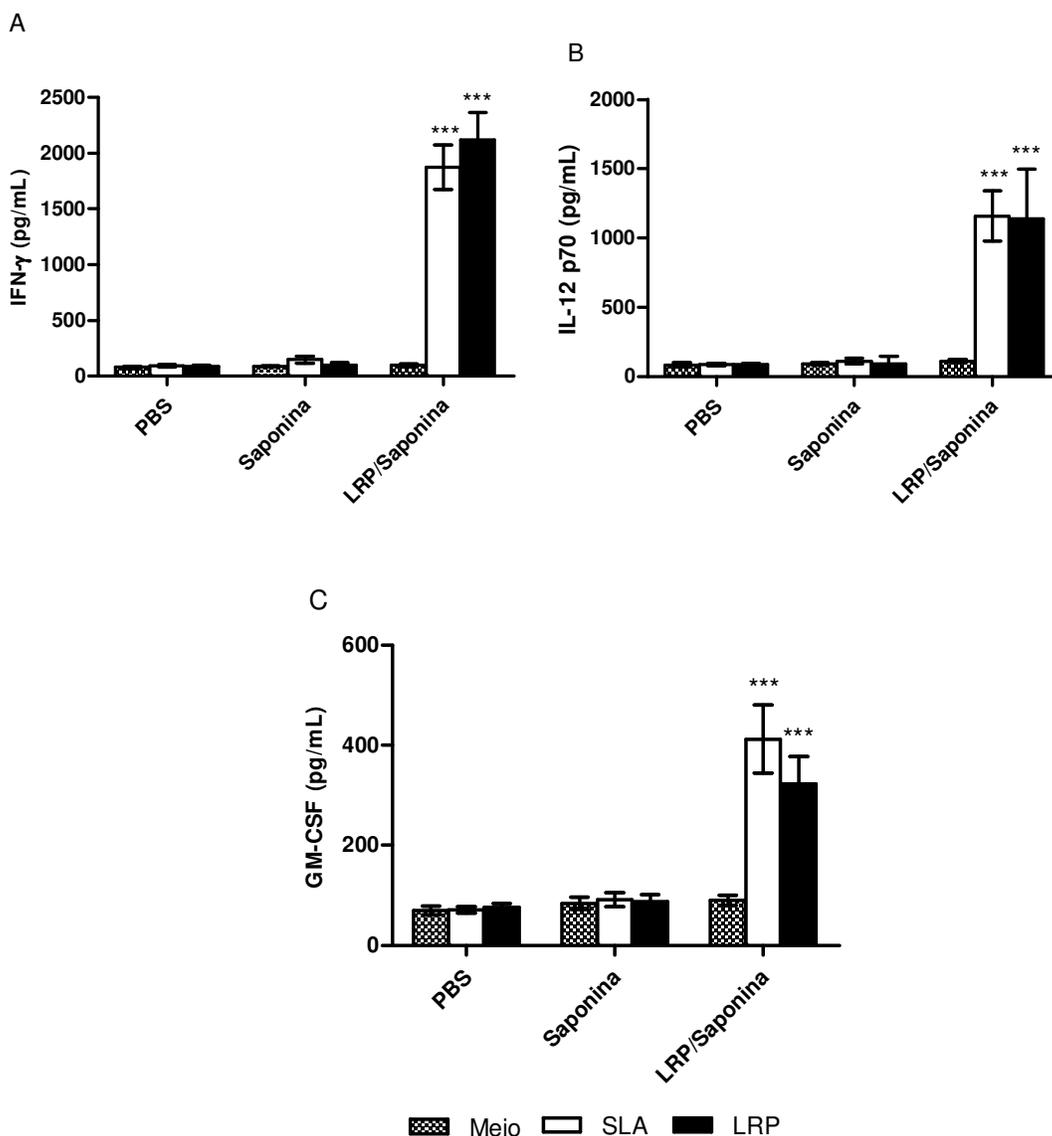


Figura 7: Análise da produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose dos imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* e a resposta celular foi avaliada cerca de oito semanas após o desafio. A produção de IFN- γ (A), IL-12p70 (B) e GM-CSF (C) nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos foi avaliada após os estímulos com 50 μ g de SLA, 12 μ g de LRPs *L. infantum* ou sem estímulo (meio). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** indica $P < 0,0001$ no grupo LRP/Saponina em comparação aos grupos controle de acordo com o estímulo. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

