

Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**A mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação contra  
infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster  
dourado (*Mesocricetus auratus*)**

**LUZINEI DA SILVA COUTO**

Rio de Janeiro

Setembro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C871 Couto, Luzinei da Silva

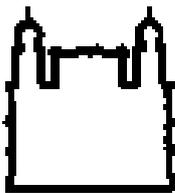
A mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação  
contra infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo  
hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) / Luzinei da Silva Couto.  
– Rio de Janeiro, 2014. xiii,55 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 38-47

1. Vacina. 2. Mucosa. 3. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 4.  
Leishmaniose tegumentar americana. I. Título.

CDD 616.9364



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical  
Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Arthur Neiva – Térreo

**LUZINEI DA SILVA COUTO**

**A mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação contra  
infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster  
dourado (*Mesocricetus auratus*)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Eduardo Fonseca Pinto

Rio de Janeiro  
Setembro de 2014



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
Instituto Oswaldo Cruz  
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical  
Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Arthur Neiva – Térreo

**Luzinei da Silva Couto**

**A mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação contra  
infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster  
dourado (*Mesocricetus auratus*)**

Orientador: Eduardo Fonseca Pinto

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Examinadores:

**Prof. Dr.** Sergio Coutinho Furtado de Mendonça – Presidente e revisor

**Prof. Dra.** Bartira Rossi Bergmann – Membro

**Prof. Dra.** Silvia Amaral Gonçalves da Silva – Membro

**Prof. Dra.** Katia da Silva Calabrese – 1º Suplente

**Prof. Dr.** Renato Porrozzi de Almeida – 2º Suplente

Rio de Janeiro, 17 de setembro de 2014.

Aos meus pais Luis Carlos e Ana Dilsa, aos meus irmãos Angélica, Isaías, Leandro e Juliana e toda família Couto da qual sinto orgulho em fazer parte.

O Senhor não vê como vê o homem, pois o  
homem vê o que está diante dos olhos,  
porém o Senhor olha para o coração.

1 Samuel 16:7

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me concedido o privilégio de fazer parte desse grupo, aonde cheguei como um desconhecido e hoje me sinto um integrante de uma grande família, a família LIPMED.

Aos meus pais que com a graça de Deus, souberam me conduzir da melhor forma possível mostrando que na vida tudo é possível para aqueles que amam a Deus. Pai e mãe eu amo vocês.

Aos meus irmãos Angélica, Isaias, Leandro e Juliana, aos meus tios, principalmente Ronaldo e Simplício, assim como meus primos que sempre me deram força e acreditaram em mim.

Ao casal Alessandro e Valeska que me indicaram a vaga para a iniciação científica no LIPMED.

À doutora Alda Maria da Cruz que me recebeu em seu laboratório para a iniciação científica em 2008 e deste então não mediu esforços para me ajudar. Dra. Alda saiba que tenho uma admiração imensa pela sua pessoa como profissional, pesquisadora, ser humano, amiga e muito mais.

Ao Dr. Eduardo Fonseca Pinto, o qual me falta palavras para descrever a sua importância em minha caminhada. Lembro que me recebeu já me inserindo em sua equipe e deste então foi me dando responsabilidades. Naquele momento fui abraçando todas, mas, na verdade tudo era novidade e foi um grande aprendizado. Foi por este caminho que conseguimos formar uma equipe onde foi possível conhecer um pouco melhor de cada um. Dr. Eduardo, sou muito grato pela confiança depositada em minha pessoa e por fazer parte de sua equipe, você é um exemplo de pessoa como homem, pesquisador, amigo e um homem de família. Hoje temos uma ótima relação aluno – orientador, mas o ganho maior é ter o Eduardo como um amigo.

Ao Dr. Adriano Gomes, pela imensa contribuição nos trabalhos desenvolvidos tanto na bancada como na parte intelectual. Claro que não poderia passar em branco, os momentos de distrações (St. Gallen) e nossa amizade.

À minha amiga Dra. Joanna Reis. Já saiba que sou seu fã, não encontro palavras para descrever tamanha a admiração que sinto por você. Você é simplesmente fora do comum, agradeço a Deus por ter você como amiga. E foi ótimo todo esse tempo de convivência, jamais esquecerei nossos experimentos

como: ELISAs e Ficolls que tanto nos deram trabalho e aquela frase: “você é minha versão masculina”.

À doutoranda Giselle Fagundes e a Dra. Raquel Peralva, assim como a mestre Elaine Marques que sempre estiveram prontas à nos ajudar no desenvolvimento dos protocolos e a mestranda Andrea Saavedra, que chegou um pouco depois mas sempre organizada e comprometida para o bom andamento dos experimentos, criando assim seu espaço no grupo. Aos demais integrantes do LIPMED que nunca mediram esforços para me ajudar, Ricardo Gonçalves, Ricardo Nogueira, Rosa Plácido, Milene Yoko, Josué Almeida, Natalia, Claudia Covas, Carolina Mendes, Maria Fantinatti e a todos os alunos de iniciação científica que passaram um período no LIPMED. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas são muitos a agradecer.

Aos integrantes do laboratório LIP, onde pude conviver com pessoas maravilhosas como Dr. Álvaro Bertho, Raquel Ferraz, Clarissa Cunha, Josué Lima, Dra. Lea Cysne, entre outros e ao Dr. Sergio Mendonça pela concessão do espaço. As amigas Rosi e Vera da esterilização pela amizade e ajuda no processamento dos materiais e a minha amiga tricolor Rosângela, que sempre nos apoiou nas tarefas da secretaria.

Aos integrantes do biotério do pavilhão Carlos Chagas, que nos apoiaram cuidando dos os animais.

Às agências de fomentos principalmente a FAPERJ e ao CNPQ.

À FIOCRUZ por permitir a realização deste projeto em suas instalações.

À pós-graduação em Medicina Tropical por me inserir em seu quadro de discente e me acrescentar um vasto conhecimento na área da ciência.

Aos meus amigos de turma que muito contribuíram para o meu crescimento assim como pelas boas risadas que dávamos diariamente (De Deus, Meme, Carol, Toíinha, Edilson, entre outros).

Aos doutores que aceitaram compor a banca para avaliar minha dissertação sou eternamente grato e me sinto honrado por ser avaliado por pessoas tão renomadas no meio científico.

E não poderia de agradecer a duas pessoas que me acompanharam durante todo meu ingresso no mestrado, com palavras de apoio e incentivo sempre acreditando que eu era capaz. Muito obrigado por tudo Daiana de Jesus Haridoim e Sirlene Flores.

## ÍNDICE

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose – A doença	1
1.2. Métodos de controle da doença	4
1.2.1. O tratamento	4
1.2.2. Vacinação contra as leishmanioses	5
1.3. Imunização por via Mucosa	8
1.4. Modelo experimental susceptível à infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	10
1.5. Sistema imune de mucosa no modelo hamster	13
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA	17
5. METODOLOGIA	18
5.1. Animais	18
5.2. Parasitos	18
5.3. Antígeno vacinal	18
5.4. Imunização e infecção	18
5.5. Avaliação da Eficácia vacinal	19
5.6. Avaliação da resposta imune	19
5.6.1. Quantificação de RNAm de citocinas por PCR em tempo real	20
5.6.2. Quantificação de Imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i>	20
5.6.3. Análise imunohistoquímica da pele infectada	21
5.7. Análise estatística	22
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÃO	37
9. REFERÊNCIAS	38

**DA-SILVA-COUTO L**; RIBEIRO-ROMÃO RP; SAAVEDRA AF; Souza BLSC; Moreira OC; GOMES-SILVA A; Rossi-Bergmann B; Da-CRUZ AM; **PINTO EF (2015)**. Intranasal vaccination with leishmanial antigens protects golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. PLoS Neglected Tropical Diseases 9:e3439

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CPG ODN	Citosina-fosfato-guanosina Oligodeoxinucleotídeo
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
FML	Ligante de fucose e manose
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- $\gamma$	Interferon - gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G um
IgG2	Imunoglobulina G dois
IL-2, 4,10 e 12	Interleucina dois, quatro, dez e doze
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
kDa	Kilodaltons
LaAg	Antígeno total de <i>Leishmania amazonensis</i>
LACK DNA	DNA plasmidial com o gene que codifica a proteína LACK
LACK	proteína de <i>Leishmania</i> homóloga ao receptor de quinase C ativada
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose disseminada
LDA	Ensaio de diluição limitante
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MØ	Macrófagos

mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NALT	Tecido linfóide associado ao nariz
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RACK	Receptores de Proteína Quinase C Ativada
RTqPCR	Transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase em tempo real
TBS	Salina tris tamponada
TCR	Receptor de células T
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Células T helper subtipo 1
Th2	Células T helper subtipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
$\mu\text{g}$	Micrograma

## RESUMO

Resultados anteriores demonstraram que a administração oral e intranasal de antígenos brutos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LaAg) protege parcialmente camundongos contra a infecção por *L. amazonensis*. No entanto, estudos de vacinação contra as espécies do subgênero *Viannia*, as principais espécies causadora da leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, têm sido dificultados pela falta de modelos experimentais de fácil manuseio que reproduzam a doença humana. Recentemente, foi demonstrado que o hamster dourado é um modelo adequado para o estudo da imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *L. (Viannia) braziliensis*. Usando o modelo hamster, investigamos se o efeito protetor da imunização intranasal com LaAg pode ser estendido a infecção por *L. braziliensis*. Hamsters foram vacinados com duas doses de LaAg (10 µg) intranasal (IN) ou duas doses de LaAg (20 µg) por via intramuscular (IM) e duas semanas após a vacinação foram desafiados com *L. braziliensis*. Os resultados demonstraram que a imunização com LaAg reduziu significativamente o crescimento da lesão e da carga parasitária, bem como os níveis de IgG e IgG2 no plasma. No final do experimento, 114 dias após a infecção, os hamsters que foram considerados protegidos expressaram na pele níveis semelhantes de mRNA para IFN-γ e IL-10 comparados aos níveis na pele de animais não infectados, diferentemente do observado nos animais não protegidos. Comparando com a via nasal, a imunização pela via intramuscular (IM) não induziu proteção. Estes resultados demonstram pela primeira vez que a imunização pela via nasal pode induzir proteção cruzada contra a infecção por *L. braziliensis*.

## ABSTRACT

Previous results have shown that oral and intranasal administration of crude *Leishmania (Leishmania) amazonensis* antigens (LaAg) partially protects mice against *L. amazonensis* infection. However, vaccination studies on species of the subgenus *Viannia*, the main causative species of cutaneous and mucosal leishmaniasis in the Americas, have been hampered by the lack of easy-to-handle bio-models that accurately mimic the human disease. Recently, we demonstrated that the golden hamster is an appropriate model for studying the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (Viannia) braziliensis*. Using the golden hamster model, we investigated whether the protective effect of intranasal immunisation with LaAg can be extended to *L. braziliensis* infection. Golden hamsters vaccinated with either two intranasal (IN) doses of LaAg (10 µg) or two intramuscular doses of LaAg (20 µg) were challenged 2 weeks post-vaccination with *L. braziliensis*. The results showed that IN immunisation with LaAg significantly reduced lesion growth and parasitic load as well as serum IgG and IgG2 levels. At the experimental endpoint on day 114 post-infection, IN-immunised hamsters that were considered protected expressed IFN-γ and IL10 mRNA at similar levels as uninfected skin. Unlike what was observed in animals not protected. In contrast to the nasal route, intramuscular (IM) immunisation failed to provide protection. These results demonstrate for the first time that the nasal route of immunisation can induce cross protection against *L. braziliensis* infection.

# **1. INTRODUÇÃO**

---

## **1.1. Leishmaniose – A doença**

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, transmitida a animais e ao homem quando picados por fêmeas de vetores dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) infectadas. Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* e mais de 500 espécies de flebotomíneos conhecidos. Destes, apenas cerca de 30 espécies foram consideradas transmissoras de *Leishmania*. Somente as fêmeas de flebotomíneos são capazes de transmitir os parasitos, pois elas necessitam de sangue para o desenvolvimento de seus ovos. Elas se tornam portadoras da *Leishmania* quando ingerem sangue e linfa de um animal ou uma pessoa infectada. Os principais hospedeiros são animais vertebrados incluindo cães, gatos e equinos domésticos, assim como gambás, raposa-do-mato, os animais edentados (exemplo: tamanduá e preguiças) e humanos (Stockdale & Newton 2013, Ministério da Saúde, 2013, WHO 2014).

O parasito se apresenta de duas formas diferentes, uma no hospedeiro invertebrado na forma promastigota e outra em hospedeiro vertebrado na forma amastigota. A forma amastigota é arredondada ou oval, possui um pequeno flagelo interiorizado, tendo sua multiplicação no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, já a forma promastigota é alongada, possui flagelo extracelular e vive no tubo digestivo de inseto flebotomíneos e em meios de cultura axênicos (Rey 2008).

Durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o inseto ingere macrófagos e monócitos contendo formas amastigotas do parasito. Essas amastigotas são liberadas no interior do tubo digestivo do inseto e no epitélio intestinal se diferenciam em formas flageladas chamadas promastigotas procíclicas. Essas, por sua vez, se dividem sofrendo um processo de metaciclogênese, adquirindo virulência e transformando-se em formas promastigotas metacíclicas. Essas formas do parasito se destacam do epitélio, migrando para cavidade bucal do inseto e durante o próximo repasto, essas formas infectivas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado (Cunningham, 2002, Rey 2008).

Os parasitos são transmitidos na forma de promastigotas metacíclicos pelas fêmeas de flebotomíneos infectados. Uma vez em contato com hospedeiro vertebrado, o parasito induz a formação de um processo inflamatório que nas primeiras horas é constituído por células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (Solbach & Laskay 2000). Embora a incubação de *L. major* com neutrófilos mostrou a incapacidade desse tipo celular em matar o parasito, essa célula apresenta um papel fagocítico, funcionando apenas como um hospedeiro temporário (Van Zandbergen *et al.* 2004). Os neutrófilos apresentam pouca longevidade, porém, o processo normal de apoptose é retardado pela presença de *Leishmania* viva no interior desta célula (Aga *et al.* 2002). Após algumas horas de infecção, o infiltrado inflamatório passa a ser formado predominantemente por macrófagos, que irão fagocitar os neutrófilos apoptóticos, sendo essa uma via alternativa de entrada da *Leishmania* no macrófago. As interações de membrana entre estas células impedem a ativação do macrófago e propicia a sobrevivência da *Leishmania* no interior do mesmo, mostrando assim que os neutrófilos desempenham um papel de “Cavalo de Tróia” na infecção (van Zandbergen *et al.* 2004). Dentro do macrófago as formas promastigotas vão para o fagolisosomos onde se diferenciam em amastigotas. Sob essa forma, os parasitos proliferam e eventualmente rompem a célula permitindo que os parasitos infectem outras células fagocíticas estabelecendo a infecção (Cunningham, 2002, Goto & Lindoso 2010, Faleiro *et al.* 2014).

A leishmaniose é uma doença com múltiplas formas de apresentação clínica, cuja expressão depende de fatores inerentes à resposta imune do hospedeiro, ao agente etiológico e ao vetor envolvido na transmissão. Baseada em aspectos clínicos e evolutivos, a doença pode ser classificada em 2 grandes grupos: a leishmaniose tegumentar(LT) e a leishmaniose visceral (LV).

A LT inclui a forma cutânea (LC), caracterizada por feridas na pele e úlceras crônicas, em geral auto limitada, mas que pode evoluir para uma doença crônica e progressiva; a forma mucosa (LM) que afeta a mucosa nasal, oral e da faringe, produzindo uma doença em muitas das vezes incapacitante, a forma disseminada que pode ser observada em até 2% dos casos de LC, podendo acometer vários segmentos corporais e a forma cutânea difusa (LCD) que é uma expressão relativamente rara (Ministério da Saúde, 2013, WHO 2014).

Na leishmaniose visceral (LV) os sintomas clínicos caracterizam-se por hepatoesplenomegalia, com baço e fígado palpável, febre, perda de massa muscular, anemia, leucopenia, perda de peso, hemorragia nas mucosas, esta é a forma mais grave da doença. Além disso, complicações de natureza infecciosa bacteriana, como por exemplo: otite média aguda, piodermites, infecções dos tratos urinário e respiratório podem evoluir para um quadro de sepse, podendo levar o indivíduo ao óbito quando não tratada. (Ministério da Saúde, 2013, Faleiro *et al.* 2014).

Dados da literatura publicados recentemente demonstraram que a leishmaniose está presente em 98 países nos cinco continentes, com uma taxa de incidência anual de mais de 58.000 casos de LV e 220.000 casos de LT. No entanto, apenas cerca de dois terços dos países relataram dados de incidência por um período de cinco anos. Sendo assim, foi gerada uma estimativa de incidência anual de leishmaniose de 0,2 a 0,4 milhões de casos de da forma visceral e 0,7 a 1,2 milhões de casos da forma tegumentar (Alvar *et al.* 2012).

