

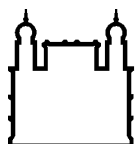
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E IMUNOGENICIDADE DE EXTRATOS  
ANTIGÊNICOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS COMO VACINAS  
CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA CAUSADA POR  
*Leishmania amazonensis*

IASMIN CRISTIANE DE SOUZA

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*lasmin Cristiane de Souza*

Avaliação da eficácia e imunogenicidade de extratos antigênicos homólogos e heterólogos como vacinas contra leishmaniose cutânea murina causada por *Leishmania amazonensis*

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

**Orientador (es):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Katia da Silva Calabrese  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Zaverucha do Valle

**RIO DE JANEIRO**  
Janeiro de 2018

Souza, Iasmin Cristiane .

Avaliação da eficácia e imunogenicidade de extratos antigênicos homólogos e heterólogos como vacinas contra leishmaniose cutânea murina causada por *Leishmania amazonensis* / Iasmin Cristiane Souza. - Rio de Janeiro, 2018.

61 f.; il.

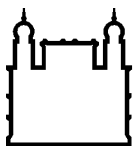
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Kátia da Silva Calabrese.

Co-orientadora: Tânia Zaverucha do Valle.

Bibliografia: f. 54-60

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Vacina. 3. CpG-ODN. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: IASMIN CRISTIANE DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E IMUNOGENICIDADE DE EXTRATOS  
ANTIGÊNICOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS COMO VACINAS CONTRA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA CAUSADA POR *Leishmania amazonensis***

**ORIENTADOR (ES): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia da Silva Calabrese  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Zaverucha do Valle**

**Aprovada em: 24/04/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Eduardo Caio Torres dos Santos - **Presidente** (Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos/IOC)

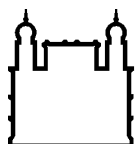
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>** Silvia Amaral Gonçalves da Silva (Faculdade de Ciências Médicas/Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

**Prof. Dr.** Alexandre Ribeiro Bello (Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/Fac. Ciências Médicas Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>** Suzana Corte-Real Faria (Laboratório de Biologia Estrutural/IOC)

**Prof. Dr.** Igor de Almeida Rodrigues (Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 24 de Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer aos membros do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do IOC que me receberam e me ajudaram no decorrer do meu mestrado, principalmente Daiana Hardoim, Tânia Zaverucha e Kátia Calabrese.

Ao meu orientador da iniciação científica Sergio Mendonça por ter me guiado até aqui e ter se tornando um grande amigo e professor multidisciplinar pelo qual carinho e respeito só crescem.

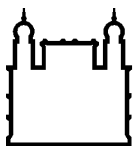
Aos meus pais, Jesiel e Solange, por terem ajudado em todo meu caminho, sem os quais eu não teria conseguido chegar até onde cheguei.

À Danielle Louzada por estar sempre ao meu lado dizendo que tudo vai dar certo, entrando nas confusões que arranjo para nos divertirmos no processo e também por lavar a louça.

Ao Vinicius Ferraz pelo apoio, pelos abraços reconfortantes, pelas comidas super gostosas e por falar “Toma aqui uma cerveja para relaxar e me dá seu pé”, coisas que me ajudaram quando eu estava enlouquecendo.

Obrigada a todos vocês!.

**"Todo caminho é o caminho certo.  
Tudo poderia ter sido qualquer outra  
coisa e teria sido igualmente  
importante"**  
Mr. Nobody (Jaco Van Dormael, 2009)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E IMUNOGENICIDADE DE EXTRATOS ANTIGÊNICOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS COMO VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA CAUSADA POR *Leishmania amazonensis*

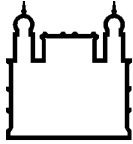
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Iasmin Cristiane de Souza