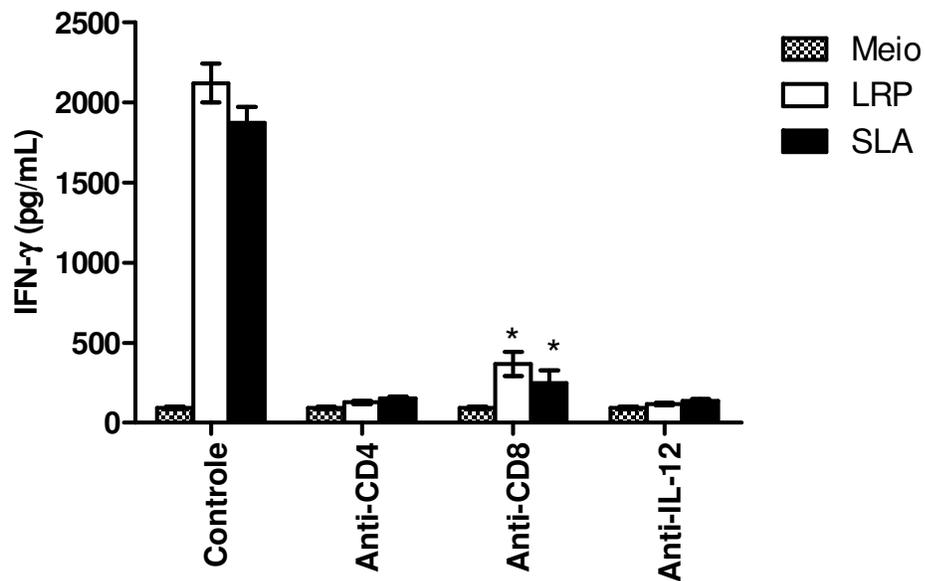


Figura 8: Avaliação da produção de IFN- γ por camundongos imunizados e desafiados com *L. chagasi* na presença de anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* e, cerca de oito semanas após, a produção de IFN- γ foi avaliada após os estímulos com 50 μ g de SLA, 12 μ g de LRPs *L. infantum* ou sem estímulo (meio) na presença de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. * indica $P < 0,05$ quando comparados aos grupos anti-CD4 e anti-IL-12. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

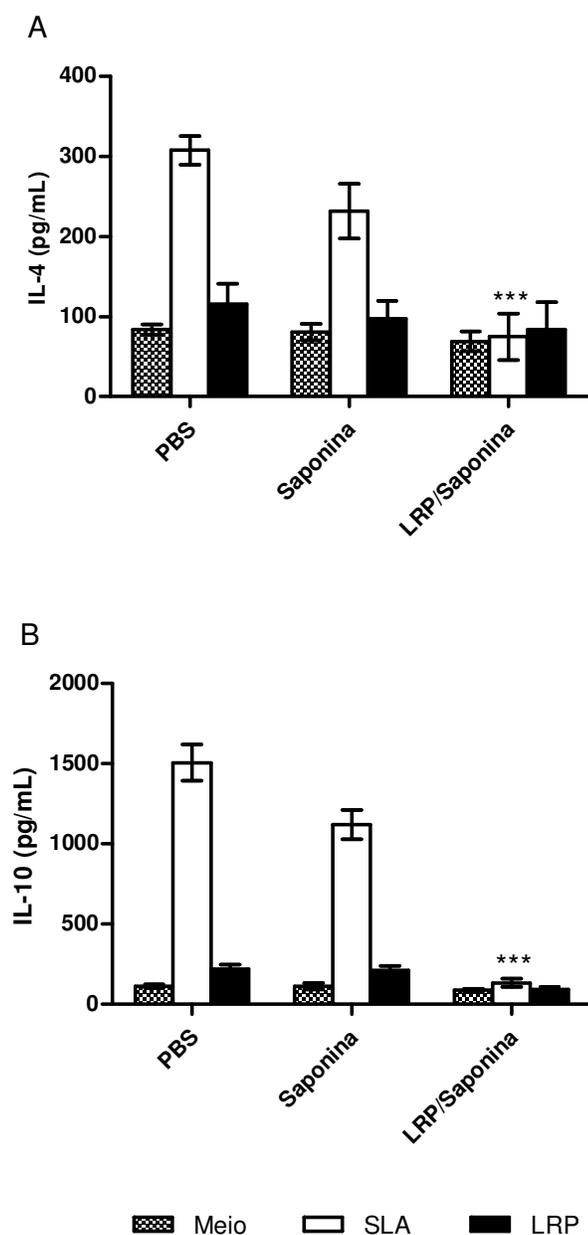


Figura 9: Análise da produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* e a resposta celular foi avaliada cerca de oito semanas após o desafio. A produção de IL-4 (A) e IL-10 (B) nos sobrenadantes de esplenócitos foi avaliada após os estímulos de 50 μ g de SLA, 12 μ g de LRPs *L. infantum* ou sem estímulo (meio). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** indica $P < 0,0001$ no grupo LRP/Saponina em comparação aos grupos controle de acordo com o estímulo. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

5.5 – Produção de Anticorpos pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção

Desafio com *L. chagasi*.

Na avaliação da produção de anticorpos após a infecção desafio, pode-se observar que os animais imunizados com LRPs associadas à saponina apresentaram uma maior produção de anticorpos IgG total anti-LRPs, quando comparados aos níveis obtidos nos grupos controle (Figura 10A). Quando avaliamos os isotipos de IgG neste grupo (LRP/Saponina), verificamos que a produção de anticorpos IgG2a anti-LRPs foi significativamente maior do que os níveis obtidos de anticorpos IgG1 anti-LRPs (Figura 10B). Tal fato pode indicar que, em tal grupo, houve a predominância de resposta imune tipo Th1. Nos grupos controle, podemos observar uma produção similar de IgG1 e IgG2a anti-LRPs.

Quando comparamos a produção de IgG total antes e após o desafio dos animais, verificamos que ocorre um aumento na produção de anticorpos IgG anti-LRPs nos 3 grupos estudados. O mesmo aumento foi observado com os isotipos IgG1 e IgG2a anti-LRPs.