O Brasil é um país de grande importância epidemiológica, pois se apresenta entre os seis países responsáveis por 90% dos casos de LV no cenário mundial e entre os dez países que são responsáveis por 75% dos casos de LT (Alvar *et al.* 2012). Estas colocações mostram que o Brasil ocupa posição ímpar, pois é endêmico para ambas as formas, tegumentar e visceral, com uma média anual de 28,5 mil casos notificados nos últimos 20 anos e aproximadamente 3,1 mil casos nos últimos 10 anos, respectivamente (Ministério da Saúde, 2013).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai, sendo encontrada em todas as Unidades Federativas do Brasil (Ministério da Saúde, 2013). A LTA é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo a *L. (Viannia) braziliensis*, a *L. (V.) guyanensis* e a *L. (Leishmania) amazonensis* as mais frequentemente associadas à doença humana. Dados recentes da literatura mostram que no estado da Bahia os hábitos ocupacionais e domésticas de indivíduos envolvendo trabalho em fazendas e casas construídas em clareiras na floresta, aumentaram a exposição da população à infecção por *L. braziliensis* com registros de 7.093 de casos de LTA na região de 2007 a 2012, destes 6.747 (95%) foram casos de LC, 138 (2%) casos de LM e 208 casos (3%) casos de LD (Castelluci *et al.* 2014).

## **1.2. Métodos de controle da LTA**

Os métodos de controle da doença como a eliminação dos hospedeiros reservatórios e do vetor flebotomíneo são operacionalmente difíceis devido à natureza predominantemente silvestre de ambos, ou então por envolver canídeos de estimação. Atualmente, as medidas de controle são a detecção precoce da doença e seu tratamento por quimioterapia.

### **1.2.1. O tratamento**

A primeira escolha de tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde para qualquer forma de leishmaniose ainda se baseia nas séries de injeções intramusculares com antimoniais pentavalentes. Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (Ministério da Saúde, 2013).

Inicialmente, pode haver uma resposta ao antimonial, porém são frequentes as recidivas, sendo necessário reencaminhar o paciente para serviços de saúde. Por ser um tratamento doloroso e exigir a visita do paciente à unidade de saúde por vários dias, muitos pacientes abandonam o tratamento. Estes fatos juntamente com o surgimento de *Leishmania* resistente aos antimoniais como *L. tropica*, *L. donovani* e *L. braziliensis* colaboram para o insucesso terapêutico do tratamento (Schriefer *et al.* 2008). Além desses fatores negativos ao tratamento, os antimoniais (ex.: Glucantime®) são extremamente tóxicos para o fígado, rins e coração.

Em caso de não resposta, deve-se utilizar uma das drogas de segunda escolha (Ministério da Saúde, 2013). As drogas de segunda escolha que estão disponíveis no mercado são: Anfotericina B disponível como (desoxicolato sódico de anfotericina B e na formulação lipossomal) e a pentamidina. Entretanto, a anfotericina B também apresenta uma série de efeitos colaterais como, hipopotassemia, flebite no local da infusão, anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas, além do alto custo (anfotericina B lipossomal). Os efeitos colaterais mais observados no uso da pentamidina são: anorexia, astenia,

náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal, pancreatite e diabetes (Ministério da Saúde, 2013).

Neste contexto, é imprescindível a constante busca por novos fármacos para o tratamento da doença e também de uma vacina que possa induzir uma resposta protetora contra o protozoário. Uma vacina eficaz e acessível à população de risco seria uma alternativa mais eficiente e de melhor relação custo-benefício no controle da transmissão das leishmanioses (Pinto *et al.* 2011).

### **1.2.2. Vacinação contra as leishmanioses**

Apesar dos esforços despendidos nos últimos anos, até o momento ainda não se dispõe de nenhuma vacina aprovada para uso humano.

Na tentativa de controlar a leishmaniose, alguns países fizeram uso de um procedimento denominado leishmanização (Nagill *et al.* 2011). Este método envolve a inoculação de *Leishmania (L.) major* vivas no indivíduo, causando uma lesão similar a uma infecção natural, mas com a lesão localizada em um local pré-determinado evitando assim as lesões de face. Após a cura, os indivíduos estavam protegidos contra a infecção natural. Nestes países, este processo foi demonstrado ser a medida mais eficaz no controle da leishmaniose cutânea (Davoudi *et al.* 2014). Entretanto, este método foi interrompido devido a uma série de razões incluindo controle de qualidade, a persistência do parasita, o surgimento do HIV e razões éticas. Tais restrições fizeram com que seu uso fosse restrito a Uzbequistão e a ensaios de eficácia em humanos no Irã (Kedziersk *et al.* 2010, Nagill *et al.* 2011).

A ocorrência de uma resposta imune protetora, mesmo que parcial observada a partir da leishmanização e a cura espontânea em muitos pacientes com a forma cutânea, nos impulsionam a acreditar em uma vacina capaz de potencializar mecanismos imunes responsáveis pela proteção contra a leishmaniose.

Com inúmeros candidatos vacinais estudados, as vacinas são classificadas como vacinas de primeira, segunda e terceira geração.

As vacinas de primeira geração são compostas de parasitos mortos ou de um total de antígenos de parasitos lisados, preservando assim todo conteúdo antigênico do microrganismo.

Dentre as vacinas de primeira geração composta por lisado total de parasitos para uso em humanos, uma das mais estudadas é a vacina produzida no

Brasil pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink a partir da década de 70. Primeiramente esta vacina era composta por um *pool* de antígenos de cinco espécies de *Leishmania* diferentes (Mayrink *et al.* 1979), sendo mais tarde aprimorada com apenas antígenos de *L. amazonensis*, a vacina denominada Leishvacin<sup>®</sup> que se mostrou segura e imunogênica nos estudos de fase I e de fase II (Marzochi *et al.* 1998, De Luca *et al.* 1999). Porém, em um ensaio de eficácia realizado na Colômbia, não conferiu proteção em indivíduos expostos a infecção por *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Vélez *et al.* 2005).

As vacinas de segunda geração podem ser divididas de acordo com a sua composição em 4 categorias: subunidades definidas, frações brutas, *Leishmania* viva atenuada e vacinas vetorizadas.

Entre as vacinas com subunidades definidas destacam-se os estudos com o antígeno gp63, uma proteína conservada e abundante na superfície celular da *Leishmania* (Russo *et al.* 1991). Uma outra proteína bastante estudada é a proteína LACK de 36 kDa e 312 aminoácidos, que recebeu esse nome por apresentar homologia com as proteínas RACK (Receptores de Proteína Quinase C Ativada) de mamíferos. Ela é altamente conservada entre espécies de *Leishmania* e é expressa tanto na forma promastigota como na forma amastigota do parasito (Mougneau *et al.* 1995). A susceptibilidade murina à infecção com *L. major* foi correlacionada com a polarização de células Th2 parasito-específicas, sendo o LACK o principal responsável pela expansão dessas células, por ativar T CD4<sup>+</sup> que expressam TCR V4 $\alpha$ /V $\beta$ 8 produtores de IL-4 que se expandem rapidamente após a infecção (Launois *et al.* 1997). A proteína LACK, também denominada p36, foi capaz de conferir proteção contra *L. major* em camundongos BALB/c somente quando administrada com IL-12 (Gurunathan *et al.* 1997). Ainda entre as vacinais de subunidade está a proteína A2, um antígeno presente na forma amastigota de *Leishmania*, que está comercializada como vacina canina denominada Leish-Tec<sup>®</sup> pela Hertape Calier (Fernandes *et al.* 2008) e que recentemente apresentou capacidade de induzir imunidade protetora em primatas não humanos (Grimaldi *et al.* 2014)

Entre as frações brutas, o FML, ligante de fucose e manose de *L. donovani* é dito como protetor na LV, levando à redução da carga parasitária e de sinais clínicos da doença em cães (Borja-Cabrera *et al.* 2010) e está atualmente sendo comercializada, com o nome de Leishmune<sup>®</sup> pela FortDodge para aplicação veterinária contra LV.

Dentre as vacinas de segunda geração feitas com parasitos vivos geneticamente atenuados estão a *Leishmania major* knock-out para a diidroredutase-timidilato sintase (DHFR-TS) que induz proteção em camundongos, mas não em primatas (Veras *et al.* 1999; Amaral *et al.* 2002), *L. mexicana* knock-outs para os genes *cpa* e *cpb* de cisteino proteases que conferiram proteção em camundongos e hamsters contra a infecção com *L. mexicana* (Alexander *et al.* 1998, Saravia *et al.* 2006), ou ainda a vacinação fotodinâmica com *L. amazonensis* transfectadas com genes suicidas induzíveis (Kumari *et al.* 2009). Apesar de bastante interessantes em termos de proteção, os parasitos geneticamente modificados vivos constituem riscos imprevisíveis para serem usados em humanos.

Podemos destacar também as vacinas vetorizadas, que consiste na utilização de vírus ou bactérias recombinantes como vetores vivos, expressando antígenos do parasito. A imunização com organismos vivos sabidamente induz uma resposta celular mais intensa e eficiente do que a induzida por antígenos mortos e porificados, o que é uma característica significativa quando se busca uma vacina contra um parasito intracelular. Entretanto, poucos antígenos de *Leishmania* já foram clonados seguindo essa estratégia, alguns em bactérias como *BCG* (Connell *et al.*, 1993; Abdelhak *et al.*, 1995; Streit *et al.*, 2000) e *Salmonella* (Yang *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1995) e outros em alguns tipos virais (McMahon-Pratt *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 2008).

As vacinas de terceira geração são as chamadas vacinas de DNA, nos quais genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são inseridos em plasmídeos. Tais vacinas são capazes de induzir resposta imune humoral e celular e que podem ter uma modulação aumentada pela adição de citocinas e/ou Oligodeoxinucleotídeo (CpG ODN) (Gurunathan *et al.* 2000). As vacinas de DNA mais bem estudadas foram as previamente testadas como proteínas recombinantes (Nagill *et al.* 2011).

As vantagens das vacinas de DNA são a sua capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas a das proteínas selvagens, capacidade de gerar respostas humorais e celulares mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única (Costa Souza 2011).

Em termos de vacina de DNA, uma das vacinas mais estudada até agora contra LT e LV é a vacina contendo o gene que codifica a proteína LACK. A

imunização intramuscular de camundongos com LACK DNA induziu proteção parcial contra infecção por *L. major* em camundongos BALB/c (Gurunathan *et al.* 1997), mas não protegeu camundongos BALB/c contra infecção por *L. mexicana* (Dumonteil *et al.* 2003), *L. donovani* (Melby *et al.* 2001), *L. chagasi* (Marques-da-Silva *et al.* 2005) e *L. braziliensis* (Salay *et al.* 2007).

### **1.3. Imunização por via mucosa**

A despeito da parte imunológica a via parenteral não é a via usual de entrada da maioria dos patógenos contra os quais a vacinação é dirigida, uma vez que a maioria dos vírus e bactérias que causam doenças entra em contato com o corpo através de superfícies mucosas (Pinto *et al.* 2011, Fortuna *et al.* 2014).

A via de mucosa se apresenta como uma opção bastante atraente, uma vez que estudos recentes mostraram que antígenos administrados por esta via podem induzir uma resposta imune a nível sistêmico ou suprimir respostas imunológicas indesejáveis como ocorre em doenças auto-imunes e alérgicas (Winkler *et al.* 2002, Neutra and Kozlowski, 2006). Além disso, as vacinas de mucosa, diferentemente das injetáveis, não requerem esterilização rigorosa em seu preparo, o que reduz seu custo, e por ser um método não invasivo, sua administração é mais viável e facilita a adesão pela população, o que facilitaria uma campanha de vacinação de ampla cobertura (Pinto *et al.* 2004, Chen and Cerutti, 2010).

As mucosas têm associado a elas um sistema imunológico grande e complexo, anatômica e funcionalmente distinto daqueles encontrados em outras regiões do corpo, bem como mecanismos imunes efetores especializados, como a produção local de IgA secretória que pode induzir mecanismos reguladores promovendo uma hiporreatividade de mucosa, de forma semelhante ao observado por células Treg a nível sistêmico (Pinto *et al.* 2011, Chen and Cerutti 2010).

A via intranasal fornece um eficiente meio de imunização, por ser de fácil acesso, possuir alta vascularização e numerosas microvilosidades recobrando o epitélio, o que gera uma grande superfície de absorção. Ela pode induzir respostas imunes locais e sistêmicas, pode ser utilizada para imunização de grandes grupos populacionais além de requerer menor quantidade de material, diminuindo os custos da vacinação. Além disso, não requer agulhas e seringas (que são fontes potenciais de infecção e requerem pessoal especializado), é uma via não invasiva e garante

uma maior estabilidade do Ag administrado, uma vez que a degradação é menor do que pela via oral.

A captação de antígenos por via nasal pode resultar em tolerância periférica, no entanto, dados da literatura relatam que é capaz de gerar uma imunidade sistêmica através da administração de antígenos através da mucosa (Bakke *et al.* 2001) e o equilíbrio entre tolerância e imunidade é uma função da natureza, da dose, da forma do antígeno (solúvel ou particulado), do sítio de administração e da associação com adjuvantes (Makala *et al.* 2004).

Nos estudos anteriores de utilização de vacinas por via de mucosa contra leishmaniose utilizando o modelo murino, foi demonstrado que enquanto o antígeno bruto (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis* – LaAg), quando administrado por via parenteral (subcutânea ou intramuscular), promoveu agravamento da lesão pós infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003 e Pinheiro *et al.* 2005), quando este mesmo candidato vacinal foi administrado pelas vias de mucosa oral e nasal, foi demonstrada de forma inédita a eficácia do uso de vias não injetáveis na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003 e 2004).

Adicionalmente, foi demonstrado que a imunização intranasal com o DNA plasmidial codificando o antígeno LACK (LACK DNA) também protege camundongos contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2004) e por *L. infantum* (Gomes *et al.* 2007). Tal proteção foi observada em animais desafiados tanto com 7 dias quanto com 3 meses após a imunização (De Oliveira Gomes *et al.* 2012), o que reforça o potencial da mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação contra a leishmaniose.

Entretanto, a via de mucosa vem sendo utilizada em poucas doenças como estratégia vacinal, tendo seu maior uso nas campanhas vacinais contra poliomielite, cólera, rotavirose e febre tifoide pela via oral e contra gripe pela via nasal (Chadwick *et al.* 2010). Mais recentemente, consideráveis avanços veem sendo realizados para o desenvolvimento e teste de novos adjuvantes e veículos de liberação como algumas cepas de *Lactobacillus* e vetores adenovirais, para serem utilizados por via nasal (Fortuna *et al.* 2014).

#### **1.4. Modelo experimental susceptível à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis***

O estudo da leishmaniose em modelo experimental é de extrema importância para o entendimento de sua imunopatogênese assim como para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (Ribeiro-Romão *et al.* 2013).

O modelo experimental mais utilizado para estudos de mecanismos imunopatogênicos e de imunoproteção das leishmanioses é o modelo murino, com grande foco para os estudos com *L. major* e *L. amazonensis*. As cepas de camundongos mais utilizadas são BALB/c e C57BL/6 que, respectivamente, preenchem padrões de suscetibilidade e resistência a *L. major*, tornando esse modelo útil para os estudos de progressão de controle da infecção. Na infecção com *L. amazonensis* não é visto esta polaridade, uma vez que na maioria das cepas de camundongos causa uma doença progressiva.

A maioria dos casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil e na América Latina é causada pela infecção com *L. braziliensis*, tornando esse parasito de maior importância epidemiológica. O estudo em modelo murino é limitado pela resistência conferida pela maioria das linhagens à infecção por parasitas do subgênero *Viannia*. A cepa de camundongo mais susceptível a infecção por *L. braziliensis* é o BALB/c, que desenvolve um quadro clínico frustrado e de resolução espontânea, não reproduzindo os aspectos mais característicos da LTA. As lesões neste modelo atingem o tamanho máximo em cerca de 4-6 semanas pós-infecção, o que dificulta estudos de acompanhamento em longo prazo em um protocolo vacinal (DeKrey *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2007).

Por outro lado, o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) tem sido considerado um modelo clássico nos estudos das leishmanioses, sendo utilizado principalmente para estudo da leishmaniose visceral (*Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum*). Além disso, o hamster vem se mostrando altamente susceptível a infecção por espécies do subgênero *Viannia* como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* reproduzindo a maioria dos aspectos encontrados na doença humana. Por apresentar um *background* genético *outbred* (não consanguíneos), mimetiza a população humana quanto à variabilidade genética.

Do ponto de vista clínico e patológico, a infecção em muito se assemelha ao observado na doença humana como a linfadenopatia, a metástase cutânea e a

capacidade de montar uma resposta protetora na reinfecção (Hommel, *et al.* 1995, Osorio *et al.* 1998).

No entanto, sua utilização como modelo experimental ainda é limitada devido à escassez de reagentes como, por exemplo, anticorpos específicos para citocinas e moléculas marcadoras de subpopulações celulares, importantes no estudo de resposta imune associada a doença ou a proteção (Oliveira *et al.* 2004, De Oliveira Gomes *et al.* 2011, Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

Estudos de nosso grupo demonstraram que estes animais reproduzem a infecção em diferentes experimentos quando inoculados com a mesma cepa de *L. braziliensis*. O curso da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster apresenta evolução lenta de curso crônico, o que permite um acompanhamento adequado dos estudos de candidatos vacinais e de novos fármacos (Gomes-Silva *et al.* 2013, Ribeiro-Romão *et al.* 2013).

Do ponto de vista imunológico a resposta humoral na leishmaniose tegumentar em hamsters com espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* é caracterizada pelo aumento nos níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*, apresentando correlação positiva com o tamanho da lesão e conseqüentemente, com a gravidade da doença (Mendonça SC *et al.* 1988, Osorio *et al.* 2003, Gomes-Silva *et al.* 2013, Ribeiro-Romão *et al.* 2013).