As leishmanioses representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo consideradas um grande problema de saúde pública. A terapêutica atual para estas doenças possui alto custo e tem efeitos adversos e toxicidade consideráveis. Até o momento não há disponibilidade de uma vacina para uso humano. Dentre várias questões sobre a o desenvolvimento de uma vacina para leishmaniose é se a mesma possuiria capacidade protetora contra a infecção de espécies homólogas e heterólogas de *Leishmania*. Estudos mostram que os extratos totais de antígenos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* possuem efeitos tanto protetores como promotores da doença, quando utilizados como vacina contra a leishmaniose em modelo murino. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a imunogenicidade e a capacidade protetora dos extratos totais homólogos e heterólogos de *L. amazonensis* (La) e *L. braziliensis* (Lb), respectivamente, frente à infecção experimental por *L. amazonensis*. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados duas vezes com extratos totais de promastigotas mortas de La ou Lb isoladamente ou com oligodesoxinucleotídeos ricos em motivos CpG (CpG-ODN) como adjuvante. Duas semanas após a segunda imunização, os camundongos foram desafiados com promastigotas de *L. amazonensis* e o desenvolvimento das lesões foi acompanhado por mensurações semanais do diâmetro das patas. A carga parasitária foi avaliada pelas técnicas de Análise de Diluição Limitante (ADL) ou qPCR, além disso, o perfil de citocina foi determinado por citometria de fluxo. Os grupos imunizados com La-CpG ou Lb-CpG apresentaram lesões significativamente menores do que o grupo controle (PBS). A carga parasitária, em camundongos da linhagem BALB/c imunizados com os extratos em associação ao adjuvante, foi menor do que a dos grupos controle. Na análise do perfil de citocinas, os grupos de animais imunizados com La-CpG e Lb-CpG, que foram os grupos que mostraram proteção, apresentaram uma tendência a maior produção de IFN- $\gamma$ .





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EFFICACY AND IMMUNOGENICITY EVALUATION OF HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS ANTIGENIC EXTRACTS AS VACCINE AGAINST MURINE CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

**lasmin Cristiane de Souza**

Leishmaniasis represents a complex of diseases with broad clinical spectrum and epidemiological diversity, being considered a major public health problem. Current therapy for these diseases is costly and has considerable adverse effects and toxicity. So far there is no vaccine available for human use. Among several questions about a vaccine development for leishmaniasis is whether it would have a protective capacity against infection of homologous and heterologous *Leishmania* species. Studies have shown that total antigen extracts of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* have both protective and disease-promoting effects when used as a vaccine against leishmaniasis in murine model. Therefore, this study aimed to evaluate the immunogenicity and protective capacity of the total homologous and heterologous extracts of *L. amazonensis* (La) and *L. braziliensis* (Lb), respectively, against the experimental infection by *L. amazonensis*. BALB/c mouse were immunized twice with total extracts of dead La or Lb alone or with oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) as adjuvant. Two weeks after the second immunization, mouse were challenged with *L. amazonensis* promastigotes and lesion development was followed by weekly measurements of paws diameter. The parasite load was evaluated by the Limiting Dilution Analysis (LDA) or qPCR techniques, in addition, the cytokine profile was determined by flow cytometry. Groups immunized with La-CpG or Lb-CpG showed significant lower lesions than the control group (PBS). The parasite load in BALB/c mouse immunized with extracts associated with adjuvant was lower than control groups. When the cytokine profile analysis was performed, the groups of animals immunized with La-CpG or Lb-CpG, which were the groups that showed protection, presented a tendency to higher production of IFN- $\gamma$ .

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 Formas clínicas .....	16
1.2 Resposta imunológica .....	18
1.3 Tratamento da LTA.....	20
1.4 Vacina .....	21
1.5 Adjuvante .....	24
1.6 Justificativa.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 Animais.....	28
3.2 Parasitos .....	28
3.3 Antígenos .....	28
3.4 Imunização .....	29
3.5 Infecção experimental de camundongos .....	29
3.6 Desenho experimental.....	29
3.7 Acompanhamento do desenvolvimento das lesões.....	30
3.8 Quantificação da carga parasitária .....	30
3.9 Determinação do perfil de citocinas.....	32
3.10 Análise estatística dos resultados .....	33
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1 Piloto: Imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c por via subcutânea.....	34
4.2 Imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea incluindo grupo CpG.....	37
4.3 Imunização de camundongos BALB/c e determinação de carga parasitária por PCR .....	40