Concluimos assim que a resposta humoral desenvolvida nos animais imunizados, nos quais houve maior predominância do isotipo IgG2a anti-LRPs, é mais um indicativo da indução de uma resposta tipo Th1, que pode estar relacionada à proteção contra a infecção.

Os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-SLA nos animais imunizados e/ou desafiados foram também avaliados, sendo que nos animais que foram imunizados com LRP/Saponina houve maior produção de IgG2a anti-SLA em relação aos níveis detectados de IgG1. Já nos grupos PBS e saponina a proporção observada entre os isotipos foi inversa. Entretanto, pelos baixos valores de leituras de absorvâncias encontradas, de maneira geral, esses dados foram omitidos da redação final deste trabalho.

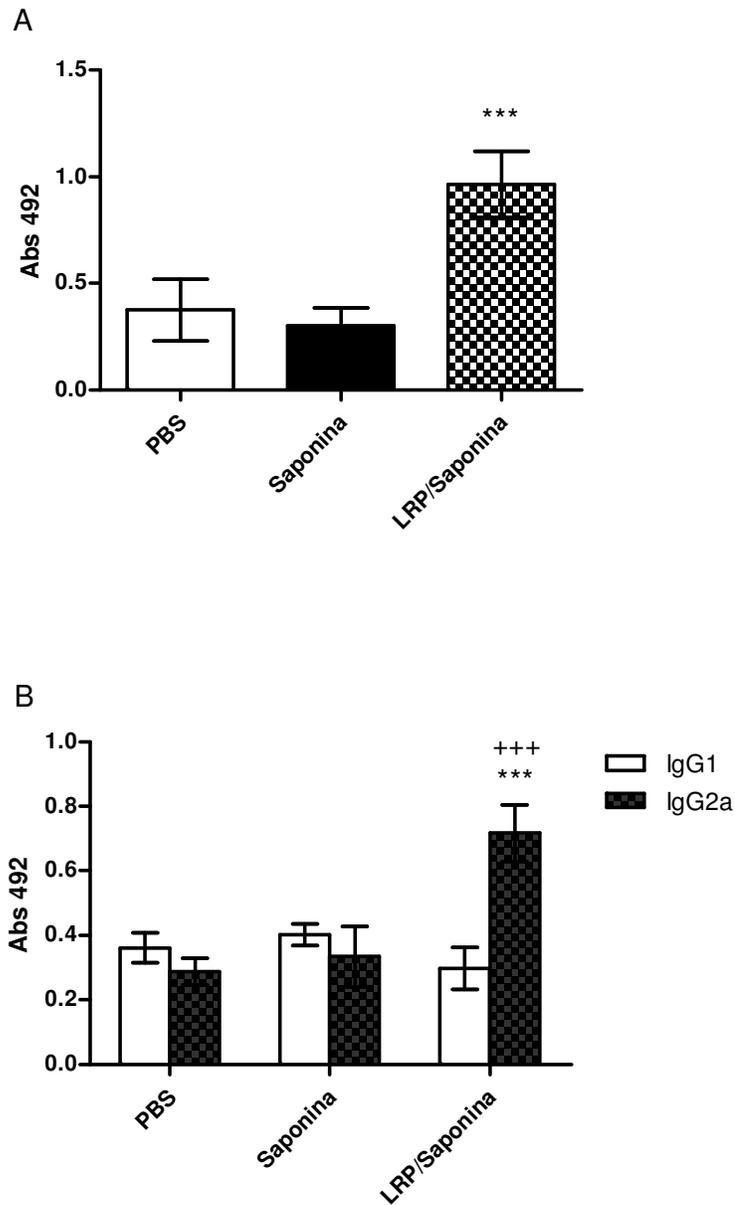


Figura 10: Análise da produção IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LRPs pelos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* e a resposta humoral foi avaliada cerca de oito semanas após o desafio. A presença de IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B) anti-LRPs foi avaliada no soro dos animais. Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** indica $P < 0,0001$ no grupo LRP/Saponina em comparação aos grupos controle e *** indica $P < 0,0001$ para IgG2a em relação a IgG1 no grupo LRP/Saponina. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

5.6 – Avaliação da Produção de Nitrito pelos Camundongos Após as Imunizações e a Infecção Desafio com *L. chagasi*.

A produção de NO pode indicar a ativação do mecanismo leishmanicida dos macrófagos e a posterior resolução da infecção. A produção de NO pode ser detectada através da liberação de nitrito (NO_2^-), que é um produto final oxidativo do NO. Neste trabalho, a produção de nitrito foi avaliada pelo método de Griess nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos.

Podemos observar que no grupo LRP/Saponina a produção de nitrito foi significativamente maior em relação à observada nos grupos controle (Figura 11). Assim, conclui-se que a carga parasitária reduzida nos animais imunizados pode ter sido devida à ativação dos macrófagos por citocinas secretadas durante a ativação de resposta Th1, que produziram NO, provocando a eliminação dos parasitos.