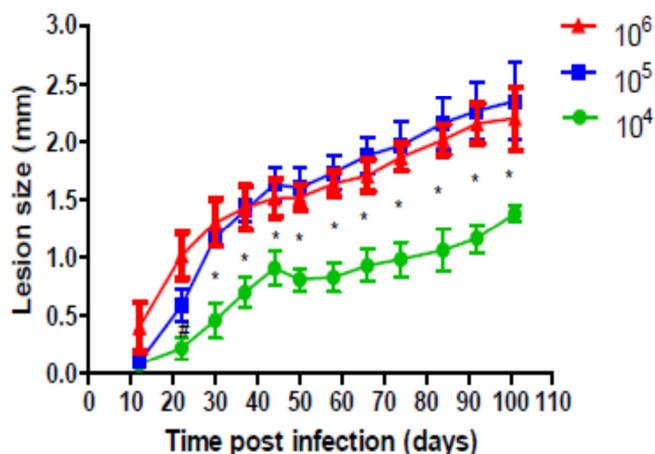
Com o auxílio da biologia molecular foi possível observar que no modelo hamster infectado com *L. donovani*, existe uma resposta mista do tipo 2 e do tipo 1. Os animais evoluem para uma doença progressiva com incapacidade de controlar a replicação dos parasitos, e um aumento na expressão de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 (Melby *et al.* 1998). Em hamsters infectados com *L. braziliensis*, a alta expressão de IFN- $\gamma$  concomitante com a presença de parasitos, tanto no linfonodo drenante quanto na lesão de pele, reforça a teoria da ineficiência da resposta efetora dos macrófagos na morte dos parasitos (Ribeiro-Romão *et al.* 2013). A progressão da doença foi atribuída à diminuição da atividade biológica do IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos, provavelmente devido à presença de uma cauda adicional de aminoácidos no IFN- $\gamma$  destes animais na região C-terminal da proteína, que pode estar relacionado com uma ligação ineficiente com o receptor de IFN- $\gamma$  nas células-alvo. Essa deficiência poderia ser compensada pelo aumento da expressão desta citocina, o que justificaria o aumento de produção associado com o aumento de lesão (Melby *et al.* 1998).

Recentemente foi demonstrado que o baixo nível de expressão de mRNA de iNOS em hamster é similar ao observado em macrófagos humanos, corroborando que este animal pode ser um excelente modelo experimental para o estudo de agentes patogênicos intracelulares que afetam os seres humanos (Perez *et al.* 2006, Saldarriaga *et al.* 2012).

No modelo de leishmaniose visceral em hamsters infectados com *L. donovani*, a diminuição na produção de óxido nítrico (NO) pode ser mediada pela produção de arginase. Isto porque a arginase compete pelo mesmo substrato necessário para a síntese de NO, a L-arginina. Sendo assim, com o aumento de síntese de arginase, é esperada uma diminuição da síntese de NO. Além do mais, durante a síntese de arginase, ocorre o aumento de poliaminas, que também favorece o crescimento dos parasitos (Osorio *et al.* 2012).

Assim, com o objetivo de estabelecer o hamster dourado como modelo no estudo de imunopatogênese e imunoproteção contra infecção por *L. braziliensis*, como ponto de partida, nosso grupo buscou a definição do melhor inóculo a ser utilizado. Para isto, os animais foram infectados com os inóculos de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* (Fig.1.1) e foi definido que o inóculo mais apropriado para o estudo de eficácia protetora de candidatos vacinais no modelo hamster é de  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária. O inóculo de  $1 \times 10^4$  levou a um curso mais benigno da doença, com período pré patente mais longo e evolução mais lenta, sendo considerado ideal para estudos de imunopatogênese. Em contrapartida, apesar dos inóculos de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  terem apresentado cursos clínicos semelhantes, o inóculo de  $1 \times 10^6$ , comparado ao de  $1 \times 10^5$ , levou a uma doença mais exacerbada, com um maior comprometimento sistêmico e visceralização do parasito para o baço, fato não observado na infecção humana (Ribeiro-Romão *et al.* 2013).

A amplitude das abordagens imunológicas no modelo hamster é reduzida pela pouca disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos. Assim, para o estudo das alterações imunológicas no modelo hamster foi analisado o perfil de imunoglobulinas por ELISA e a expressão de mRNA para citocinas por PCR em tempo real.



**Figura 1.1. – Influência do inóculo no curso da lesão de hamster infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Hamsters dourados (n=5 por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  promastigotas de *Leishmania braziliensis* na pata. A espessura da pata foi acompanhada pelo tempo indicado. Gráfico representa quatro experimentos independentes. Média e erro padrão \*  $p < 0,05$  comparando o grupo que recebeu  $1 \times 10^4$  com os grupos que receberam  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ .

### 1.5. Sistema imune de mucosa no modelo hamster

A imunização através da via nasal tem sido cada vez mais explorada ao longo dos últimos anos. A cavidade nasal é rica em tecido linfóide associado ao nariz (NALT, em inglês). Este é visto como um excelente tecido para a captação e transporte de partículas de antígenos. Para tanto, em indivíduos imunocompetentes, NALT contém muitas células, tais como as células M, células T, células B, células dendríticas e macrófagos, que medeiam a indução da resposta imune na mucosa aos antígenos inalados (Fortuna *et al.* 2014).

Conforme encontrado em outros locais indutores da resposta imune de mucosas, um folículo associado ao epitélio (FAE) especializado contendo células M é encontrado no NALT (Giannasca *et al.* 1997). As células M servem como porta de entrada para antígenos e tem a capacidade de gerar a transcitose do material antigênico para os folículos linfóides adjacentes, facilitando a distribuição para células apresentadoras de antígeno, incluindo as células dendríticas e macrófagos. Estas células são então direcionadas para os gânglios linfáticos locais ou regionais para a ativação e estimulação das células T. (Chadwick *et al.* 2010).

O sistema imune associado ao trato respiratório superior e inferior é composto pela NALT e aos brônquios (BALT, em inglês), linfonodos drenantes (linfonodos cervicais), epitélio respiratório e logo abaixo, um tecido conjuntivo contendo células imunes (Davis *et al.* 2001). As células efetoras do sistema imune que são produzidas em resposta a antígenos e patógenos presentes nos tecidos linfóides das mucosas adquirem um programa específico de circulação que as orientam a retornar aos sítios de mucosas. Após ativação no NALT, os linfócitos diminuem sua expressão de L-selectina (molécula de adesão que proporciona interação com o endotélio das vênulas nos linfonodos periféricos) e aumentam a expressão de  $\alpha_4\beta_7$ , integrina cujo ligante MadCAM-1 é expresso pelos vasos sanguíneos das mucosas (Hamann *et al.*, 1994). Como o MadCAM-1 é expresso nos vasos de todas as mucosas, pode-se explicar o conceito de sistema imune comum das mucosas em que linfócitos primados em uma mucosa irão circular para outras mucosas.

Assim, o NALT encontrado em ratos, camundongos, hamsters, e primatas não humanos, é composto de agregados linfóides emparelhados na porção caudoventral de passagem nasal direita e esquerda. Nestes roedores, NALT é considerado o equivalente às amígdalas nasorofaríngeas encontrados em humanos e algumas outras espécies, não sendo observadas diferenças significativas no NALT comparando diferentes espécies, exceto em primatas não humanos, onde o NALT é mais extenso do que em roedores (Cesta, 2006).

## **2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

Este projeto visa o desenvolvimento de uma vacina não-injetável contra uma doença negligenciada e endêmica no Brasil, a leishmaniose. Como a maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção por espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*), principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas, nosso grupo tem estudado nos últimos anos as alterações clínicas e imunopatogênicas durante a evolução da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), no sentido de se estabelecer parâmetros laboratoriais que permitam utilizar este modelo para o estudo de patogênese e de proteção vacinal na leishmaniose tegumentar americana. Além disso, o desenvolvimento de estratégias vacinais inovadoras (candidatos vacinais e vias de vacinação) pode contribuir para a definição de uma formulação antigênica ativa na proteção contra leishmaniose que sirva para estudos subsequentes e avaliação de sua potencial aplicação clínica. Esperamos com este projeto contribuir para o desenvolvimento biotecnológico de uma vacina inovadora administrada pela via mucosa, mais especificamente a via intranasal, na indução de imunoproteção contra *L. (V.) braziliensis* no modelo hamster dourado.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral desse estudo é investigar a eficácia da vacina denominada LaAg (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis*) pela via intranasal contra a infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo hamster dourado.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Comparar a eficácia vacinal do antígeno LaAg por via intranasal e intramuscular em hamsters infectados por *L. braziliensis*, utilizando os seguintes parâmetros:

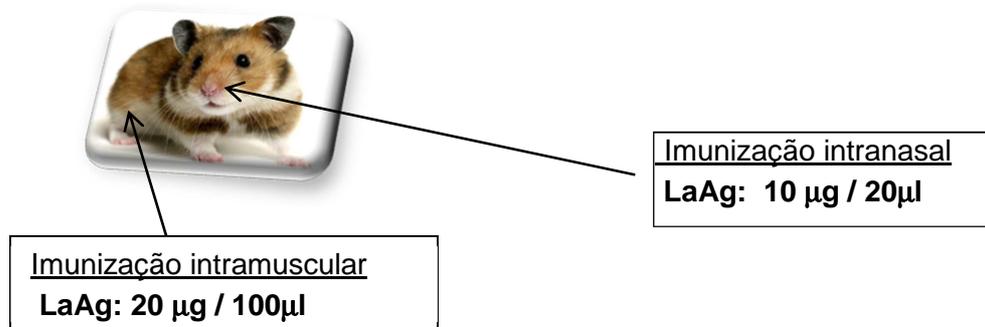
- a) acompanhamento clínico e morfométrico do desenvolvimento de lesões cutâneas ao longo de 110 dias após a infecção
- b) quantificação da carga parasitária na pata pela técnica de diluição limitante;

2. Investigar a resposta imune presente no final do acompanhamento da lesão (110 dias após a infecção) em hamsters vacinados com LaAg e infectados por *L. (V.) braziliensis* e a relação desta resposta com o desfecho da infecção, utilizando os seguintes parâmetros:

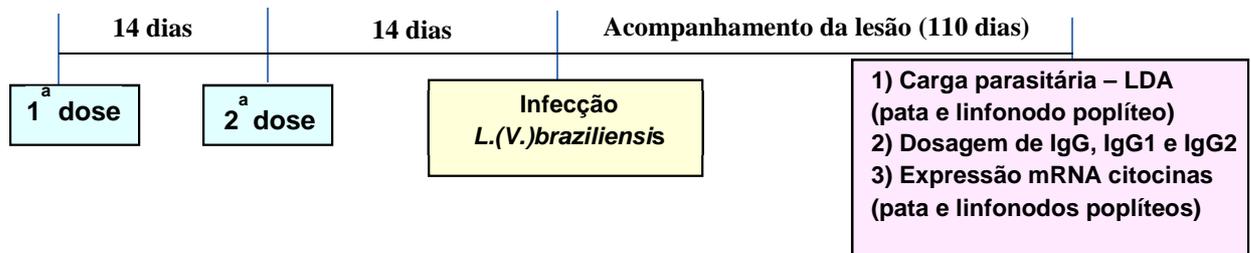
- a) análise da expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias na pata pela técnica de PCR em tempo real
- b) quantificação da produção de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 no plasma por ELISA.

#### 4. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA:

---



Avaliação da eficácia vacinal e da resposta imune 110 dias após a infecção



## **5. METODOLOGIA**

---

### **5.1. Animais**

Foram utilizados 72 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), divididos em 3 grupos com 18 – 27 cada, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – FIOCRUZ (RJ) e os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal, localizado no Pavilhão Carlos Chagas (FIOCRUZ RJ). Este estudo está inserido em um projeto com número de licença LW 11/11, aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-FIOCRUZ) em 18 de abril de 2011.

### **5.2. Parasitos**

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) foram cultivadas em meio Schneider acrescido de L-glutamina (1mM/ml), antibiótico (penicilina: 200u/mL; estreptomicina: 200µg/mL) e soro fetal bovino (10%) (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) em temperatura de 26°C até atingirem a fase estacionária de desenvolvimento, previamente determinada pela curva de crescimento.

### **5.3. Antígeno vacinal**

O antígeno LaAg foi preparado a partir de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, no início da fase estacionária de crescimento, como descrito por Pinto *et al.* (2003). Os parasitos foram lavados duas vezes em solução de tampão fosfato (PBS) por centrifugação (3000 rpm por 15 minutos a 20°C). Após contagem em câmara de Neubauer, o “pellet” de parasitos foi ressuspensão em PBS de modo a se obter  $2 \times 10^8$  promastigotas/mL em PBS e submetido a 15 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido com auxílio de um vórtex. Do lisado de parasitos obtido (LaAg), determinamos a concentração proteica pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### **5.4. Imunização e infecção**

Os hamsters foram imunizados por via intranasal com duas doses de 10µg de LaAg/20µL ou por via intramuscular com duas doses de 20µg de LaAg/100µL, com intervalo de quatorze dias entre as doses. O grupo controle recebeu apenas PBS. Os animais foram desafiados no dorso da pata posterior direita com  $1 \times 10^5$

promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por via intradérmica em volume final de 20µL, quatorze dias após a última imunização.

### **5.5. Avaliação da eficácia vacinal**

O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente através da medida do aumento do tamanho da pata infectada em relação à pata contra lateral, utilizando um medidor de espessura (Mitutoyo, Brasil). Para determinação da carga parasitária, 110 dias após a infecção os animais foram eutanasiados com a utilização dos agentes injetáveis cloridrato de quetamina (200mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal como medicação pré-anestésica, e o barbitúrico tiopental em sobredose anestésica (150mg/kg) por via intraperitoneal. Os fragmentos da pata direita e do linfonodo drenante foram retirados e macerados para a análise da carga parasitária pelo método de diluição limitante (adaptado de Silva *et al.*1994). Os fragmentos de pata infectada e linfonodo drenante foram macerados sobre tela de aço inoxidável estéreis de 64µm em placa de Petri em 1 mL de meio de cultura Schneider acrescido de L-glutamina (1mM/mL), antibiótico (penicilina: 200U/mL; estreptomicina: 200 µg/mL) (Sigma, EUA), 20% de SFB (Gibco, Brasil) e 2% de urina humana masculina filtrada estéril (Schneider completo), com auxílio de um êmbolo. E seguida, 20µL da suspensão de células foram diluídos em 180 µL de Schneider completo em placa de 96 poços (Thermo Scientific Nunc, Dinamarca) em quadruplicata. A partir do primeiro poço, foram feitas diluições seriadas (fator de diluição de 1:10). As placas foram então incubadas a 26°C em uma estufa BOD (Fanem, São Paulo, Brasil) e avaliados semanalmente quanto à presença de promastigotas por um período de 20 dias. Os resultados foram obtidos a partir da média dos últimos quatro poços onde parasitos viáveis foram observados, dividido pelo peso dos fragmentos e expresso em número de parasitas por grama de tecido.

### **5.6. Avaliação da resposta imune**

Após o acompanhamento das lesões(110 dias após a infecção), foram realizadas as seguintes avaliações:

### 5.6.1. Quantificação de RNAm de citocinas por PCR em tempo real

A avaliação de fatores associados à resposta imune celular foi feita com base na expressão gênica das seguintes moléculas e citocinas: IFN- $\gamma$  e IL-10 e os genes constitutivos GAPDH e  $\gamma$ -actina. Foi quantificada a expressão gênica destes produtos em fragmentos de tecidos da pata infectado. Nossa proposta foi padronizar a técnica de RT qPCR pelo intercalante de DNA Sybr Green<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster CA, EUA), que permite redução nos custos do ensaio por dispensar a utilização de sondas na reação, como o sistema TaqMan<sup>®</sup>. A extração do RNA total de fragmento de tecido foi realizada pelo Total RNA Extraction Kit [Mini] (Tissue) (Real Biotech Corporation) e de células em suspensão pelo RNeasy mini Kit (Qiagen, Austin, Texas, EUA), de acordo com as especificações dos fabricantes. Após o tratamento com o kit DNase (Promega Corporation, Madison WI, USA) e síntese de cDNA pelo kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), foi realizada a amplificação com os seguintes *primers* (Applied Biosystems):

Alvo	Sequência	Fonte
IFN gama	Fw- 5'-TGT TGC TCT GCC TCA CTC AGG-3'	Espitia <i>et al.</i> 2010
	Rv- 5'-AAG ACG AGG TCC CCT CCA TTC-3'	
IL-10	Fw- 5'-GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3'	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> 2014
	Rv- 5'-TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	
GAPDH	Fw- 5'-GTGGAGCCAAGAGGGTCATC-3' Rv- 5'-GGTTCACACCCATCACAAACAT-3'	
$\gamma$ Actina	Fw-5'-ACAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG-3' Rv- 5'-GCCTGAATGGCCACGTACA-3'	Espitia <i>et al.</i> 2010

As melhores condições do ensaio, como a temperatura de anelamento, a concentração de *primers* e de amostra necessários para a amplificação dos alvos foram estabelecidas. Foram realizadas curvas de eficiência dos *primers*, que variaram de 92,3% a 104,7%, e a validação do método  $\Delta\Delta$ CT comparando a eficiência dos *primers* dos genes alvos com os *primers* dos genes endógenos GAPDH e  $\gamma$ - actina.

### 5.6.2. Quantificação de imunoglobulinas anti-*Leishmania*

Os anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* presentes no plasma foram quantificados pelo método imuno enzimático. Para esta avaliação, foi empregado

antígeno solúvel de *L. braziliensis*, anticorpo conjugado anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA) de hamster marcado com peroxidase ou anti-IgG1 ou anti-IgG2 de hamster biotinilado (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) e streptoavidina-peroxidase; e o cromógeno solúvel OPD (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA).