4.4	Imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea com perfil de citocinas .....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>61</b>
	Licença CEUA .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> .....	13
Figura 1.2 – Inseto vetor flebotomíneo do gênero <i>Phlebotomus</i> .....	14
Figura 1.3 – Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i> .....	15
Figura 1.4 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar .....	17
Figura 3.1 - Desenho experimental .....	30
Figura 4.1 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos C57BL/6 desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por via subcutânea em comparação com a pata contralateral .....	34
Figura 4.2 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por via subcutânea em comparação com a pata contralateral .....	35
Figura 4.3 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com $10^5$ promastigotas <i>L. amazonensis</i> na 11ª semana após a infecção.....	36
Figura 4.4 – Carga parasitária da lesão dos diferentes grupos de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	37
Figura 4.5 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por via subcutânea em comparação com a pata contralateral .....	38
Figura 4.6 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com $10^5$ promastigotas <i>L. amazonensis</i> na 11ª semana após a infecção.....	39
Figura 4.7 – Carga parasitária da lesão dos diferentes grupos de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	40
Figura 4.8 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por via subcutânea em comparação com a pata contralateral .....	41
Figura 4.9 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com <i>L. amazonensis</i> na 8ª semana após a infecção. ....	42

Figura 4.10 – Carga parasitária no linfonodo drenante de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> comparando os extratos associados ao adjuvante .....	43
Figura 4.11 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com $10^5$ promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por via subcutânea em comparação com a pata contralateral .....	44
Figura 4.12 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com <i>L. amazonensis</i> na 7 <sup>a</sup> semana após a infecção. ....	45
Figura 4.13 – Perfil de citocinas de culturas de sobrenadante de linfonodo de drenagem .....	46

# 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo consideradas um grande problema de saúde pública (Ministério Saúde, 2013). São um grupo de doenças endêmicas em quase todos os continentes, na maioria dos países americanos (Alvar *et al*, 2012) e em todos os estados brasileiros (Rangel & Lainson, 2009; Martins-Melo *et al*, 2014). Várias espécies de *Leishmania* (Figura 1), protozoários parasitas da família dos tripanosomatídeos dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, produzem a doença humana (Vale & Furtado, 2005).