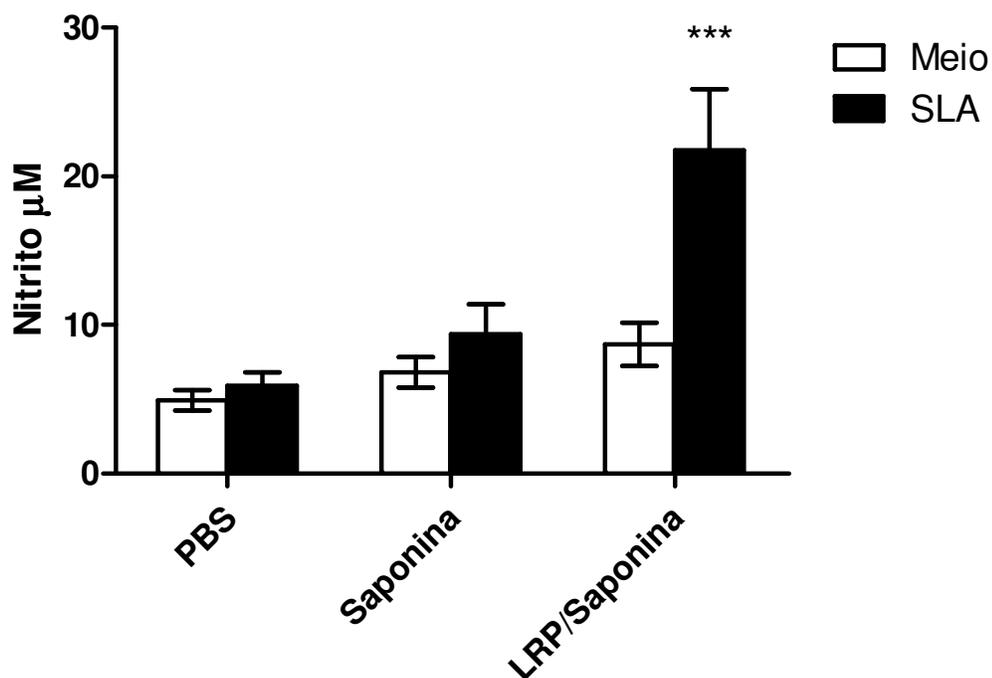


Figura 11: Análise da produção de nitrito pelos esplenócitos dos camundongos imunizados e desafiados. Após 30 dias da última dose de imunógenos, os camundongos foram desafiados com 1×10^5 formas promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* e a produção de nitrito foi avaliada cerca de oito semanas após o desafio. A produção foi avaliada sob estímulos com 50 µg de SLA ou não-estimuladas (meio). Cada barra representa a média e o desvio padrão dos grupos de camundongos. *** indica $P < 0,0001$ no grupo LRP/Saponina em comparação aos grupos controle de acordo com o estímulo. Os experimentos foram repetidos com resultados similares.

6 – Discussão.

As leishmanioses são doenças endêmicas em cerca de 88 países e a incidência é de aproximadamente 2 milhões de novos casos a cada ano (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html).

Como o tratamento ainda é considerado insatisfatório, com muitos efeitos colaterais e ainda há o desenvolvimento de resistência dos parasitos aos fármacos utilizados, uma vacina profilática seria uma alternativa interessante para o controle da doença.

Neste trabalho, observou-se que a imunização de camundongos BALB/c com LRP obtidas da espécie *L. infantum* associadas ao adjuvante saponina, foi capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1 com a produção das citocinas IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF. A resposta imune induzida foi capaz de proteger os animais contra o desafio, uma vez que foi verificada a redução significativa da carga parasitária no baço e fígado dos mesmos. A redução do número de parasitos nos camundongos protegidos ocorreu, possivelmente, pela ativação dos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, via produção de NO.

Diversos estudos sobre a imunologia da LV mostram que a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos e de IFN- γ por linfócitos T é necessária para o controle da infecção. Segundo Lehmann *et al* (2000), linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. donovani* produzem níveis elevados de IFN- γ , quando comparadas às linhagens suscetíveis (Lehmann *et al.*, 2000). Além disso, o IFN- γ foi relacionado à infecção assintomática ou subclínica em crianças com LV (Carvalho *et al.*, 1992).

No presente trabalho, a produção de IFN- γ foi dependente de IL-12, como mostrado pela utilização de anticorpo monoclonal anti-IL-12, assim como pelos elevados níveis de IL-12p70 que foram detectados nos sobrenadantes da cultura de esplenócitos dos camundongos protegidos.

A IL-12 já foi utilizada como adjuvante em estudos vacinais contra espécies de *Leishmania* (Coelho *et al.*, 2003; Tewary *et al.*, 2006) e também no tratamento de camundongos infectados, nos quais observou-se uma redução da carga parasitária (Murray & Hariprashad, 1995).

A indução de um fenótipo de resistência contra a infecção por *Leishmania* requer, possivelmente, a participação conjunta de populações de células T CD4⁺ e CD8⁺, ambos contribuindo na produção de IFN- γ (Herath *et al.*, 2003). Neste trabalho, verificou-se que a produção de IFN- γ ocorreu com a participação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Também na proteção conferida pela proteína gp63 em lipossomos contra a infecção com *L. donovani*, foi verificada a participação de ambos os tipos celulares (Bhowmick *et al.*, 2008). Portanto, tanto células CD4⁺ quanto células CD8⁺ parecem ser importantes para o controle da infecção.