### 5.6.3. Análise imunohistoquímica da pele infectada

Fragmentos da pele da pata infectada foram embebidos em O.C.T.(ornithine carbamyl transferase compound; Tissue Tek, Illinois, EUA) e armazenados em container de nitrogênio líquido (-196°C). Os tecidos congelados foram recortados na espessura de 4 a 5µm em criostato (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), na temperatura de aproximadamente -22°C. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro silanizadas (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA), e o material foi fixado com solução de formol tamponado Millionig 36%, metanol PA (Merck) e acetona PA (Merck) (2:19:19), após foi feito uma serie de três lavagens com TBS (Salina Tris tamponada) durante 10 minutos e após foram bloqueados com peróxido de hidrogênio 1% (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para eliminação da peroxidase endógena durante 10 minutos, seguidos de mais uma série de três lavagens com TBS durante 10 minutos e foram incubados com soro normal de cabra 1:20 (Dako, EUA) diluída em Tris-HCl 0,05 M com pH 7,6 durante 20 minutos para bloquear as ligações inespecíficas, sendo então incubadas com os anticorpos monoclonais primários: anti human IFN-γ e IL-10 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) overnight a 4°C. No dia seguinte foram feitas mais três lavagens com TBS durante 10 minutos sendo então incubados com um anticorpo secundário biotinilado anti mouse IgG (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) diluído 1:100 em Tris-HCl 0,05 M com pH 7,6 durante 30 minutos, seguido de uma incubação com estreptavidina-peroxidase diluído 1:100 em Tris-HCl 0,05 M com pH 7,6 durante 30 minutos, após esta etapa as lâminas novamente foram lavadas três vezes com TBS durante 10 minutos e foram incubadas com tampão acetato no pH 5,3 durante 5 minutos. Para a revelação da reação, foi utilizado o 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Sigma, EUA), que produz um precipitado de cor vermelha nas áreas marcadas, seguido de uma lavagem de 2 minutos em água corrente. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Meyer (Dako, EUA) e montadas com meio gelatina/glicerina e lamínula. Como controle negativo, omitimos o anticorpo primário da reação. Para a

obtenção dos resultados, a marcação pela imunohistoquímica foi avaliada por microscopia óptica. As imagens foram capturadas em câmera digital acoplada ao microscópio, em aumento de 100x.

### **5.7. Análise estatística**

Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Foi avaliada a significância em comparações simples entre dois grupos através do teste Mann-Whitney. Para comparações de múltiplos grupos foram feitas análise de variância (ANOVA) e análises de correlação foram avaliadas pelo teste Pearson. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de  $p \leq 0.05$ .

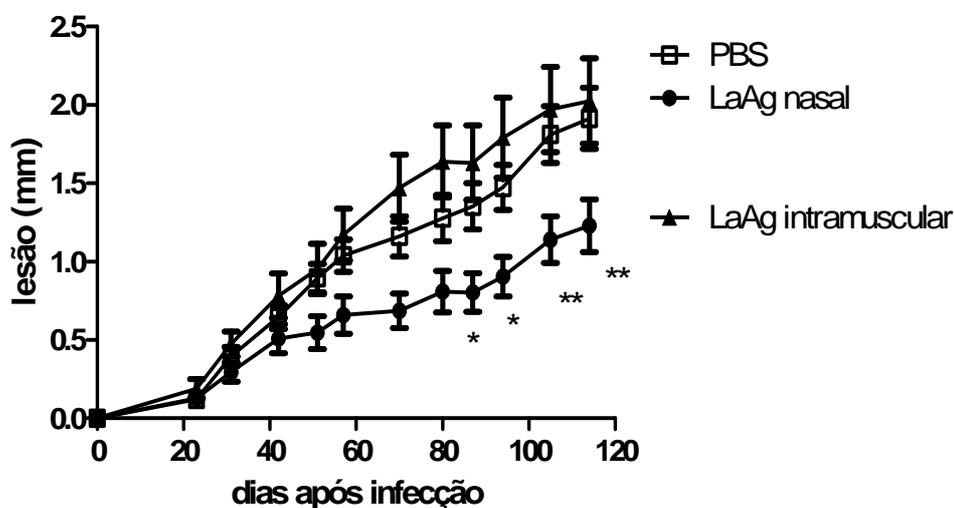
## 6. RESULTADOS

6.1. Comparação da eficácia protetora do candidato vacinal LaAg por via intranasal e intramuscular contra a infecção com *L. braziliensis* no modelo hamster

A partir dos resultados obtidos no modelo murino indicando que a imunidade protetora induzida pela vacina LaAg é criticamente dependente da via de imunização e com a definição do inóculo mais adequado de *L. braziliensis* no modelo hamster, a eficácia protetora do candidato vacinal LaAg pelas vias intranasal e intramuscular foi avaliada no modelo hamster.

A análise da morfometria semanal das patas evidenciou retardo significativo no crescimento das mesmas nos grupos imunizados com LaAg por via intranasal quando comparado com o grupo controle (PBS) e o grupo imunizado com LaAg intramuscular, de modo que no 50º dia após o desafio os hamsters imunizados com LaAg pela via intranasal apresentaram a espessura da pata reduzida quando comparados com os hamsters imunizados pela via intramuscular e os hamsters do grupo controle. A partir do 84º dia até o ponto final do experimento no 114º dia, a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 6.1A). Neste momento, a percentagem de animais que não apresentaram lesões ou apresentaram lesões nodulares com menos de 1 mm de espessura foi de 37,0% (10 dos 27 animais) no grupo LaAg intranasal, em comparação com 22% do grupo LaAg intramuscular (4 de 18 animais) e 19% do grupo PBS (5 dos 27 animais) (Fig. 6.1B). Além disso, apenas 26% (7 de 27) dos animais do grupo LaAg intranasal apresentaram lesões ulceradas superiores a 2 mm de espessura, em comparação com 61% do grupo LaAg intramuscular (11 dos 18 animais) e 55% do grupo PBS (15 dos 27 animais), (Fig. 6.1B).

A



B

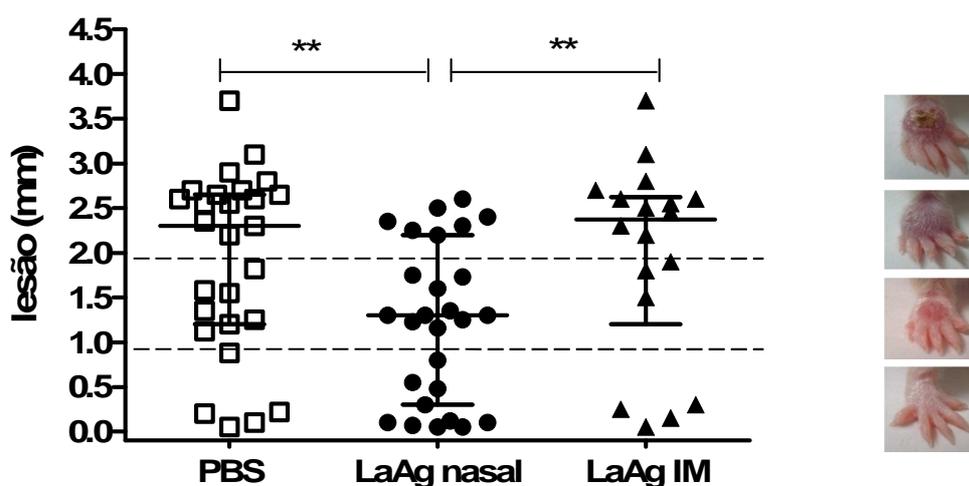
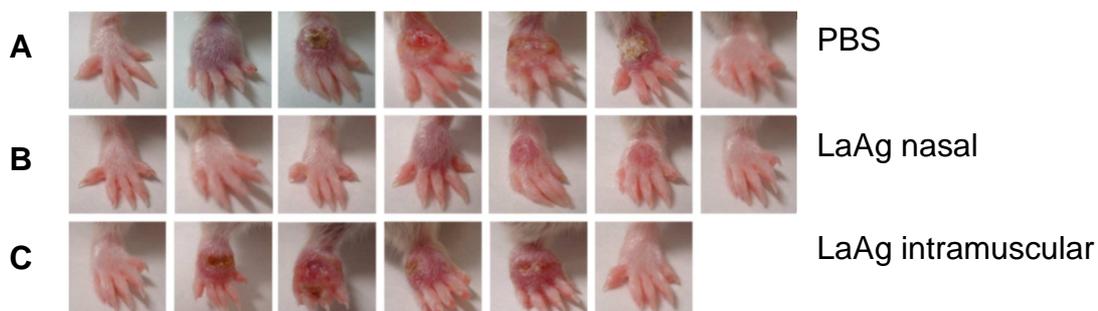


Figura 6.1. – Comparação da eficácia protetora do candidato vacinal LaAg por via intranasal e intramuscular contra a infecção com *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo hamster. A) Morfometria de pata de hamsters imunizados por via intranasal com 10  $\mu\text{g}$  LaAg ou por via intramuscular com 20 $\mu\text{g}$  LaAg e desafiados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*. O grupo controle recebeu PBS. B) Gráfico representa o tamanho da lesão da pata de cada animal dos 4 experimentos independentes no último dia de acompanhamento (114 dias), totalizando 18-27 animais por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Foto 6.1 – Imagem das patas infectadas. Cada imagem é representativa de um tamanho de lesão nos diferentes grupos.

Com o objetivo de comparar e ilustrar os aspectos clínicos das lesões dos grupos imunizados e não imunizados, foi feito um registro fotográfico das patas infectadas no dia da última medição (16<sup>ª</sup> semanas). O quadro abaixo representa o aspecto da lesão das patas de um experimento (Foto 6.2).



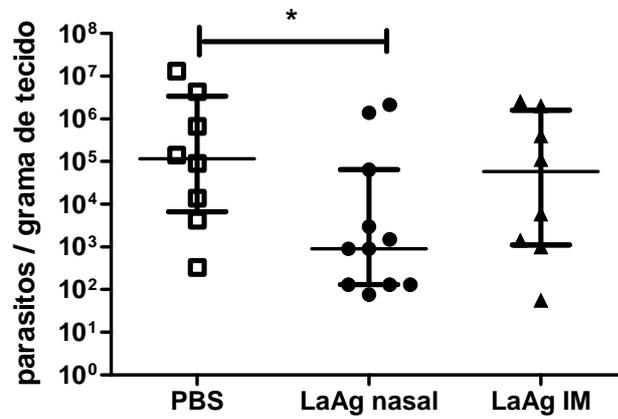
**Foto 6.2. - Avaliação macroscópica da lesão das patas de hamsters.** Após 110 dias de acompanhamento da infecção, foi feito um registro fotográfico do aspecto clínico das lesões, dos animais imunizados com: (A) PBS, (B) LaAg nasal 10µg/20µl, (C) LaAg intramuscular 20µg/100µl e desafiadas com  $1 \times 10^5$  *L. braziliensis* no dorso ventral da pata direita.

## 6.2. Quantificação da carga parasitária

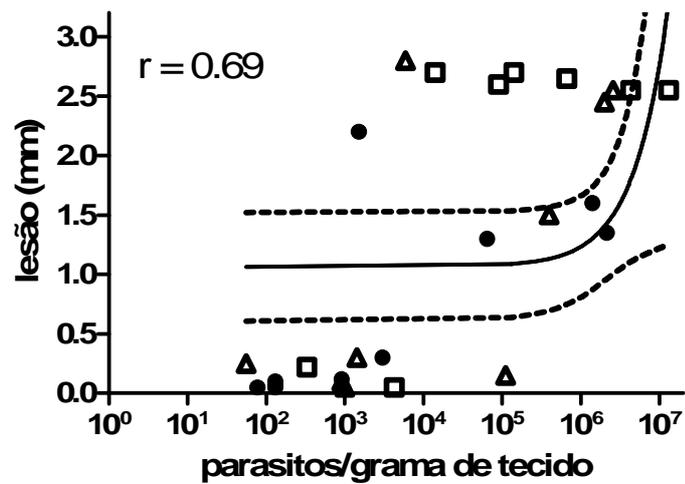
Para avaliar se a diminuição no crescimento da lesão observada na (Fig. 6.1A) foi um resultado da diminuição da carga parasitária, o número de parasitos nas lesões foi quantificado no final do experimento (114<sup>º</sup> dia).

Os animais imunizados pela via intranasal que foram considerados protegidos (sem lesão ou lesão nodular com espessura <1mm) apresentaram uma menor carga parasitária em comparação com o grupo controle PBS ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foi observada diferença significativa entre o grupo controle PBS e grupo imunizado com LaAg pela via intramuscular ( $p > 0,05$ ) (Fig. 6.2A). Ao analisar cada animal no final do experimento, foi observada uma correlação positiva entre a espessura da lesão da pata e a carga parasitária quando expressa como o número de parasitas / grama de tecido infectado ( $r = 0,70$ ,  $p < 0,0001$ ) (fig. 6.2B). Este resultado indica que, em contraste com a vacinação com LaAg intramuscular que não alterou os parâmetros parasitológicos, a vacinação com LaAg intranasal conduziu não só um menor crescimento da lesão, mas também um crescimento mais lento do parasito.

A



B



**Figura 6.2. Carga parasitária após imunização com LaAg desafio com *L. braziliensis*.**

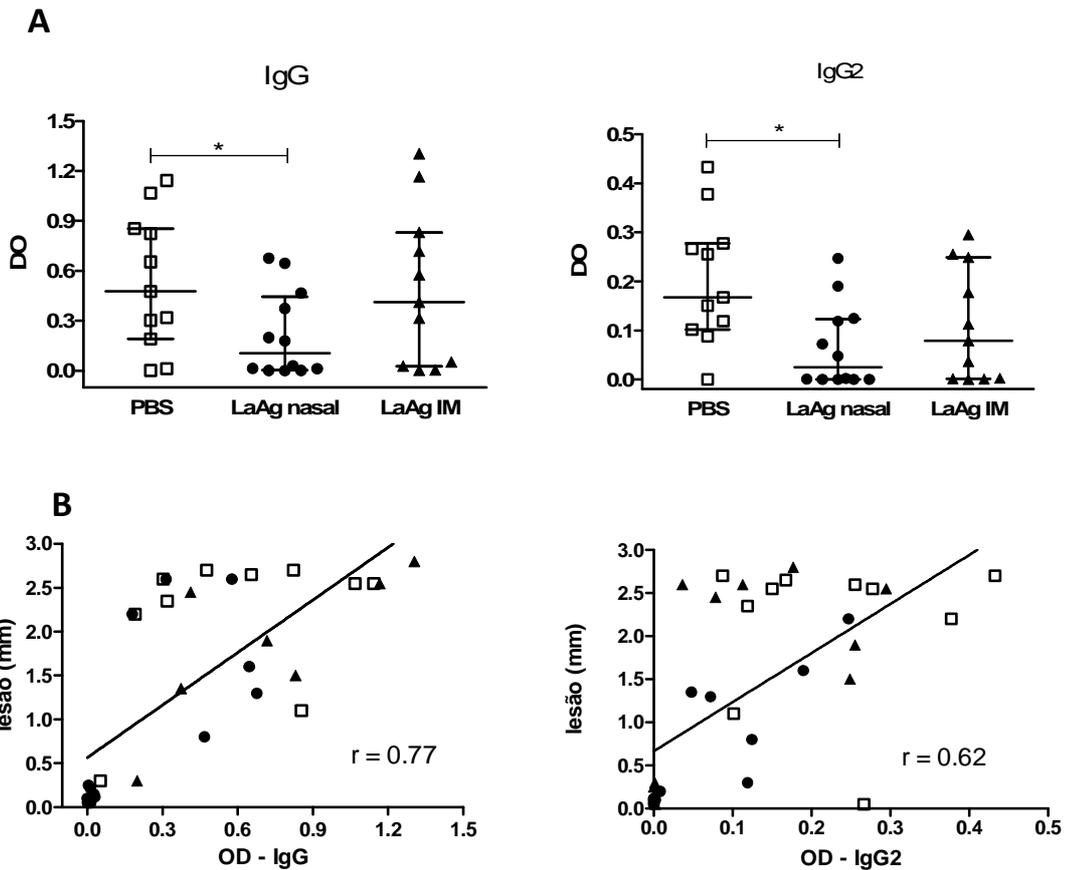
Hamsters (8-11 por grupo) foram imunizados por via intranasal com 10  $\mu$ g LaAg ou por via intramuscular com 20 $\mu$ g LaAg e desafiados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Controle recebeu PBS. A) A carga parasitária na pata foi determinada 114 dias após a infecção pelo método de diluição limitante. B) Correlação entre a carga parasitária na pata e o tamanho da lesão ( $r=0.70$ ,  $p<0.0001$ ). Os dados representam dois experimentos independentes. (PBS  $\Delta$ , LaAg nasal  $\bullet$ , LaAg IM  $\square$ ).

Estes resultados demonstraram, de forma inédita, a eficácia da via intranasal para a administração de antígenos brutos sem adjuvantes contra a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster. Foi observado também, comparando as vias de imunização intranasal e intramuscular, que a imunidade protetora induzida pela vacina LaAg é criticamente dependente da via de imunização, assim como observado anteriormente no modelo murino de infecção por *L. amazonensis*.

### 6.3. Avaliação da produção de Imunoglobulinas (IgG e IgG2)

Dados da literatura demonstraram que os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania spp* estão relacionados com a infecção progressiva no modelo hamster (Basu *et al.* 2005).