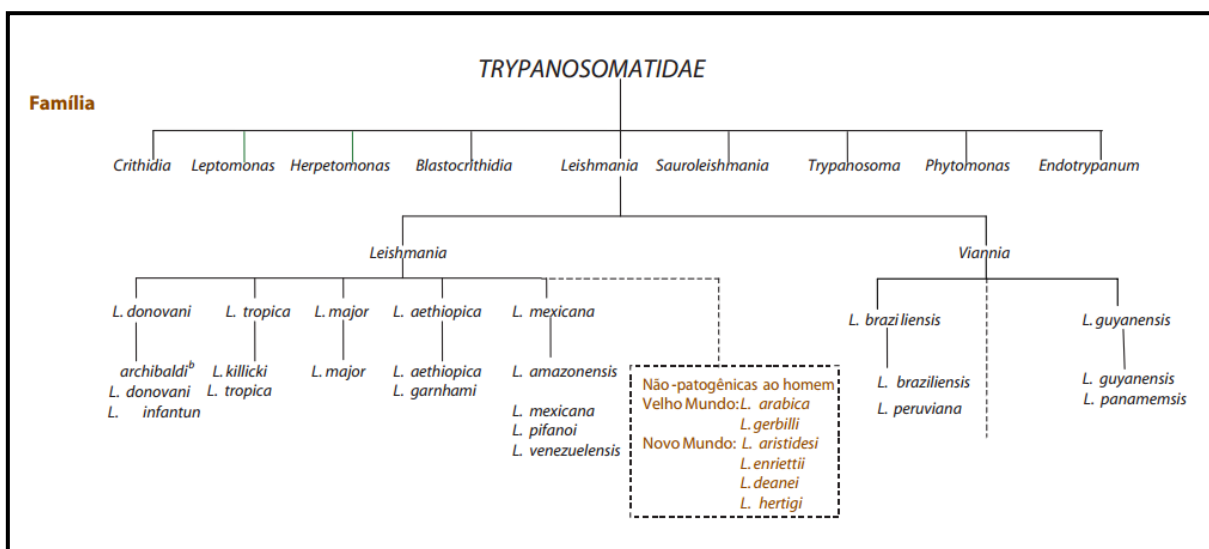


Figura 1.1 – Classificação das espécies de *Leishmania*

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, 2013

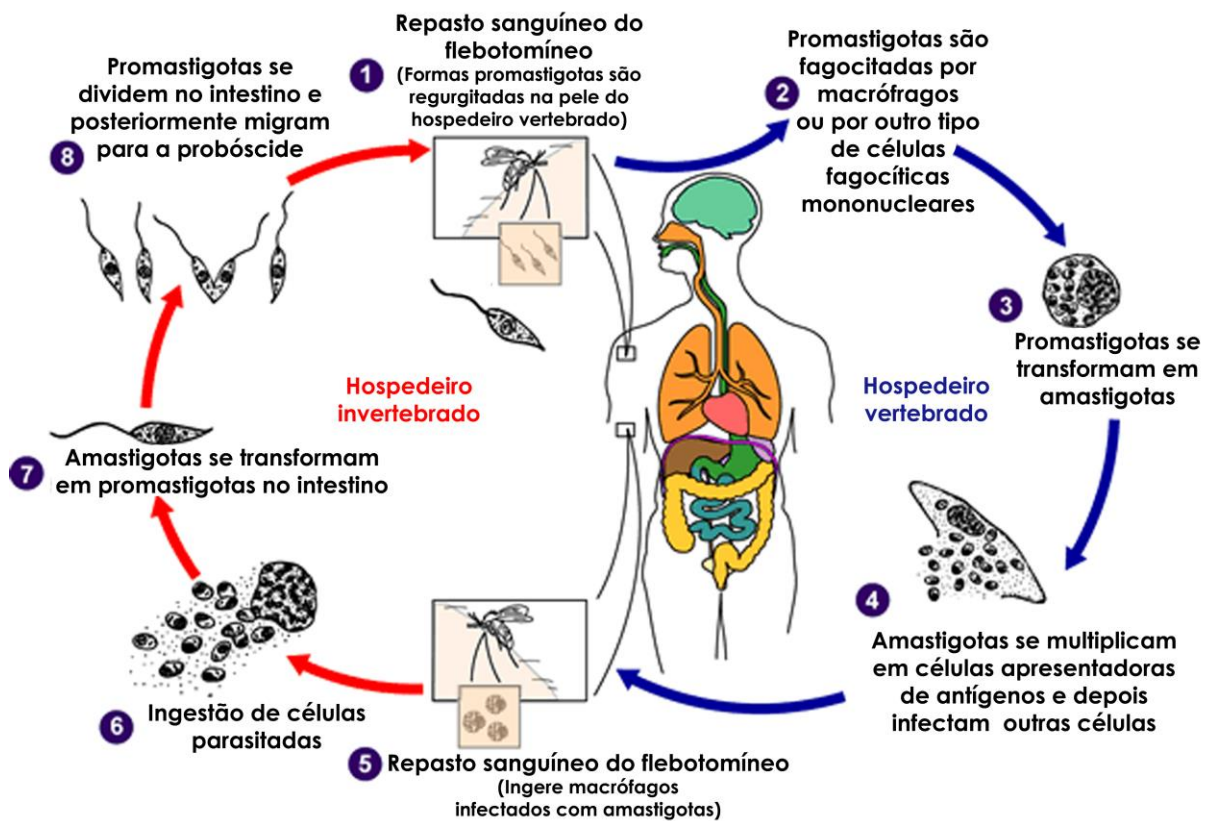
Cada uma das espécies é adaptada a uma ecologia particular e ao parasitismo de diferentes espécies animais (Lainson *et al*. 1994; Vale & Furtado, 2005). Há em torno de vinte espécies de *Leishmania* que causam as principais manifestações clínicas das formas visceral e tegumentar da doença (Herwaldt, 1999; Hurrell *et al*, 2016) cuja transmissão se dá através da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (Figura 1.2) dos gêneros *Lutzomyia* (no continente americano) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (Desjeux, 1996). Mesmo quando teoricamente justificáveis, como no caso de transmissão intra ou peridomiciliar, medidas de controle direcionadas contra vetores e reservatórios não têm se mostrado efetivas.

Há uma grande variabilidade de reservatórios e vetores, o que favorece relações ecológicas diversificadas que contribuem para a manutenção do parasito no meio (Woolhouse *et al*, 1997; Werneck, 2014).