A IL-12, citocina secretada por células apresentadoras de antígenos, atuam nas células T helper precursoras e induzem as mesmas a se diferenciarem em células Th1. Tais células então podem secretar IFN- γ , que induz, nas células parasitadas, a expressão da enzima iNOS que, por sua vez, metaboliza a L-arginina e induz a produção de NO, essencial para a morte dos parasitos fagocitados (Melby, 2002). Observou-se nesse trabalho que o grupo de camundongos que apresentou carga parasitária reduzida foi capaz de produzir níveis elevados de nitrito em relação aos grupos controle.

Após a infecção desafio, no grupo LRP/Saponina, os níveis de IL-4 e IL-10 foram reduzidos enquanto nos grupos controle, essa produção foi elevada após o estímulo com o SLA.

A produção de IL-10 está intimamente relacionada com a progressão da LV. Segundo Murphy *et al.* (2001), camundongos BALB/c IL-10^{-/-} foram resistentes à infecção com *L. donovani* (Murphy *et al.*, 2001). Na avaliação de diferentes linhagens de camundongos infectados por *L. donovani*, aquelas suscetíveis produziram níveis elevados de IL-10 em

relação aos resistentes (Lehmann *et al.*, 2000) e estudos em humanos detectaram níveis elevados de mRNA para IL-10 em pacientes com LV sintomática (Karp *et al.*, 1993).

A principal ação da IL-10 sobre o sistema imune, que favorece a progressão da doença, pode estar relacionada à desativação de macrófagos, pela inibição da produção de NO (Vouldoukis *et al.*, 1997). Esse último fato está em concordância com nosso estudo, no qual os camundongos não-protetidos não produziram NO.

Entretanto, a participação de IL-4 na progressão da LV ainda é controversa. A maior produção de IL-4 ocorreu ao mesmo tempo em que houve um número elevado de parasitos em camundongos infectados (Saha *et al.*, 1993). A IL-4 também inibiu a atividade leishmanicida de macrófagos humanos (Vouldoukis *et al.*, 1997). Contudo, já foi mostrada a importância de IL-4 para a maturação do granuloma (Stager *et al.*, 2003) e para a cura associada com a quimioterapia (Alexander *et al.*, 2000). Neste último estudo, foi avaliado o tratamento em camundongos BALB/c IL-4^{-/-} e IL-4^{+/+} infectados com *L. donovani* por meio do uso do estibogluconato de sódio. Os camundongos IL-4^{-/-} não responderam ao tratamento e houve a produção prejudicada de IFN- γ (Alexander *et al.*, 2000). Além disso, a neutralização da IL-4 endógena não foi associada com a redução da carga parasitária em camundongos BALB/c, apesar da supressão verificada da resposta imune Th2 (Lehmann, *et al.*, 2000).

Os estudos vacinais contra LV com a avaliação da produção de IL-4 também são contraditórios. A proteção fornecida pela imunização de camundongos BALB/c com DNA codificador da proteína A2 ou com a proteína gp63 associada a lipossomos estava relacionada à produção reduzida de IL-4 (Zanin *et al.*, 2007; Bhowmick *et al.*, 2008). No entanto, em outro trabalho, a proteção fornecida pela imunização com antígenos de *L. amazonensis* foi associada à produção elevada de IL-4 (Vilela *et al.*, 2007).

A proteção e suscetibilidade à infecção por espécies causadoras de leishmanioses também pode ser associada à presença dos isotipos IgG2a e IgG1, respectivamente. A ação

de linfócitos T pode regular a troca de isotipo nos linfócitos B. A presença de IL-4 nos primeiros 2 a 3 dias após a ativação das células B aumenta a troca de isotipo para IgG1. Similarmente, o IFN- γ estimula a troca para IgG2a. Esses fatores são antagônicos, pois o IFN- γ pode inibir a troca para IgG1 e a IL-4, por sua vez, pode inibir a troca para IgG2a (Coffman, 1993). Em nosso trabalho, encontramos que no grupo LRP/Saponina houve a predominância do isotipo IgG2a sobre IgG1, podendo este resultado ser usado como marcador de indução de reposta Th1. Já foi verificado que camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* produziram predominantemente IgG1 (Carrión *et al.*, 2006) e em pacientes resistentes ao tratamento com antimoniais, uma baixa produção de IgG2 e uma produção elevada de IgG1 foram encontradas (Saha *et al.*, 2006).

Alterações na hematopoiese são comumente associadas às infecções por vírus, bactérias e protozoários. Em infecções por *Leishmania*, a hematopoiese parece estar acelerada. Citocinas como GM-CSF, IL-3 e M-CSF são responsáveis por regular a proliferação e diferenciação de células mielóides (Cotterell *et al.*, 2000).

Em nossas análises, a proteção dos camundongos do grupo LRP/Saponina estava relacionada também com uma produção aumentada de GM-CSF.

Contudo, a produção de GM-CSF durante a infecção por *Leishmania* apresenta resultados controversos. Macrófagos de camundongos BALB/c suscetíveis secretaram altos níveis de GM-CSF durante a infecção ativa com *L. amazonensis*, quando comparados aos macrófagos de camundongos resistentes C57BL/10 (Soares & Barcinski, 1992). GM-CSF recombinante, injetado em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, induziu também a uma exacerbação significativa da lesão (Greil *et al.*, 1988).