Os animais imunizados com LaAg por via intranasal que foram considerados protegidos, também apresentaram menores níveis de IgG e IgG2 anti-*Leishmania* em comparação com o grupo controle (PBS). Por outro lado, não foi observada diferença estatística entre o grupo controle e o grupo imunizado com LaAg por via intramuscular (Fig. 6.3A). Uma correlação positiva foi observada entre o tamanho da lesão da pata e o nível de IgG anti-*Leishmania spp* ( $r= 0.77$ ,  $p< 0.0001$ ) ou IgG2 ( $r= 0.62$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig.6.3B), indicando que os níveis de IgG e IgG2 estão relacionados à severidade da infecção. Não foi possível analisar a produção de IgG1 destes experimentos, uma vez que o anticorpo oferecido pela empresa (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), não funcionou no modelo hamster.

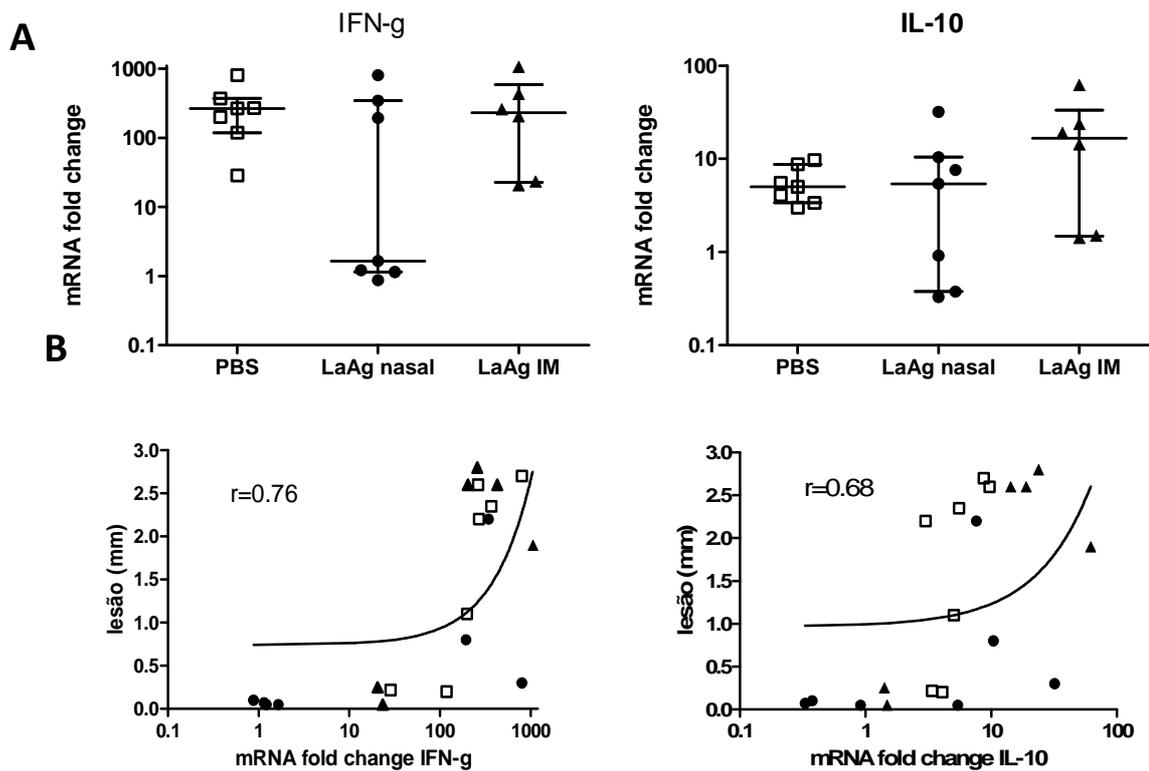


**Figura 6.3. Análise quantitativa dos níveis de Imunoglobulinas por ELISA.** Os animais foram imunizados com duas doses de LaAg pelas vias intramuscular ou intranasal (o grupo controle recebeu PBS pela via intranasal) e infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L.(v.) braziliensis*. Após 114 dias da infecção, os animais foram eutanasiados e foi coletado sangue para determinar os níveis de IgG e IgG2 no plasma. A) Densidade óptica dos níveis de IgG e IgG2 114 dias após a infecção. B) Correlação dos níveis de IgG e IgG2 com a espessura da lesão. Gráfico representa 2 experimentos independentes. (PBS □, LaAg nasal ●, LaAg IM ▲).

6.4. Avaliação da expressão de mRNA das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em fragmento da pata.

O IFN- $\gamma$  é uma citocina chave no controle da infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* devido à sua capacidade de ativar mecanismos microbicidas dos macrófagos. No entanto, altos níveis dessa citocina também estão relacionados ao dano tecidual em humanos na infecção com *L. braziliensis* (Carvalho *et al.* 2012). Até o momento a amplitude da abordagem imunológica no modelo hamster tem sido reduzida pela pouca disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos para hamster. Assim, como um dos objetivos do projeto é a avaliação de parâmetros imunológicos envolvidos na resposta imunoprotetora no modelo hamster, foi realizada a padronização e a quantificação de mRNA de citocinas por PCR em tempo real dos fragmentos de pata coletados.

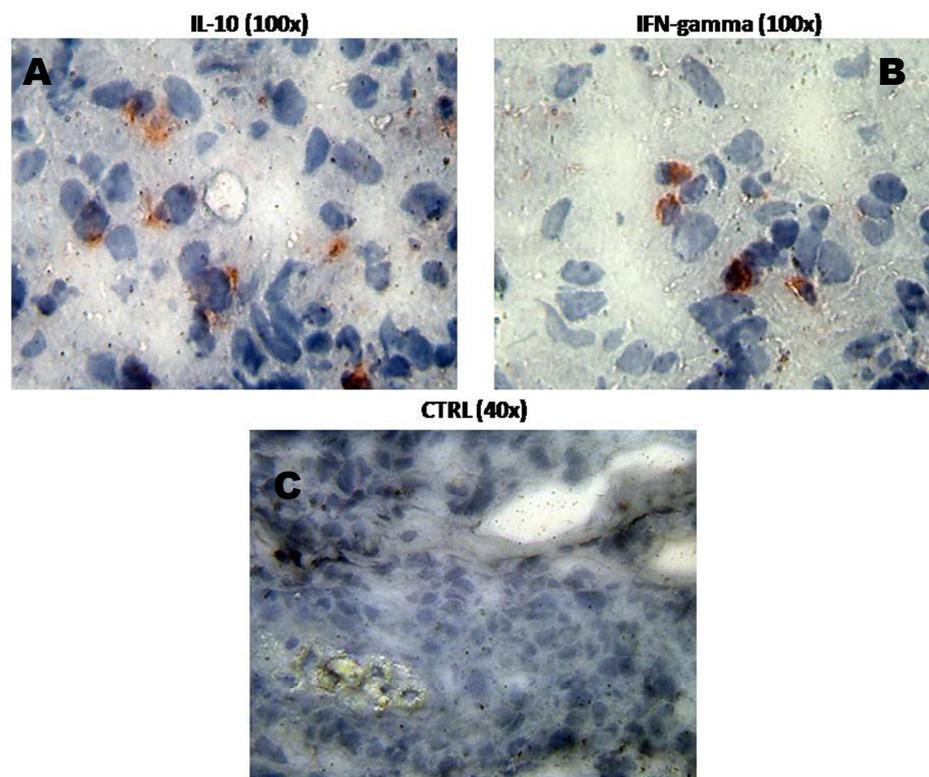
A expressão do mRNA de *IFN- $\gamma$*  e *IL-10* foi quantificada na lesão presente na pata infectada dos hamsters por PCR em tempo real e os resultados foram expressos como “*fold increase*” em relação a pele da pata de hamsters não infectados. O grupo imunizado com LaAg por via intranasal apresentou uma dualidade na expressão de *IFN- $\gamma$* : os quatro animais com as menores lesões na pata apresentaram uma expressão gênica similar a uma pele normal (“*fold increase*” próximo a 1 enquanto que os três animais que não foram protegidos apresentaram níveis de expressão de mRNA de *IFN- $\gamma$*  na pata comparáveis aos animais do grupo controle infectado (PBS) e do grupo imunizado com LaAg por via intramuscular (Fig. 6.4A). Uma correlação positiva foi observada entre o tamanho da lesão na pata e a expressão de mRNA de *IFN- $\gamma$*  na lesão ( $r= 0.76$ ,  $p< 0.0001$ ) (Fig. 6.4B). A expressão de mRNA de IL-10 foi similar entre os grupos. Curiosamente, três animais do grupo LaAg nasal que apresentaram as menores lesões também mostraram baixa expressão de mRNA de IL-10 (Fig. 6.4A).



**Figura 6.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA de citocinas por PCR em tempo real.** A) Análise da expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  e IL-10 na pata infectada comparando os grupos imunizados com o grupo controle. B) Gráfico de correlação entre a espessura da lesão com 114 dias após a infecção e a expressão mRNA de IFN- $\gamma$  e IL-10 na pata correspondente. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes.

**6.5.** Padronização da técnica de imunohistoquímica para análise da pele infectada de hamster.

Recentemente, foram publicados alguns trabalhos que utilizam anticorpos específicos contra citocinas de camundongos ou de humanos em tecido de hamsters (Pacheco-Yépez *et al.*, 2011; Paciello *et al.*, 2010). A partir destes resultados e buscando ampliar a abordagem imunológica no modelo hamster, está em fase de padronização a técnica de imunohistoquímica com resultados preliminares utilizando anticorpos anti-humano para as citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  (R&D System) (Fig. 6.5).



**Figura 6.5.** Fotos representativas das marcações por imunohistoquímica. Detecção de citocinas (A) IL-10, (B) IFN- $\gamma$  e (C) controle negativo com omissão do anticorpo primário em lesões na pata de hamster infectado por *L. (V.) braziliensis*.

## 7. DISCUSSÃO

---

No estudo apresentado nessa dissertação foi avaliada a eficácia da imunização nasal com antígenos brutos de *L. amazonensis* contra a infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo hamster dourado e a resposta imune no final do acompanhamento da infecção.

A maioria dos estudos com o objetivo de desenvolver uma vacina eficaz contra a infecção por *Leishmania* foi realizado no modelo experimental murino de LC, causada principalmente por *L. major* ou *L. amazonensis*. Entretanto, o principal agente causador da LC e da LM no Novo Mundo, a *L. braziliensis*, tem sido largamente negligenciado no contexto do desenvolvimento de vacinas. Este fato pode ser explicado pela falta de um modelo experimental que reproduza os aspectos patológicos e a resposta imunológica observada na doença humana. Os camundongos mais susceptíveis a infecção com *L. braziliensis* apresentam pequenas lesões com um quadro clínico frustrado e de resolução espontânea, não reproduzindo os aspectos mais característicos da LTA em humanos (DeKrey et al., 1998; Rocha et al., 2007).

De forma diferente, observamos durante o curso da infecção que o modelo hamster apresenta características individuais (animal *outbred*), mostrando diferentes resultados clínicos da doença, reproduzindo muitos dos aspectos clínicos e a resposta imunológica observada na doença humana. Estes aspectos patológicos observados corroboram o que foi descrito recentemente na literatura (Gomes-Silva et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2013). Contudo, poucos são os trabalhos que abordam a infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster, em grande parte devido à falta de insumos imunológicos e moleculares disponíveis para o modelo, que auxiliariam na elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção (Zivcec et al. 2011, Ribeiro-Romão et al. 2013).

A intensa busca por um antígeno capaz de gerar uma imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania* tem gerado alguns resultados satisfatórios, porém, as vacinas licenciadas estão restritas ao uso veterinário contra a LV canina. Na busca de uma vacina contra a LC, a vacina com antígenos brutos de *Leishmania amazonensis* (Leishvacin®), foi aprovada nos testes clínicos de segurança e imunogenicidade (fase 1 e fase 2) em voluntários humanos após administração parenteral (Marzochi et al. 1998, De Luca et al. 1999). Entretanto, no teste de

eficácia (fase 3) não protegeu indivíduos contra a infecção com espécies do subgênero *Viannia* (Vélez *et al.* 2005).

Vários estudos anteriores demonstraram que a imunidade protetora induzida por antígenos totais de *Leishmania* no modelo camundongo é criticamente dependente da via de imunização, para tanto está bem estabelecido que camundongos BALB/c podem ser protegidos contra uma infecção fatal com *L. major* pela imunização intravenosa com parasitas irradiados (Howard *et al.*, 1984) ou mortos pelo calor (Howard *et al.*, 1982). Por outro lado, a imunização subcutânea e intramuscular com antígeno bruto (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis* – LaAg) promove agravamento da infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003 e Pinheiro *et al.* 2005). Estes achados estão também de acordo com estudos em primatas, em que macacos rhesus (*Macaca mulatta*) vacinados subcutaneamente com Ag de *L. amazonensis* (equivalente ao LaAg) antes da infecção, desenvolveram uma lesão cutânea muito mais exacerbada que os controles não vacinados (Kenney *et al.* 1999). Estes resultados indicam que promastigotas de *L. amazonensis* mortos contêm antígenos indutores de doença e levantam o questionamento sobre a possibilidade da vacina composta de promastigotas de *L. amazonensis* (Leishvacin®) administrada por via subcutânea ou intramuscular testada há vários anos em humanos poder potencializar a infecção em indivíduos mais susceptíveis. Por outro lado, resultados anteriores no modelo murino demonstraram que quando este mesmo candidato vacinal (LaAg) foi administrado pelas vias de mucosa oral e nasal, foi demonstrada de forma inédita a eficácia do uso de vias não injetáveis na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003 e 2004).

No presente trabalho, nossos resultados demonstraram pela primeira vez, a eficácia da administração de LaAg (um análogo da Leishvacin®) pela via intranasal contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* no modelo hamster dourado. Comparando as vias de imunização IN e IM, podemos observar que a imunidade protetora induzida por LaAg é criticamente dependente da via de imunização, uma vez que nos animais imunizados com LaAg IN observamos um retardo no desenvolvimento da lesão, com uma menor carga parasitaria, quando comparado ao grupo controle, diferentemente do que ocorreu no grupo LaAg IM. Este resultado corrobora o que já foi descrito anteriormente no modelo murino de infecção com *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003, Pinto *et al.* 2004 e Pinheiro *et al.* 2005).

A presença de antígenos particulados na LaAg pode explicar a falta da necessidade do uso de adjuvantes, o que é extremamente vantajoso, visto que não há nenhum adjuvante de mucosa aprovado para uso humano (Fujihashi *et al.* 2002). Foi interessante observar que no presente trabalho a indução de proteção cruzada pela vacina LaAg, anteriormente descrita contra *L. major* (Pinto *et al.* 2003), foi estendida a outra espécie de *Leishmania* (*L. braziliensis*) sugerindo um amplo espectro de aplicação.

Dados da literatura descrevem a importância do perfil de produção de classes e subclasses de imunoglobulinas anti-*Leishmania* durante a doença ativa e após a cura da LTA em humanos (Gomes-Silva *et al.* 2008, Castellano *et al.* 2009). Na LTA humana há uma concentração de anticorpos específicos aos antígenos de *Leishmania* proporcional à carga parasitária e ao tempo de exposição ao estímulo antigênico (Gomes-Silva 2011).

As imunoglobulinas podem ter um papel importante na infecção por *Leishmania*, uma vez que a IgG ligada ao parasito pode induzir a produção de IL-10 através dos macrófagos, assim como de outros tipos celulares que, através de um *feedback* negativo, inibe a resposta imune ao parasito desativando macrófagos, diminuindo diretamente a expressão de iNOS e assim diminuindo o óxido nítrico, o qual é necessário para a eliminação do parasito (Buxbaum, 2013). Conforme demonstrado na figura 6.3, observamos uma correlação positiva comparando os altos níveis de IgG total assim como de IgG2 anti-*Leishmania* com a gravidade da doença. Além disso, o grupo de animais que apresentaram menor lesão (LaAg IN) teve uma diminuição nos níveis de IgG total e IgG2 anti-*Leishmania*. Este resultado reforça o que já foi descrito na literatura no modelo hamster de infecção por *L. panamensis* e *L. braziliensis*, onde altos níveis de IgG total foram associados a tamanho e gravidade da lesão (Osorio *et al.* 2003, Gomes-Silva *et al.* 2013, Ribeiro-Romão *et al.* 2013).

Um bom prognóstico na LC é observado quando há um direcionamento para a resposta imune do tipo Th1, com ativação de macrófagos através de citocinas inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF. No entanto, uma resposta Th1 exacerbada tem sido associada ao dano tecidual com alta presença de IFN- $\gamma$  na infecção com *L. braziliensis*, assim como TNF (Antonelli *et al.* 2005, Gomes-Silva *et al.* 2007).

A resposta imunológica no modelo hamster é pouco conhecida. Entretanto, com o auxílio da biologia molecular Melby e colaboradores (1998), observaram a

expressão de citocinas de hamster infectados com *Leishmania (L.) donovani* a partir de sequências de DNA complementar (cDNA) baseadas em sequências homólogas de rato e camundongo, identificando um perfil de resposta mista com alta expressão gênica de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  configurando uma resposta Th1, assim como a expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  ligados a uma resposta Th2 (Melby *et al.* 1998). Apesar de ter verificado uma resposta Th1 com alta expressão de IFN- $\gamma$ , não foi observado o controle parasitário nesses animais.

No presente estudo, através da técnica de RT PCR, observamos que, na fase final de acompanhamento da lesão, 114 dias após a infecção, os animais que apresentaram maiores lesões foram aqueles com os níveis mais elevados de expressão de IFN- $\gamma$  nas patas infectadas. Estes resultados sugerem que neste modelo experimental, a expressão do gene de IFN- $\gamma$  pode estar ligada a um papel desta citocina como mediadora na imunopatologia na fase tardia da infecção. A alta expressão de IFN- $\gamma$  associado ao dano tecidual observado neste trabalho fortalece o que já foi descrito anteriormente no modelo hamster de infecção por *L. panamensis*, e *L. braziliensis* (Osorio *et al.* 2003, Espitia *et al.* 2010, Ribeiro-Romão *et al.* 2013). Entretanto, uma avaliação da resposta imune do hospedeiro nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania* pode esclarecer alguns mecanismos de sobrevivência do patógeno, assim como os estímulos necessários na obtenção de uma resposta imune capaz de conter a replicação do parasito (Gomes-Silva 2011).

Uma carga parasitária alta na fase final de acompanhamento da infecção no modelo de LV, vem sendo descrita como uma baixa capacidade na produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com *L. donovani* no modelo hamster (Osorio *et al.* 2012). Uma vez que o substrato para a formação de NO, a L. arginina, é o mesmo substrato usado pela arginase, há uma competição por esse substrato que tem como resultado a produção diminuída de NO. Além disso, há uma baixa expressão de mRNA de iNOS, similar ao que é observado em macrófagos humanos (Perez *et al.* 2006, Saldarriaga *et al.* 2012, Osorio *et al.* 2012).

Por outro lado, Moreira e colaboradores (2008), através da técnica de imunohistoquímica verificaram no modelo hamster, um aumento da área marcada com presença de óxido nítrico após a sensibilização com a vacina Leishmune<sup>®</sup> no modelo hamster após 96 e 168 horas de acompanhamento.

Outro fator importante no controle da leishmaniose é a presença de células T CD8<sup>+</sup>, que apresentam uma função efetora produzindo IFN- $\gamma$  e ativando macrófagos

aumentando seu papel leishmanicida (Novais *et al.* 2013). Entretanto, dados anteriores de infecção pela *L. braziliensis* em humanos, mostraram uma correlação positiva entre gravidade das lesões e os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, sugerindo que estas citocinas contribuem para o dano tecidual (Antonelli *et al.*, 2005). Recentemente foi demonstrado que em humanos infectados com *L. braziliensis*, há um aumento da frequência de células T CD8<sup>+</sup> granzima B<sup>+</sup> na derme, assim como na epiderme, conduzindo uma lesão na camada basal contribuindo para a formação de úlceras, atribuindo a essas células um importante papel na patogênese da LC (Dantas *et al.* 2013).

Os resultados obtidos em nosso estudo nos mostram alguns eventos que podem estar envolvidos no controle parasitário, uma vez que observamos que os animais do grupo LaAg IN apresentaram menores lesões, também apresentaram uma baixa carga parasitária correlacionado com a menor expressão de mRNA de IFN- $\gamma$ , assim como níveis mais baixos de IgG e IgG2. Estes resultados indicam que o controle da infecção no modelo hamster não é dependente apenas da ação do IFN- $\gamma$  ativando macrófagos.

Os níveis elevados de expressão de IFN- $\gamma$  na pele da pata na fase final de acompanhamento podem estar relacionados com um aumento da resposta imune na tentativa de controlar a carga parasitária no local da infecção. Acreditamos que no momento inicial da infecção a modulação de uma resposta imune protetora é fundamental para o desfecho final de um candidato vacinal, conforme observado por outros autores (Hoft and Eickhoff 2002).

Em resumo, este estudo demonstrou a possibilidade do uso da via de mucosa para a liberação efetiva de antígenos brutos contra infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster. A demonstração da eficácia do antígeno LaAg administrado por via nasal neste modelo experimental, corroborando resultados anteriores no modelo murino, pode abrir novas fronteiras para a vacinação não invasiva contra a leishmaniose humana.

## **8. CONCLUSÃO**

---

Estes resultados demonstraram, de forma inédita, a eficácia da via intranasal para a administração de antígenos brutos sem adjuvantes contra a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster. Foi observado também, comparando as vias de imunização nasal e intramuscular, que a imunidade protetora induzida pela vacina LaAg é criticamente dependente da via de imunização, assim como observado anteriormente no modelo murino de infecção por *L. amazonensis*.

Como os ensaios de imunização/desafio em animais experimentais são considerados etapa inicial no desenvolvimento de vacinas, a continuidade no estudo visando o estabelecimento do hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) como modelo no estudo de imunoproteção contra infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e os resultados iniciais obtidos no projeto demonstrando a eficácia protetora induzida pelo protótipo vacinal LaAg irão proporcionar importantes avanços na triagem e identificação de antígenos indutores de uma resposta imune efetiva e duradoura, o que resultaria em benefícios incalculáveis para as populações em risco de contrair leishmaniose tegumentar americana

## 9. REFERÊNCIAS

---

- Abdelhak S, Louzir H, Timm J, Blel L, Benlasfar Z, Lagranderie M, Gheorghiu M, Dellagi K, Gicquel B. 1995. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology*. 141 (7):1585-92.
- Aga E, Katschinski D, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. 2002. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 169(2):898-905.
- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J.Immunol* 161:6794-6801.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WLC 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671.
- Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, et al. 2002. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97:1041–8.
- Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T. and Roy, S. 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and –resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 174(11):7160-7171.
- Bakke H, Lie K, Haugen IL, Korsvold GE, Høiby EA, et al. 2001. Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. *Infect. Immun*. 69: 5010–5015
- Borja-Cabrera GP, Santos FN, Santos FB, Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, Castro T, Nogueira FS, Moreira MA, Luvizotto MC, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB 2010. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine

versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 28:597-603.

Buxbaum LU 2013. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2224.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 4:3:301.

Castellucci LC, Almeida LF, Jamieson SE, Fakiola M, Carvalho EM, Blackwell JM 2014. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:279-288.

Cesta MF 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 34:599-608.

Chadwick S, Kriegel C, Amiji M 2010. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev* 62:394-407.

Chen K, Cerutti A 2010. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity* 33:479-491.

Connell ND<sup>1</sup>, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG.1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*24:11473-7.

Costa Souza BL. Vacina intranasal LACK DNA contra a leishmaniose cutânea: Estudos de duração da eficácia, associação vacinal e aprimoramento por micro/nanoestruturação em polímero mucoadesivo. Tese: Biofísica (Imunobiologia). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ/RJ. 2011.

Cunningham A. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 72:132-41.

Dantas ML, Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, Carvalho E, Arruda S 2013. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 46:728-734.

Davis, SS. 2001. Nasal vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 51: 21-42.

- Davoudi N, Khamesipour A, Mahboudi F, McMaster WR 2014. A dual drug sensitive *L. major* induces protection without lesion in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2785.
- De Luca PM. Vacinas nas Leishmanioses. In: Conceição-Silva F e Alves CA (Orgs). *Leishmaniose do Continente Americano*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2014. p. 465 – 489.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça SC 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17:1179-1185.
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73:5827-5834.
- De Oliveira Gomes DC, DA Silva Costa Souza BL, DE Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2011. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitology* 138:1892-1897.
- De Oliveira Gomes DC, Schwedersky RP, Barbosa De-Melo LD, Da Silva Costa Souza BL, De Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2012. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 139:1562-1569.
- DeKrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66:827-829.
- Doroud D, Zahedifard F, Vatanara A, Taslimi Y, Vahabpour R, Torkashvand F, Vaziri B, Rouholamini Najafabadi A, Rafati S 2011. C-terminal domain deletion enhances the protective activity of cpa/cpb loaded solid lipid nanoparticles against *Leishmania major* in BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1236.
- Dumonteil E.; Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario GM 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 21: 2170-2177.
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, de Freitas E, Melo MN, et al. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania)*

- chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*; 26 (46):5888–95.
- Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR 2014. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2914.
- Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcão A 2014. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: Small-molecules and biomacromolecules. *Eur J Pharm Biopharm.* 87:409-432
- Giannasca PJ, Boden JA, Monath TP 1997. Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. *Infect Immun* 65:4288-4298.
- Gomes DC, Pinto EF, de Melo LD, Lima WP, Larraga V, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2007. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25:2168-2172.
- Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Clin Exp Immunol* 149:440-444.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Júnior S, Ferreira MS 2008. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:135-141.
- Gomes-Silva A. Ativação de linfócitos remanescentes na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: reflexões sobre prognóstico, critérios de cura e imunoprofilaxia na leishmaniose tegumentar Americana. Tese: Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ 2011.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão R.P., Plácido-Pereira R.M., Da-Cruz A.M. 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140:771–779.
- Goto H, Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:419-433.
- Grimaldi G, Teva A, Porrozzi R, Pinto MA, Marchevsky RS, Rocha MG, Dutra MS, Bruña-Romero O, Fernandes AP, Gazzinelli RT 2014. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 8:2853.

- Gurunathan S; Sacks DL; Brown DR; Reiner SL; Charest H; Glaichenhaus N; Seder RA. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine* 186:1137-1147.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Reviews Immunolgy* 18:927-974.
- Hamann, A, Andrew, DP, Jablonskiwestrich, D, Holzmann, B. & Butcher, EC. 1994. Role of alpha (4)-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in-vivo. *J. Immunol.* 152: 3282-3293.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol* 89:55-73.
- Howard, JG. Nicklin, S. Hale, C. & Liew, FY. 1982. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. I - Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J. Immunol.*, **129**: 2206-12.
- Howard, JG. Liew, FY. Hale, C. & Nicklin, S. 1984. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II - further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. *J. Immunol.*, **132**: 450-5.
- Hoft DF, Eickhoff CS 2002. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 70:6715-6725.
- Kedzierski L 2010. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2:177-185.
- Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. 1999. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 163(8):4481-4488.
- Kumari S, Samant M, Khare P, Misra P, Dutta S, Kolli BK. 2009. Photodynamic vaccination of hamsters with inducible suicidal mutants of *Leishmania amazonensis* elicits immunity against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*; 39(1):178–91.
- Launois P, Maillard I, Pingel S, Swirhart KG, Xenarius I, Achaorbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA. 1997. IL4 rapidly produced by V

- beta 4 V alpha 8 CD4 (+) T cells instructs the development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, 6: 541-549
- Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56:1-11.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H 2004. Immunology - Antigen-presenting cells in the gut. *J. Biomed. Sci.* 11:130-141
- Marques-da-Silva EA, Coelho EA; Gomes DC; Vilela MC; Masioli CZ; Tavares CA; Fernandes AP; Afonso LC; Rezende AS. 2005. Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research*; 98(1):67–74.
- Marzochi KB, Marzochi MA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:205-212.
- McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez J R, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez J F, Lohman K L, Ruddle N H 1993. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun.* 61(8): 3351–3359.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.
- Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J 2001. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*69(8): 4719-4725.

- Mendonça SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG 1988. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 83(3): 347-355.
- Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde; Departamento De Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília:Ministério da Saúde. 2013; 2: 77.
- Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília:Ministério da Saúde. 2013; 1: 19.
- Moreira MD, Cinética da Migração Celular Intradérmica em Hamsters Sensibilizados com Diferentes Constituintes Antigênicos de duas Vacinas Contra Leishmaniose Visceral Canina. Dissertação. Ciências Biológicas UFOP/ MG. 2008.
- Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268:563-566.
- Nagill R, Kaur S 2011. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *Int Immunopharmacol* 11:1464-1488.
- Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6:148-158.
- Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 9:e1003504.
- Oliveira CI TM, Gomes R, Barral A, Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 1:81-86.
- Osorio Y, Gonzalez SJ, Gama VL, Travi BL. 1998. Reinfection in American cutaneous leishmaniasis: evaluation of clinical outcomes in the hamster model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(3):353-356.
- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC 2012. Progressive Visceral Leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host Arginase 1 expression. *PloS Pathog* 8: 1-17.

- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol* 25:139-148.
- Perez LE, Chandrasekar B, Saldarriaga OA, Zhao W, Arteaga LT, Travi BL, Melby PC 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176:5519-5528.
- Pinheiro RO, Pinto EF, de Matos Guedes HL, Filho OA, de Mattos KA, Saraiva EM, de Mendonça SC, Rossi-Bergmann B 2007. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine* 25:2716-2722.
- Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B 2005. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 7:1317-1323.
- Pinto EF, De Mello Cortezia M, Rossi-Bergmann B 2003. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 21:3534-3541.
- Pinto, EF; Matta, NE; Cruz, AM 2011. Vacinas: progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis. *Acta Biologica Colombiana*. 16:197-212.
- Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B 2004. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infect Immun* 72:4521-4527.
- Ramos I, Alonso A, Marcen J.M, Peris A, Castillo J.A, Colmenares M, Larraga V 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26(3) 333-344.
- Rey L 2008. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 883 pp.
- Ribeiro-Romão RP. Influência do inóculo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Experimental no modelo Golden

- Hamster (*Mesocricetus auratus*). Tese: Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ 2013.
- Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun* 75:3823-3832.
- Russo DM; Burns JM; Carvalho EM; Armitage RJ; Grabstein KH; Button LL; McMaster WR; Reed SG. 1991. Human T-cell responses to gp63, a surface-antigen of leishmania. *J Immunol* 147:3575-3580.
- Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, et al. 2007 Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin. Vac Immunol.* 14 : 1173-1181.
- Saldarriaga OA, Travi BL, Choudhury GG, Melby PC 2012. Identification of hamster inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter sequences that influence basal and inducible iNOS expression. *J Leukoc Biol* 92:205-218.
- Saravia NG, Escorcía B, Osorio Y, Valderrama L, Brooks D, Arteaga L, Coombs G, Mottram J, Travi BL 2006. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine* 24:4247-4259
- Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 21:483-488.
- Silva EM<sup>1</sup>, Bertho AL, Mendonça SC. 1994. Effect of in vivo depletion of CD4+T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* 56:111-120.
- Solbach W, Laskay T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol.* 74:275-317.
- Soong L, Henard CA, Melby PC. 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 34:735-751.
- Stockdale L, Newton R. 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2278.

- Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, Wilson ME. 2000. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol.*(94):33-41.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting Edge. 2004. Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173 (11):6521-25.
- Vélez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, Zicker F, Modabber F. 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 99(8):593-598.
- Veras P, Brodskyn C, Balestieri F, Freitas L, Ramos A, Queiroz A, et al.1999. A dhfr-ts *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:491–6
- Winkler, B.; Baier, K.; Wagner, S.; Repa, A.; Eichler, HG.; Scheiner, O.; Kraft, D. & Wiedermann, U. 2002. Mucosal tolerance as therapy of type I allergy: intranasal application of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy*; **32**: 30-36.
- World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <[www.who.int/leishmaniasis/en](http://www.who.int/leishmaniasis/en)>. Acesso em 10 de julho de 2014.
- Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY. 1995. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunology*; (85)1-7.
- Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY. 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol.* (7):2281-5.

## 10. Anexo

---

Artigo publicado:

**DA-SILVA-COUTO L**; RIBEIRO-ROMÃO RP; SAAVEDRA AF; SOUZA BLSC; MOREIRA OC; GOMES-SILVA A; ROSSI-BERGMANN B; Da-CRUZ AM; **PINTO EF (2015)**. Intranasal vaccination with leishmanial antigens protects golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. PLoS Neglected Tropical Diseases 9:e3439.

# Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection

Luzinei da Silva-Couto<sup>1</sup>, Raquel Peralva Ribeiro-Romão<sup>1</sup>, Andrea Franco Saavedra<sup>1</sup>, Beatriz Lilian da Silva Costa Souza<sup>2</sup>, Otacílio Cruz Moreira<sup>3</sup>, Adriano Gomes-Silva<sup>1</sup>, Bartira Rossi-Bergmann<sup>2</sup>, Alda Maria Da-Cruz<sup>1</sup>, Eduardo Fonseca Pinto<sup>1\*</sup>

1 Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas - Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, 2 Laboratório de Imunofarmacologia - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, 3 Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas - Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

**Background:** Previous results have shown that oral and intranasal administration of particulate *Leishmania (Leishmania) amazonensis* antigens (LaAg) partially protects mice against *L. amazonensis* infection. However, vaccination studies on species of the subgenus *Viannia*, the main causative agent of cutaneous and mucosal leishmaniasis in the Americas, have been hampered by the lack of easy-to-handle bio-models that accurately mimic the human disease. Recently, we demonstrated that the golden hamster is an appropriate model for studying the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (Viannia) braziliensis*. Using the golden hamster model, our current study investigated whether the protective effect of intranasal immunisation with LaAg can be extended to *L. braziliensis* infection.

**Methodology/Principal Findings:** Golden hamsters vaccinated with either two intranasal (IN) doses of LaAg (10 mg) or two intramuscular doses of LaAg (20 mg) were challenged 2 weeks post-vaccination with *L. braziliensis*. The results showed that IN immunisation with LaAg significantly reduced lesion growth and parasitic load as well as serum IgG and IgG2 levels. At the experimental endpoint on day 114 post-infection, IN-immunised hamsters that were considered protected expressed IFN- $\gamma$  and IL10 mRNA levels that returned to uninfected skin levels. In contrast to the nasal route, intramuscular (IM) immunisation failed to provide protection.

**Conclusions/Significance:** These results demonstrate for the first time that the nasal route of immunisation can induce cross protection against *L. braziliensis* infection.