Analisando camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major*, foi observado que nos camundongos resistentes ocorreu um aumento de GM-CSF (Saha *et al.*, 1999). Em camundongos infectados com *L. donovani* e posteriormente tratados com GM-CSF, houve

uma redução da carga parasitária. A redução do número de parasitos no fígado desses animais foi acompanhada pelo aumento do número de neutrófilos e monócitos na circulação, pelo influxo de células mielo-monocíticas e sua acumulação no tecido infectado (Murray *et al.* 1995). Macrófagos derivados de monócitos humanos, pré-tratados com rGM-CSF, foram capazes de inibir a replicação dos parasitas internalizados, sugerindo que esta citocina é um ativador de macrófagos (Weiser *et al.*, 1987).

GM-CSF também apresentou propriedades adjuvantes em associação com antígenos de *Leishmania* na imunoterapia de paciente com LMC resistente aos tratamentos convencionais. Todas as lesões do paciente foram resolvidas sem recorrência durante 2 anos (Badaro *et al.*, 2001). O uso de rGM-CSF humano administrado em indivíduos com uma vacina derivada de *L. amazonensis*, denominada de Leishvacin, induziu a uma maior produção de IFN- γ em relação ao grupo controle do experimento (Follador *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a proteção dos camundongos foi decorrente da imunização com LRP associadas à saponina, essa, considerada um forte indutor de resposta imune Th1.

Saponinas são esteróides ou glicosídeos triterpenóides encontradas em plantas selvagens ou cultivadas, dentre elas *Q. saponaria*, animais marinhos inferiores e algumas bactérias. São glicosídeos tensoativos que contem um núcleo hidrofóbico de estrutura triterpenóide com cadeias de carboidratos ligadas ao núcleo (Rajput *et al.*, 2007).

Os extratos de *Q. saponaria*, como adjuvantes, foram inicialmente descritos na década de 1930 (Sun *et al.*, 2009). Enquanto é adequada para uso veterinário, a saponina ainda não pode ser utilizada em humanos por possuir alguns efeitos tóxicos, principalmente hemolíticos, que podem ser reduzidos através de remoção química de porções glicídicas (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2004). A capacidade de QuilA e QS-21 (frações do extrato de *Q. saponaria*) de estimular a resposta imune Th1 e linfócitos T citolíticos, a torna ideal para uso contra patógenos intracelulares (Sun *et al.*, 2009).

Em vários estudos de proteção contra leishmaniose murina, a saponina está sendo usada como adjuvante. Os antígenos FML, NH36 recombinante e gp63 associados à saponina forneceram proteção contra o desafio com *L. donovani*, relacionada com a indução de uma resposta imune Th1 (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2004 ; Aguilar-Be *et al.*, 2005 ; Paraguai-de-Sousa *et al.*, 2001).

Além dos estudos em modelo murino, a utilização de saponina na proteção contra leishmaniose visceral canina também está sendo avaliada. A proteína A2, administrada em cães juntamente com saponina, induziu proteção nestes animais, que foi correlacionada com níveis elevados de IFN- γ (Fernandes *et al.*, 2008).

As LRPs têm sido avaliadas em outros estudos como antígenos vacinais nas leishmanioses. Estas proteínas, purificadas da espécie *L. major*, quando administradas com o adjuvante ODN-CpGs, foram capazes de fornecer proteção contra desafio com essa mesma espécie, tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6, que foram submetidos a dois modelos de infecção: subcutânea (com inóculo com número elevado de formas promastigotas em fase estacionária) e intradérmica (com um número reduzido de promastigotas metacíclicas), respectivamente (Iborra *et al.*, 2008). Em concordância com os dados do presente trabalho, a proteção contra *L. major* também foi devida à indução de resposta Th1, com elevada produção de IFN- γ e reduzida produção de IL-4 e IL-10 (Iborra *et al.*, 2008).

Ainda, recentemente, LRPs de *L. infantum* foram também avaliadas para o diagnóstico da LV canina e os resultados demonstraram que as mesmas apresentam-se adequadas para o reconhecimento de cães com a doença sintomática, assintomática e oligossintomática, seja infectados por *L. infantum* ou *L. chagasi* (Coelho *et al.*, 2009).

7 – Conclusões.

1- A imunização de camundongos BALB/c com LRPs purificadas de *L. infantum* associadas à saponina foi capaz de induzir a produção de níveis elevados de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF e a uma baixa produção de IL-4 e IL-10. A produção do isotipo IgG2a anti-LRP no grupo vacinado foi significativamente maior em relação ao isotipo IgG1 anti-LRP.

2- Após a infecção desafio com a espécie *L. chagasi*, observou-se que a imunização com LRP/saponina foi capaz de conferir redução significativa da carga parasitária no baço e fígado dos animais.

3- Os animais imunizados e desafiados apresentaram a manutenção de uma resposta imune Th1, verificada pela produção elevada de IFN- γ , IL-12p70 e GM-CSF, a uma baixa produção de IL-4 e IL-10 e maior produção de IgG2a.