**Citation:** da Silva-Couto L, Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, da Silva Costa Souza BL, Moreira OC, et al. (2015) Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e3439. doi:10.1371/journal.pntd.0003439

**Editor:** David Joseph Diemert, The George Washington University Medical Center, United States of America

Received July 28, 2014; Accepted November 24, 2014; Published January 8, 2015

**Copyright:** © 2015 Silva-Couto et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was funded by Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz internal funds, by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)(grant numbers: APQ-1 - E26/111.797/2012, JCNE-26/103.111/2008) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)(grant number: Universal 14/2012 - MCTI/CNPq, 486604/2012-8). LdSC and AFS are masters sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), RPRR was PhD sponsored by CAPES and FAPERJ(Nota 10 Program), and AGS is a researcher sponsored by CNPq/Fundação Oswaldo Cruz (Research Visitor Program). AMDC is a CNPq and FAPERJ research fellow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* Email: eduardo@ioc.fiocruz.br

## Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease caused by intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania* spp, with a wide spectrum of clinical manifestations ranging from chronic cutaneous ulcers to fatal visceral disease. *L. (Viannia) braziliensis* is the most prevalent species associated with American tegumentary leishmaniasis (ATL), which constitutes a serious public health problem affecting 28,000 people annually in Brazil [1]. Despite the advent of new anti-leishmanial compounds [2], multiple injections of pentavalent antimonials, which invariably produce serious toxic side effects, still remain the first-line therapy for all forms of the disease. The problem is further aggravated by therapeutic failure along with the emergence of antimonial resistance [3].

The development of a vaccine against leishmaniasis is a longterm goal in both human and veterinary medicine. Intramuscular or intradermal injections with killed *L. (Leishmania) major* promastigotes in the absence of adjuvants in mice [4] [5] and with killed *L. amazonensis* promastigotes in mice [6] [7] and monkeys [8] actually exacerbated subsequent infections, suggesting that such formulations contain disease-inducing antigens.

Mucosal administration of disease-promoting antigens has been used as a feasible strategy to induce immunotolerance and protection against autoimmune and allergic diseases [9]. Peripheral

### Author Summary

Leishmaniasis is a disease that is common in most tropical countries. In Brazil, the cutaneous form of the disease is highly prevalent, with approximately 28,000 new cases reported annually. *L. (Viannia) braziliensis* is the main causative agent of cutaneous leishmaniasis; however, vaccine studies against protozoans of the subgenus *Viannia* have been largely neglected, mainly due to the high resistance of most mouse strains to the infection. Here, the authors used the golden hamster, which is highly

susceptible to dermatropic *Leishmania* spp infection. It was previously shown that oral and intranasal vaccination with whole *L. (Leishmania) amazonensis* antigens (LaAg) protected mice against *L. amazonensis* infection. In the present study, the authors investigated whether the protective effect of intranasal immunisation with LaAg can be extended to *L. braziliensis* infection using the golden hamster model. The results showed that intranasal immunisation with LaAg significantly reduced lesion growth and parasitic load as well as IgG and IgG2 serum levels. At the endpoint of the experiment, intranasally immunised hamsters that were considered protected expressed IFN- $\gamma$  and IL10 mRNA at levels similar to those in uninfected skin. These data show that the use of a proper animal model and/or different vaccination strategies may facilitate the development of an effective vaccine against *L. braziliensis*.

tolerance resulting from intestinal or nasal antigen uptake formed the basis of the present work using disease-promoting parasitic antigen. However, systemic immunity may also be achieved with antigens administered through the mucosa [10]. This balance between tolerance and immunity is determined by the nature of the antigen, antigen dosage, antigen form (i.e., soluble or particulate), the route of antigen administration and the presence of adjuvants [11].

We previously demonstrated that oral vaccination with whole *L. amazonensis* antigens (LaAg) confers different strains of mice with partial protection against cutaneous leishmaniasis (CL) caused either by *L. amazonensis*, or *L. major* [6]. Compared to the oral route, the intranasal administration of LaAg protected BALB/c mice against *L. amazonensis* infection more effectively, provided convenience in its ease of administration, and required lower antigen doses [12].

Several mouse models exist for modelling immunity against *Leishmania* spp. However, vaccine studies on protozoans of the subgenus *Viannia*, the main causative agent of cutaneous and the dreadful

mucosal leishmaniasis in the Americas, are hampered by the lack of viable bio-models that accurately reflect the human disease. In these mouse models, most inbred mouse strains (including C57BL/6 and BALB/c) are resistant to *L. braziliensis* infection, developing non-ulcerative lesions that spontaneously heal within 10 weeks [13], [14]. Vaccine studies attempting to induce immunological protection against *L. (Viannia)* parasites in mice using a variety of parasite antigens [15]–[17] have been conducted with limited success. Salay et al. [15] tested four different highly conserved leishmanial antigens (DNA and recombinant proteins) along with adjuvants and found that protective immunity previously afforded against experimental CL caused by *L. major* could not be reproduced against an *L. braziliensis* challenge. Therefore, the development of an effective vaccine against *L. braziliensis* infection necessitates a suitable animal model and/or different vaccination strategies.

The golden hamster (*Mesocricetus auratus*) is highly susceptible to dermatropic *Leishmania* spp infection and has been largely used as a model for visceral leishmaniasis [18]–[20]. Recently, we demonstrated that the golden hamster is also an appropriate model for studies on CL immunopathogenesis caused by *L. (V.) braziliensis* because it develops chronic skin lesions that clinically and histopathologically mirror those of humans. These features justify the use of the golden hamster model in clinical, vaccination and chemotherapy experimental protocols [21], [22].

Thus, in the present study, we proposed to evaluate the effectiveness of intranasal LaAg vaccination against *L. braziliensis* infection using the golden hamster as a model.

Materials and Methods

## Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br>). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (CEUA protocol LW 11/11).

## Animals

Seventy-two outbred adult female (6–8 weeks old, weighing 80– 90 grams) golden hamsters (*M. auratus*) from the animal facilities at FIOCRUZ, were used. Four independent experiments were performed.

## Parasites

*L. amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/75/Josefa) in early stationary growth phase were used for vaccine preparation. *L. braziliensis* promastigotes (MCAN/BR/98/R619) in stationary growth phase were cultured in supplemented Schneider's *Drosophila* medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and used until the third in vitro passages for infection. Disrupted antigens of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) promastigotes (Lb-Ag) were obtained for immunological studies.

## Vaccine – *L. amazonensis* antigen (LaAg)

LaAg was prepared as previously described (6). Briefly, *L. amazonensis* promastigotes were washed three times by centrifugation, resuspended at  $2.6 \times 10^8$  parasites/mL in phosphate-buffered saline (PBS) and submitted to 15 cycles of freezing and thawing. The resulting cell lysate was termed LaAg. One millilitre of LaAg contained 970 µg of protein, as measured by the Lowry assay [23]. Sample aliquots were stored at  $-220^\circ\text{C}$  until use.

## Immunisation

Hamsters held upwards either received nasal instillations of 10 mg of LaAg (IN LaAg) in 20 mL of PBS (10 mL in each nostril) (n=27 animals) using a fine tip attached to a micropipette, or receive two intramuscular injections of 20 mg of LaAg (IM LaAg) in 100 mL of PBS (n =18 animals) into the thighs. Animals were boosted fourteen days later using the same vaccine dosage. Controls received PBS (n =27 animals).

## Infection

Two weeks after the second vaccinating dose, the hamsters were infected intradermally with  $1610^5$  *L. braziliensis* promastigotes (section 2.2) in the dorsal hind paw. Lesion sizes were measured every 7 days with a dial caliper (Mitutoyo, America Corporation, Sa~o Paulo, Brazil) and expressed as the difference between the thickness of the infected and uninfected paws.

## Parasite loads

At the experimental endpoint, the animals were euthanised, and fragments of the infected paw were cut off, weighed and individually homogenised in 1 mL of PBS using a tissue grinder. Parasite load was then analysed by the limiting dilution assay [24].

## Quantification of anti-Leishmania spp antibodies

Anti-leishmanial IgG and IgG2 levels in plasma samples were determined by the ELISA assay, as described elsewhere (21). Plasma samples were diluted 1:5000 for IgG and 1:200 for IgG2 and detected by horseradish peroxidase-labelled goat anti-hamster IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) and biotin-conjugated mouse anti-Syrian hamster IgG2 (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

## Tissue cytokine mRNA expression by real time RT PCR

Skin of infected paws were collected in RNAlater (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and frozen at 220uC until use. Total RNA was extracted from 20–30 mg of tissue using an RNeasy kit (Qiagen, Austin, Texas, USA). RNA samples were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega Corporation, Madison WI, USA) and reverse transcribed using a High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For real-time qPCR (RT-qPCR) assays of target genes, duplicate wells each containing 2 mL of cDNA and 7.5 mL of TaqMan Universal PCR Mastermix were used in a final reaction volume of 15 mL and analysed with ABI Prism 7500 Fast RealTime PCR equipment (Applied Biosystems, USA). The sequences and concentrations of primers and probes for the hamster target genes (IFNG and IL10) as well as for the RT-qPCR cycling conditions used in this study have been previously described [25] Gene expression (Fold Change) was calculated by relative quantification using the comparative Ct method (DDCt), as described by Livak & Schmittgen [26], using the golden hamster GAPDH and c-actin genes as housekeeping controls. Subsequently, gene expression in infected animals was normalised to uninfected control, and the final results are expressed as  $2^{-DDCt}$  (fold change).

## Statistical analysis

The data were analysed by the Mann-Whitney test and Spearman's rank-correlation using GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean and median.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Results

## Intranasal, but not intramuscular, LaAg vaccination confers protection against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection

The capacity of IN LaAg to protect hamsters against *L. braziliensis* was first compared with the classical intramuscular route. At day 50 after parasite challenge, IN LaAg immunised hamsters already presented reduced paw thickness than that of IM-immunised hamsters or infected controls. From day 84 until the experimental endpoint on day 114, the difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1A). At this time, the

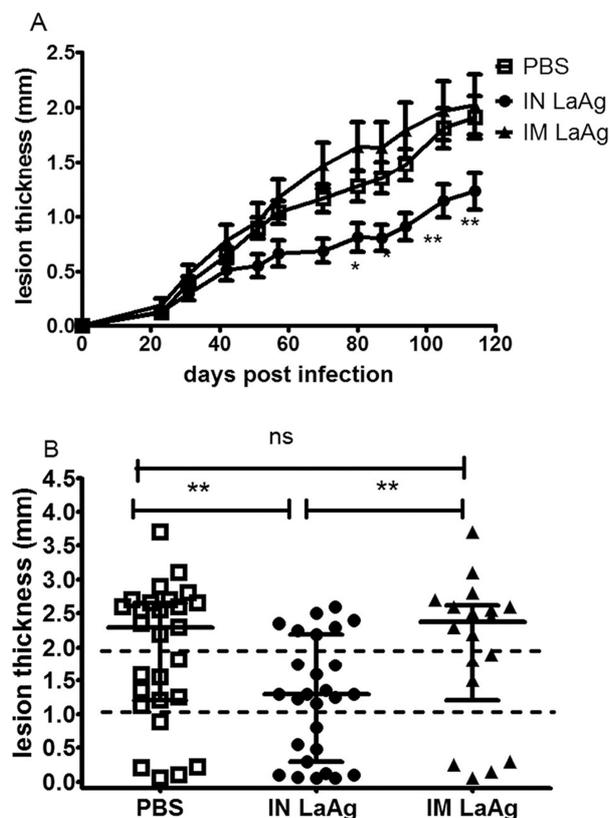


Fig. 1. Effectiveness of intranasal (IN) and intramuscular (IM) *L. amazonensis* antigens (LaAg) vaccination against subsequent infection with *L. braziliensis*. Golden hamsters (6–8 per group) were vaccinated

with either 10 mg of LaAg intranasally (N) or 20 mg of LaAg intramuscularly (m) followed by a booster vaccination 14 days later. Controls received PBS (%). Two weeks after the booster vaccination, animals were infected in the paw with  $1.6 \times 10^5$  *L. braziliensis*. (A) Lesion thickness was scored on the indicated days. Means  $\pm$  standard errors of the means (SEM), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (B) On day 114 post-infection, the lesion thickness of individual feet was shown as individual values, with the horizontal bars representing the median values. Data are from four independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0003439.g001

percentage of animals presenting no lesions or nodular lesions less than 1 mm thick was 37.0% (10 out of 27 animals) in the IN LaAg group, compared to 22% (LaAg IM= 4 out of 18 animals) and 19% (PBS control = 5 out of 27 animals) in the other two groups (Fig. 1B). Moreover, only 26% (7 out of 27) of animals from the IN LaAg group presented ulcerated lesions greater than 2 mm thick, compared to 61% (LaAg IM= 11 out of 18 animals) and 55% (PBS control = 15 out of 27 animals) in the other two groups (Fig. 1B). The development of lesions was similar between the IM LaAg and PBS control groups (Fig. 1A).

## Intranasal vaccination with LaAg decreases parasite loads

To assess whether the decreased lesion growth observed in Fig. 1 was a result of decreased parasite growth, the number of parasites in the lesions was quantitated at the end of the experiment (day 114). The IN-immunised animals that were considered protected (no lesion or nodular lesion with thickness  $\leq 1$  mm) also presented lower parasite loads compared to the PBS control group ( $p < 0.05$ ). However, no significant difference was observed between PBS controls and IM LaAg animals ( $p > 0.05$ ).

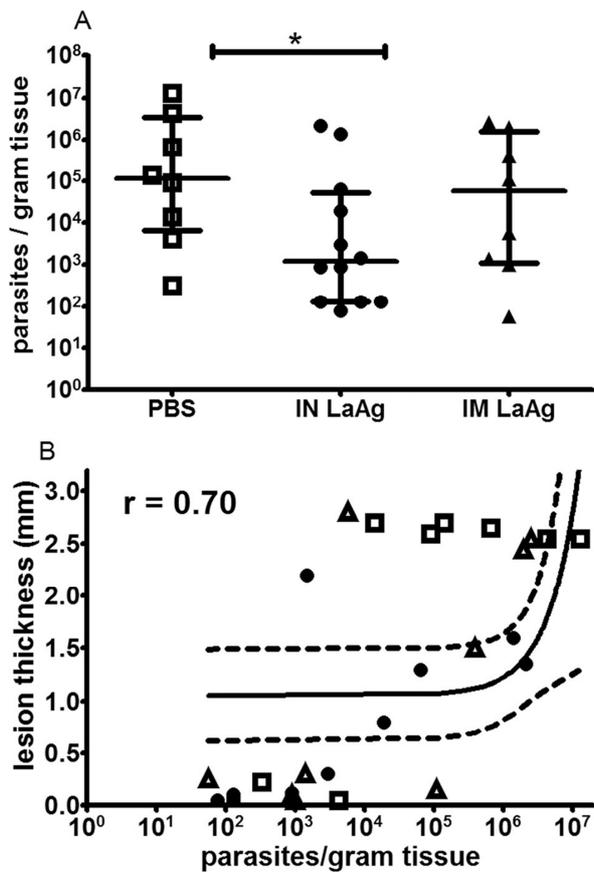


Fig. 2. Parasite loads from skin lesions of hamsters immunised with crude *L. amazonensis* antigens (LaAg) and infected with *L. braziliensis*. Golden hamsters (4–6 per group) were immunised with IN LaAg (N), IM LaAg (m), or received PBS (%). Two weeks after the last immunisation, hamsters were challenged with *L. braziliensis*. A) Paw skin parasite loads were determined 114 days post-infection via a limiting dilution assay. B) Correlation between skin parasite load and lesion thickness ( $r = 0.70$ ,  $p < 0.0001$ ). Each point represents one animal. The horizontal bars represent the median values, \*  $p < 0.05$ . Data are from two independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0003439.g002

(Fig. 2A). Plotting readings from individual animals, a positive correlation was observed between paw lesion thickness and parasite load when expressed as the number of parasites/gram of infected paw ( $r = 0.70$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2B). This finding indicates that in contrast to IM LaAg vaccination that did not alter the parasitological parameters, IN LaAg vaccination led not only to smaller lesion growth but also to lower parasite burden.

### Intranasal LaAg vaccination leads to decreased antileishmanial IgG and IgG2 levels

Parasite-specific antibodies are associated with progressive cutaneous and visceral leishmaniasis in hamster models [21], [27], [28]. The animals immunised with IN LaAg that were considered protected also presented lower levels of anti-*Leishmania* IgG and IgG2 compared to those of the control group (Fig. 3A). However, no significant difference was observed between the PBS control and IM LaAg groups. A positive correlation was observed between paw lesion size and anti-leishmanial IgG ( $r = 0.78$ ,  $p < 0.0001$ ) or IgG2 ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ), indicating that IgG and IgG2 levels are related to the severity of the infection (Fig. 3B) and are not induced when animals are IN vaccinated with LaAg.

0.0001) or IgG2 ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ), indicating that IgG and IgG2 levels are related to the severity of the infection (Fig. 3B) and are not induced when animals are IN vaccinated with LaAg.

### Intranasal vaccination with LaAg decreases IFN-c in

#### *Leishmania braziliensis*-infected skin

Due to its ability to activate macrophages to kill parasites, IFN-c is a key cytokine that controls *Leishmania* spp infection. However, high levels of this cytokine are also implicated in tissue damage in humans [29], [30]. However, IL10 is involved in mediating parasite persistence, regulating Th2 cell expansion and controlling cell-mediated lesion development in leishmaniasis [30].

Herein, the transcripts coding IFN-c and IL10 were quantitated in the skin lesions of the infected hamsters by RT-qPCR, and the results are expressed as fold increase relative to uninfected paws.