4- O perfil de resposta imune gerado pela imunização com as LRPs associada à saponina, que conferiu proteção aos animais, foi baseado na produção de IFN- γ dependente de IL-12, tanto por linfócitos T CD4⁺ quanto por linfócitos T CD8⁺.

8 – Perspectivas.

- 1- Avaliação de outros adjuvantes e outras linhagens de camundongos.
- 2- Avaliação vacinal das LRPs contra outras espécies de *Leishmania*.
- 3- Identificação das proteínas mais importantes dentro do complexo protéico das LRPs para a composição vacinal.
- 4- Purificação de LRPs de outras espécies de *Leishmania* e estudo da homologia protéica entre elas.

9 – Referências Bibliográficas.

AGUILAR-BE, I. *et al.* Cross-protective efficacy of a prophylatic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 812-819, 2005.

AHMED, S. B. *et al.* A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, v. 22, p. 1631-1639, 2004.

ALEXANDER, J. *et al.* Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, v. 30, p. 2935-2943, 2000.

AMÓRA, S. S. *et al.* Control of phlebotomine (Díptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 303-310, 2009.

AWASTHI, A. *et al.* Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, v. 119, p. 238-258, 2004.

BADARO, R. *et al.* Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony: a case report. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, p. 223-232, 2001.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, v. 24, p. 324-330, 2008.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 329-337, 2006.

BHOWMICK, S. *et al.* gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 1003-1015, 2008.

BOARINO, A. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, p. 647-653, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUFFET, P. A. *et al.* Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 2167-2168, 1995.

CAMPBELL, K. *et al.* DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 6270-6278, 2003.

CARDOSO, S. R. A. *et al.* Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 193-199, 2003.

CARRIÓN, J. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 173-183, 2006.

CARVALHO, E. M. *et al.* Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 165, p. 535-540, 1992.

CARVALHO, F. A. A. *et al.* Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 43, p. 289-295, 2002.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what Are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p.873-882, 2007.

COELHO, E. A. F. *et al.* Immune response induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 3988-3994, 2003.

COELHO, E. A. F. *et al.* Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal proteins extracts. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, p. 1774-1780, 2009.

COFFMAN, R. L. Mechanisms of helper T-cell regulation of B-cell activity. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 681, p. 25-28, 1993.

COLLATZ, E. *et al.* Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, p. 9071-9080, 1977.

COTTEREL, S. E. J. *et al.* *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . *Blood*, v. 95, p. 1642-1651, 2000.

CRESCENTE, J. A. B. *et al.* A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009.

DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 151-156, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. v. 27, p. 305-318, 2004.

DONNELLY, J. J. *et al.* DNA vaccines. *Annual Reviews Immunology*, v. 15, p. 617-648, 1997.

FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, p. 5888-5895, 2008.

FOLLADOR, I. *et al.* Immune response to an inactive vaccine against American Cutaneous Leishmaniasis together with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Vaccine*, v. 20, p. 1365-1368, 2002.

GENARO, O. & REIS, A. B. Leishmaniose tegumentar americana. In: NEVES, D. P. *et al.* *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap.8, p. 47-64.

GOLLOB, K. J. *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8-(double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*. v. 8, p. 1338-1343, 2008.

GOMES, Y. M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONZALO, R. M. *et al.* Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 701-711, 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 23-35, 2003.

GOTO, H. & LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 615-623, 2004.

GREIL, J. *et al.* Application of recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, v. 18, p. 1527-1533, 1988.

GRIMALDI, G. *et al.* A Review of the distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41, p. 687-725, 1989.

GRIMALDI, G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUMY, A. *et al.* The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 433-444, 2004.

GURUNATHAN, S. *et al.* Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 186, p. 1137-1147, 1997.

HANDMAN, E. *et al.* Protective vaccination with Promastigote Surface Antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 4261-4267, 1995.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 229-243, 2001.

HERATH, S. *et al.* Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN- γ production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunology*, v. 25, p. 559-567, 2003.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

IBORRA, S. *et al.* The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 6562-6572, 2003.

IBORRA, S. *et al.* Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 5842-5852, 2005.

IBORRA, S. *et al.* Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis. *Microbes and Infection*, v. 10, p. 1133-1141, 2008.

KARP, C. L. *et al.* *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked evaluation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 91, p. 1644-1648, 1993.

LEHMANN, J. *et al.* The capacity to produce IFN- γ rather than the presence of Interleukin-4 determines the Resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v. 20, p. 63-77, 2000.

LIEW, F. Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 55-60, 2002.

LINDOSO, J. A. L. & LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, p. 247-253, 2009.

MALLA, N. & MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 267-274, 2006.

MARQUES-DA-SILVA, E. A. *et al.* Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but does not protect BALB/c against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research*, v. 98, p. 67-74, 2005.

MAURICIO, I. L. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 188-189, 2000.

McMAHON-PRATT, D. *et al.* Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 3351-3359, 1993.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 15, p. 485-490, 2002.

MÉNDEZ, S. *et al.* The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *The Journal of Immunology*, v. 166, p. 5122-5128, 2001.

MIRÓ, G. *et al.* Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, v. 24, p. 371-377, 2008.

MOUGNEAU, E. *et al.* Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*, v. 268, p. 563-566, 1995.

MURPHY, M. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, v. 31, p. 2848-2856, 2001.

MURRAY, H. W. *et al.* Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 95, p. 1183-1192, 1995.

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 181, p. 387-391, 1995.

MURRAY, H. J. *et al.* Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *et al.* Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* saponin. *Vaccine*, v. 22, p. 2470-2479, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccine for Leishmaniasis in the Fore Coming 25 Years. *Vaccine*, v. 26, p. 1709-1724, 2008.

PARAGUAI-DE-SOUSA, C.B. *et al.* Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the Fucose-Manose Ligand (FML). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, p. 547-551, 1994.

PARAGUAI-DE-SOUSA, E. *et al.* Vaccination of BALB/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP63 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v. 19, p. 3104-3115, 2001.

PAREDES, R. *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of Postgraduate Medicine*. v. 49, p. 39-49, 2003.

PINHEIRO, P. H. C. *et al.* A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 162, p. 32-39, 2009.

PORROZZI, R. *et al.* Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, p. 544-548, 2007.

RAJPUT, Z. I. *et al.* Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v. 8, p. 153-161, 2007.

RAMIRO, M. J. *et al.* Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, v. 21, p. 2474-2484, 2003.

REITHINGER, R & DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 21-25, 2007.

REQUENA, J. M. *et al.* Evolutionary conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today*, v. 16, p. 246-250, 2000

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology*, v. 3, p. 189-196, 2001.

SAHA, B. *et al.* Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. III. cytokine-mediated regulation of parasite replication. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 37, p. 155-158, 1993.

SAHA, B. *et al.* Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *European Journal of Immunology*, v. 29, p. 2319-2329, 1999.

SAHA, S. *et al.* Immune responses in kala-azar. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 245-266, 2006.

SANTOS, D. O. *et al.* Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, v. 103, p. 1-10, 2008.

SHIMMIN, L. C. *et al.* Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from Archaeobacteria, Eubacteria and Eucaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, v. 29, p. 448-462, 1989.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 311-330, 2006.

SKEIKY, Y. A. *et al.* Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*, v. 20, p. 3292-3303, 2002.

SOARES, L. R. & BARCINSKI, M. A. Differential production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by macrophages from mice susceptible and resistant to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 51, p. 220-224, 1992.

SOONG, L. *et al.* *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 3559-3566, 1995.

SOTO, M. *et al.* Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* Ribosomal P0 protein genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 61, p. 265-274, 1993a.

SOTO, M. *et al.* Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 21835-21843, 1993b.

SOTO, M. *et al.* During active viscerocutaneous leishmaniasis the Anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 100, p. 246-252, 1995a.

SOTO, M. *et al.* Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunology Letters*, v. 48, p. 23-28, 1995b.

SOTO, M. *et al.* Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 3, p. 387-391, 1996.

SOTO, M. *et al.* Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 58-63, 1998.

SOTO, M. *et al.* The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein LiP2a induces a prominent humoral responses *in vivo* and stimulates cell proliferation *in vitro* and interferon-gamma (IFN-gamma) production by murine splenocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 122, p. 212-218, 2000.

STAGER, S. *et al.* Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 4804-4807, 2003.

SUKUMARAN, B. *et al.* Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *L. donovani*. *Vaccine*, v. 21, p. 1292-1299, 2003.

SUN, H. *et al.* Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, v. 27, p. 1787-1796, 2009.

TCHÓRZEWSKI, M. The acidic ribosomal P proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, p. 911-915, 2002.

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

TRIPATHI, P. *et al.* Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 51, p. 229-242, 2007.

TSURUGI, K. *et al.* Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 7940-7946, 1976.

TSURUGI, K. *et al.* Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, p. 946-955, 1978.

VILELA, M. C. *et al.* Successful vaccination against *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice with freeze-thawed *Leishmania* antigen and *Corynebacterium parvum*. *Acta Tropica*, v. 104, p. 133-39, 2007.

VOULOUKIS, I. *et al.* Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *European Journal of Immunology*, v. 27, p. 860-865, 1997.

XU, D. & LIEW, F. Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, v. 84, p. 173-176, 1995.

WEISER, W. Y. *et al.* Recombinant human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macropahges. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 166, p. 1436-1446, 1987

WHO – World Health Organization. Programmes and Projects. 2006. Disponível em:
< http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>
Acesso em 27 nov 2009.

WILSON, M. E. *et al.* A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune response in infected mice. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 2062-2069, 1995.

ZANIN, F. H. C. *et al.* Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and Nucleoside Hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes and Infection*, v. 9, p. 1070-1077, 2007.

Anexo A – Certificado de Aprovação do CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 47/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Proteínas ribossomais de Leishmania (LRPs) empregadas no diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral canina e no desenvolvimento de vacinas**", que tem como responsável(is) **Eduardo Antônio Ferraz Coelho**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 08/2009**.

Este certificado expira-se em **12/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 47/2009**, related to the project entitled "**Leishmania ribosomal proteins (LRPs) employed to laboratorial diagnosis of canine Visceral Leishmaniasis and to development of vaccines**", under the supervisors of **Eduardo Antônio Ferraz Coelho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 12, 2009**.

This certificate expires in **August 12, 2014**.

Belo Horizonte, 17 de Agosto de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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