The IN LaAg-immunised group presented a dual profile of IFN-c expression: the four animals having the smallest lesions presented gene expression similar to that of uninfected skin (fold increase close to 1), while the three animals that had larger lesions were those with the highest IFN-c gene expression levels in their skin lesion comparable to that of the

IM LaAg and nonimmunised PBS groups (Fig. 4A). A positive correlation was observed between paw lesion size and IFN- $\gamma$  in skin lesions ( $r = 0.76$ ,  $p, 0.0001$ ) (Fig. 4B). IL10 expression was similar between all three groups (Fig. 4A). Intriguingly, three animals from the IN LaAg group presenting smaller lesions also showed low IL10 expression (Fig. 4B). These findings showed that on day 114 post-infection, there was no correlation between protection induced by IN LaAg and IFN- $\gamma$  and IL-10 gene expression.

#### Discussion

The majority of studies aimed at developing an effective *Leishmania* spp vaccine have been conducted for experimental CL caused mainly by *L. major* or *L. amazonensis*. *L. braziliensis*, which is the main causative agent of cutaneous and mucosal leishmaniasis in the Americas, has been largely neglected in the context of vaccine development mainly due to the unsuitability of the mouse model. Moreover, candidate antigens - such as the leishmanial homologue of receptors for activated C kinase protein (LACK), thiol-specific antioxidant (TSA), *Leishmania* spp elongation and initiation factor (LeIF) and *L. major* stress-inducible protein 1 (LmST1) - all of which induced protection against *L. major*, failed to prevent *L. braziliensis* infection in mice [15].

In this work, the results demonstrated for the first time, that the intranasal administration of adjuvant-free crude *L. amazonensis* antigens is efficacious against *L. braziliensis* infection in the golden hamster model. Comparing the IN and IM routes of immunisation, it was also observed that protective immunity induced by LaAg is critically dependent upon the route of immunisation, as previously observed in the murine model of infection with *L. amazonensis* [6], [7], [12].

No mucosal adjuvant was used with LaAg because there is currently none approved for human use [31]. The presence of particulate antigens in the LaAg may possibly have functioned as intrinsic adjuvants.

Although protective immunity can be acquired following natural infection, no vaccine against leishmaniasis has been licensed for human use. One of the most extensively studied human vaccines is Leishvacin comprised of whole-killed promastigotes of *L. amazonensis*, which has passed Phase 1 and Phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity in human volunteers upon systemic administration [32]. Despite this, its efficacy was not confirmed after a controlled phase III clinical trial in Colombia [33]. Recently, clinical trials of the first defined vaccine

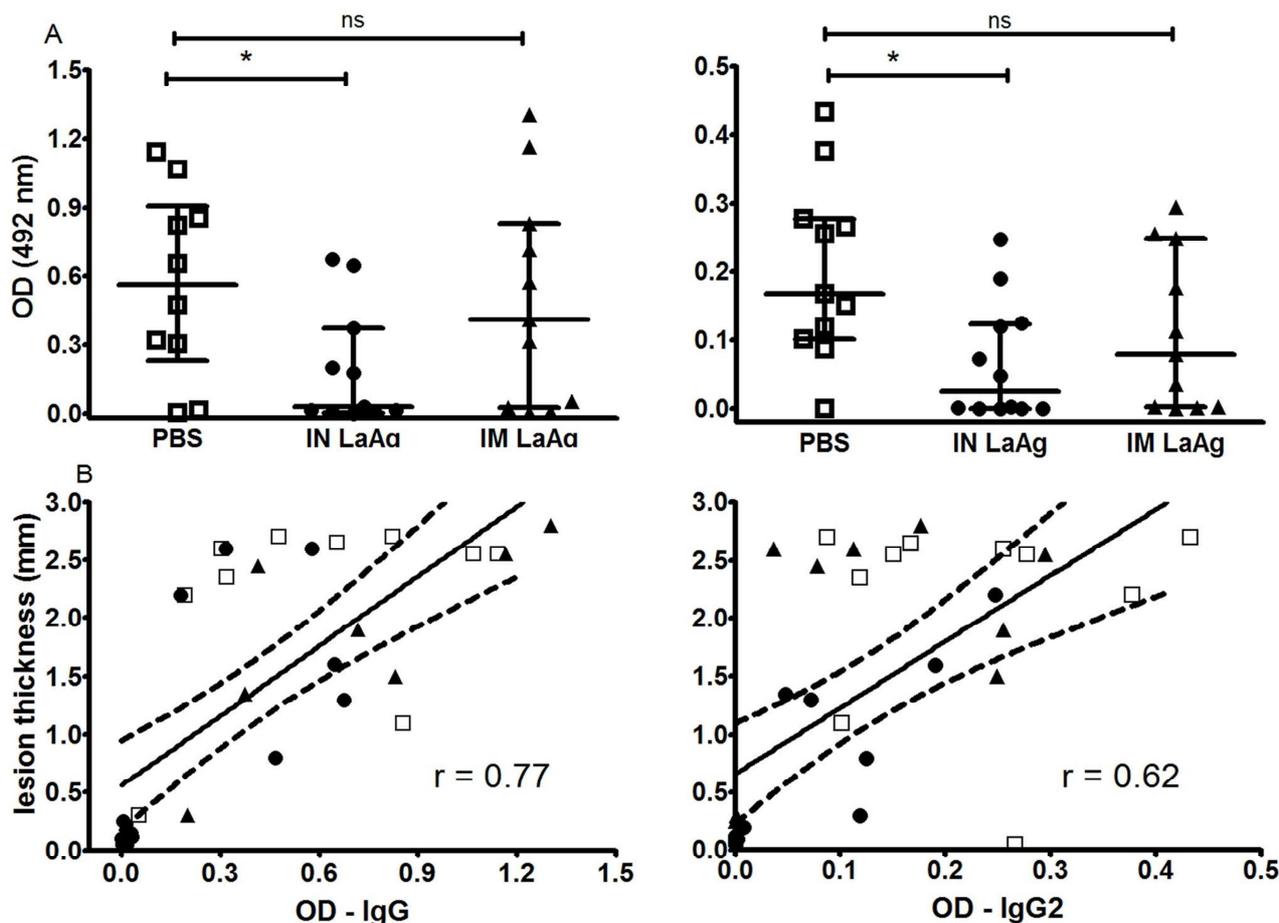


Fig. 3. Anti-Leishmanial IgG and IgG2 serum levels in hamsters immunised with *L. amazonensis* antigens (LaAg) and infected with *L. braziliensis*. Golden

hamsters (5–6 per group) were immunised with IN LaAg (N), IM LaAg (m) or PBS (%). Two weeks after the last immunisation, hamsters were challenged with *L. braziliensis*. A) IgG and IgG2 serum levels were determined 114 days post-infection by ELISA. B) Correlation between lesion thickness and anti-leishmanial IgG ( $r = 0.78$ ,  $p < 0.0001$ ) or IgG2 ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ ) serum levels. Each point represents one animal. The horizontal bars represent the median values, \*  $p < 0.05$ . Data are from two independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0003439.g003

for leishmaniasis show that the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine, a multisubunit recombinant *Leishmania* vaccine composed of the recombinant *Leishmania* polyprotein LEISH-F1 (formerly known as Leish-111f) antigen and the MPL-SE adjuvant, is safe and immunogenic in healthy subjects [34], [35].

Considering that hamsters present an outbred genetic background, it is expected that individual characteristics have an important role in influencing different clinical outcomes of the disease, thereby mimicking clinical outcomes and immune response observed in human disease.

Due to the lack of a broad range of hamster-specific immunological reagents in the market [36], this work focused on the study of the immune response at the transcriptional level using real time RT PCR and on the association between antibody levels and disease protection.

We observed an association between IgG levels and disease severity, similar to the results previously shown in *L. panamensis* infection [27]. Moreover, we observed that the animals immunised with IN LaAg that were considered protected also presented lower levels of anti-*Leishmania* IgG and IgG2.

Although the presence of inflammatory cytokines (such as IFN- $\gamma$  and TNF) is critical for the control of parasite dissemination, an exaggerated Th1 response has been associated with the severe tissue inflammation observed in CL lesions [29], [37], [38].

Herein, it was observed that at 114 days post-infection, the animals that had larger lesions were those with the highest IFN- $\gamma$  levels in their skin lesions. Our results suggest that in this experimental model, IFN- $\gamma$  gene expression may mediate immunopathology and that the high IFN- $\gamma$  levels in later stages of infection may be an attempt to control the elevated parasitic load in the skin lesion. Although post-transcriptional or post-translational modifications may additionally regulate the target

genes of interest, different publications have described a good correlation between cytokine gene expression quantified by RT-qPCR and cytokine secretion as measured by ELISA [39].

As noted, the animals from the IN LaAg group that presented smaller lesions also showed a lower parasite load that was associated with lower IFN- $\gamma$  mRNA expression and lower IgG2 levels. These results suggest that at the endpoint of infection, the activation of macrophages to kill parasites may involve cytokines other than IFN- $\gamma$ .

The presence of parasites in the skin the animals considered protected can be the ideal situation in order to maintain CD8 T cell memory. Recent reports indicate a correlation between the

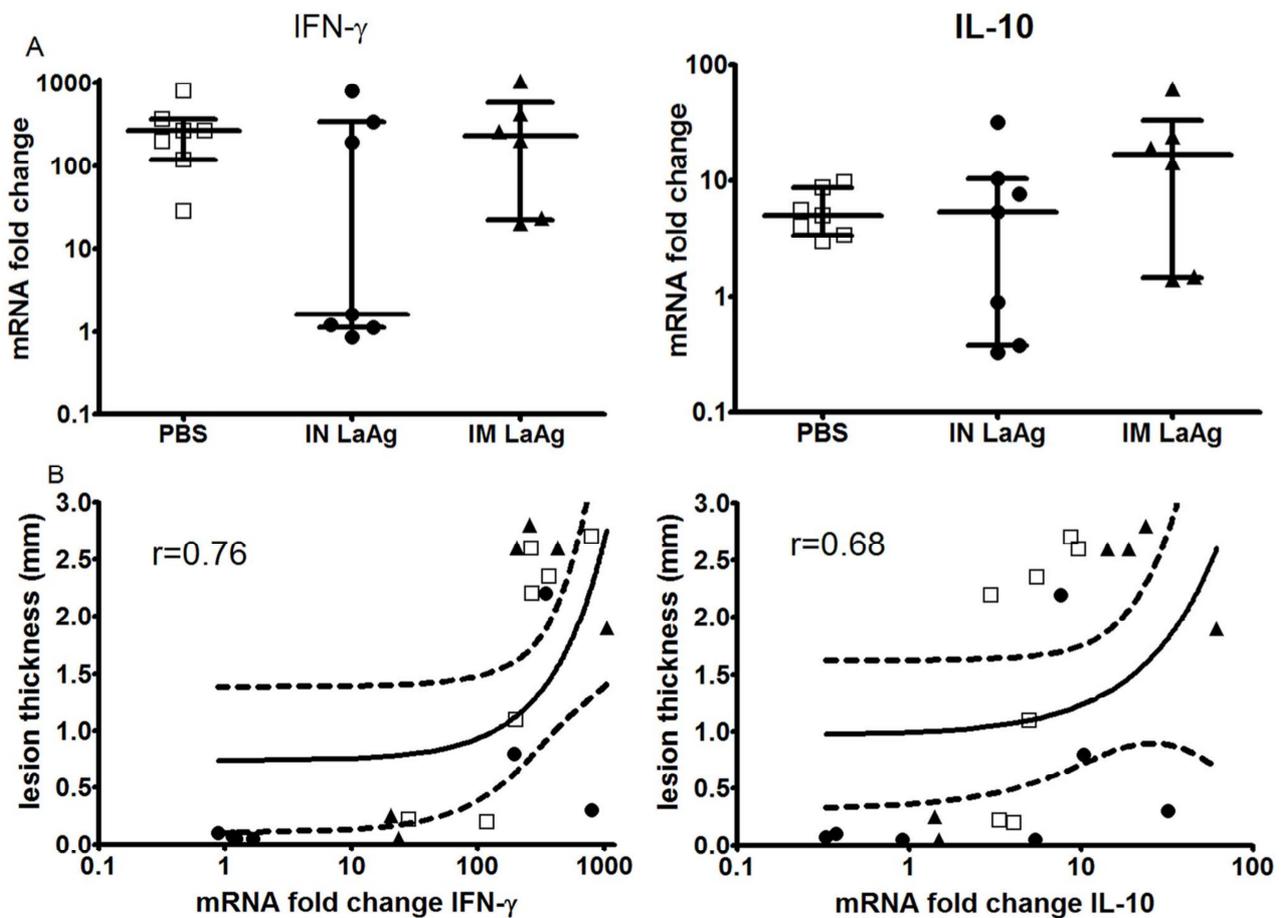


Fig. 4. Cytokine mRNA expression in skin of hamsters immunised with *L. amazonensis* antigens (LaAg) and infected with *L. braziliensis*. Golden hamsters

(6–7 per group) were immunised with IN LaAg (N), IM LaAg (m) or PBS (%). Two weeks after the last immunisation, hamsters were challenged with *L. braziliensis*. (A) mRNA gene expression for IFN- $\gamma$  and IL-10 in skin lesions was determined 114 days post-infection. (B) Correlation between lesion thickness and IFN- $\gamma$  ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.0001$ ) or IL-10 ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.0001$ ). Each point represents one animal. The horizontal bars represent the median values. Symbols represent the fold change in cytokine expression relative to that of uninfected hamsters. Data shown are from one of two independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0003439.g004

persistence of parasites at the primary infection site and the development of long-lasting immunity to reinfection [40].

It has been hypothesized that a modulation in the immune response induced by IN LaAg occurs in an early phase of the infection, which could dictate the establishment and magnitude of the chronic phase of the disease. The mechanisms underlying the protection conferred by IN LaAg could not be clearly established here, and further work is required to determine both the immunogenicity of LaAg and the

immune response in the skin during the early phase of experimental *L. braziliensis* infection.

In the present study, we described for the first time that nasal immunisation with whole/crude *L. amazonensis* antigens (LaAg) can protect golden hamsters against *L. braziliensis* infection. That such a vaccination strategy effectively induced cross-protection against another *Leishmania* species suggests that it may have a broad spectrum of application.

#### Acknowledgments

To Joanna Reis dos Santos Oliveira for her assistance in sample processing.

## References

1. Alvar J, Ve'lez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671
2. Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, et al. (2008) Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103: 1–10.
3. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111–126.
4. Liew FY, Hale C, Howard JG (1985) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 135: 2095–2101.
5. Liew FY, Dhaliwal JS (1987) Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from *Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites. *J. Immunol.* 138:4450–4456.
6. Pinto EF, Cortezia MM, Rossi-Bergmann B (2003) Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 21: 3534–3541.
7. Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JRC, Guedes HLM, Fentanes RF, et al. (2005) TGF- $\beta$ -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *L. amazonensis* antigens. *Microbes and Infect.* 7: 1317–1323.
8. Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, et al. (1999) Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 163: 4481–4488.
9. Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR, George-Chandy A, Holmgren J, et al. (1999) Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol. Rev.* 170: 197–222.
10. Bakke H, Lie K, Haugen IL, Korsvold GE, Høiby EA, et al. (2001) Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. *Infect. Immun.* 69: 5010–5015.
11. Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H (2004) Immunology - Antigen-presenting cells in the gut. *J. Biomed. Sci.* 11:130–141.
12. Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B (2004) Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis using a particulated leishmanial antigen or LACK-DNA. *Infect Immun* 72:4521–4527.
13. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG (1998) Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 66: 827–829.
14. Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C (2007) Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun.* 75: 3823–3832.
15. Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, et al. (2007) Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin. Vac Immunol.* 14: 1173–1181.
16. Selvapandiyar A, Dey R, Nysten S, Duncan R, Sacks D, et al. (2009) Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 183: 1813–1820.
17. Tonui WK, Titus RG (2007) Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 579–584.
18. Goto H, Lindoso JA (2004) Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Research* 37: 615–623.
19. Dea-Ayuela MA, Rama-In'iguez S, Alunda JM, Bola's-Fernandez F (2007) Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. *Vet. Research Communications* 31: 703–717.
20. de Oliveira Gomes DC, DA Silva Costa Souza BL, DE Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B (2011) Intranasal immunization with LACKDNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitology* 138:1892–1897.
21. Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Pla'cido-Pereira RM, Da-Cruz AM (2013) Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
22. Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, et al (2014) Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect. Immun.* 82:5203–5213.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
24. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* 7: 545–555.
25. Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, et al (2010) Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunology* 22: 11–31.
26. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
27. Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guari'n N, et al. (2003) The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol.* 25:139–148.
28. Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C (2000) Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 269–281.
29. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, et al (2007) Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 29:251–258.
30. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM (2012) Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 3:301.
31. Fujihashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR (2002) A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine* 20: 2431–2438.
32. De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, et al. (1999) Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and no autoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17:1179–1185.
33. Ve'lez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, et al. (2005) Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:593–598.
34. Ve'lez ID, Gilchrist K, Mart'nez S, Ram'rez-Pineda JR, Ashman JA, et al (2009) Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 28:329–37.
35. Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, et al (2011) A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of The Leish-F1 + MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral Leishmaniasis. *Vaccine* 29:3531–3537.
36. Zivcec M, Safronetz D, Haddock E, Feldmann H, Ebihara H (2011) Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Immunol Methods* 368: 24–35.
37. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, et al. (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734–6740.
38. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr, Schriefer A, Machado PR, et al. (2005) Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73: 7853–7859.

39. Hein J, Schellenberg U, Bein G, Hackstein H (2001) Quantification of murine IFN- $\gamma$  mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye. *Scand J Immunol* 54: 285–291.
40. Okwor I, Uzonna J (2008) Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies . *Immunol Res.*41:123–136.