Figura 1.2 – Inseto vetor flebotomíneo do gênero *Phlebotomus*  
Fonte: VON STEBUT E, 2015, p. 193

Durante seu ciclo evolutivo, o parasito apresenta principalmente duas formas evolutivas: promastigota, forma encontrada no hospedeiro invertebrado, e amastigota, forma intracelular encontrada em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (Von Stebut, 2015). O ciclo da *Leishmania* se inicia quando formas promastigotas, que se dividiram no intestino do vetor e posteriormente são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. O protozoário é fagocitado por fagócitos como neutrófilos, células dendríticas e, especialmente, macrófagos. Dentro dos macrófagos, o parasito sofre modificações e se transforma na forma amastigota e multiplica-se, até dado momento em que a célula se rompe e libera o parasito no meio externo onde irão infectar outras células. Quando um vetor flebotomíneo realizar um repasto, ele irá ingerir células infectadas com o parasito. Dentro do vetor, as *Leishmanias* se transformarão em promastigotas, se multiplicarão e migrarão para as glândulas salivares do vetor, reiniciando o ciclo (Kaye & Scott, 2011; Borghi *et al*, 2017) (Figura 1. 3).



**Figura 1.3 - Ciclo de vida da *Leishmania sp.***

Fonte: Adaptado do *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*

Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Acessado em: Maio, 2015

As leishmanioses possuem duas formas, a que acomete principalmente as vísceras, conhecida como leishmaniose visceral (LV), e a que acomete principalmente pele e/ou mucosas, que é a leishmaniose tegumentar (LT).

A LV, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica, causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* (no novo mundo, a espécie responsável pelos casos de LV é a *Leishmania infantum*), que acomete tecidos ricos em células fagocíticas do sistema mononuclear, podendo ser fatal caso não haja intervenção terapêutica (Brasil, 2013, Chappuis *et al*, 2007; Loeuillet *et al*, 2016). Noventa por cento dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Sudão do Sul (Elmahallawy *et al*, 2014). A forma clássica envolve um aumento do abdômen geralmente associado a hepatoesplenomegalia, além de febre irregular, linfadenopatia, perda de peso, anemia com leucopenia, alterações hepáticas (hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia) e estado de debilidade progressivo, podendo chegar a óbito caso não haja tratamento específico (Castellano, 2005; Stanley & Engwerda, 2007). As transformações do ambiente, como o processo de urbanização, processos migratórios, pressões econômicas



crecentes fazem com que ocorra a expansão das áreas endêmicas, o que logicamente leva os vetores a se alimentarem não só do sangue de animais silvestres (raposas e marsupiais), mas de animais das áreas periurbanas, onde o cão se apresenta como principal reservatório do parasito, sendo a prevalência nestes, maior do que no homem (Ministério da saúde, 2013).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), como é chamada a LT que ocorre no Novo Mundo é causada por várias espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, destacando-se duas espécies do protozoário como principais causadoras de LTA no Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Dedet et al, 1999; Grimaldi & Tesh, 1993). As manifestações clínicas de LTA possuem um amplo espectro que vai depender da espécie infectante, do vetor, assim como da genética e do estado nutricional do hospedeiro, e ainda da resposta imune frente à infecção (Neuber, 2008).

## 1.1 Formas clínicas da LTA

A LTA possui distintas formas clínicas que são determinadas por diversos fatores como desnutrição, *status* imune e *background* genético do indivíduo infectado, assim como fatores relacionados ao vetor e a espécie de *Leishmania* (Kevric, Cappel & Keeling, 2015; WHO, 2017). Estas manifestações vão desde lesões únicas no local da picada que podem ser auto-resolutivas até lesões nodulares que se espalham por toda a pele do hospedeiro, sendo irresponsivas ao tratamento (Torres-Guerrero *et al*, 2017). A forma mais comum da doença é a leishmaniose cutânea localizada (LC) (Figura 1.4A), caracterizada por uma ou poucas lesões ulceradas que surgem no local da picada ou próximas a ela. E apesar dessas lesões terem uma tendência à cura espontânea, elas deixam cicatrizes de forma permanente (WHO, 2010). Além da forma localizada, há também a leishmaniose cutânea disseminada (LDS) (Figura 1.4B), a qual apresenta múltiplas lesões de aparência acneiforme (Brasil, 2013); a leishmaniose cutânea difusa (LDF) (Figura 1.4C), que apresenta múltiplas lesões nodulares ou papulares que podem se fundir formando placas que cobrem uma extensa área da pele (Scorza, Carvalho & Wilson, 2017); e a leishmaniose mucocutânea (LM) (Figura 1.4D), que é a forma mais desfigurante da doença, caracterizada por afetar áreas de mucosa do nariz e do palato podendo causar sua destruição parcial ou total (Gatti *et al*, 2017).

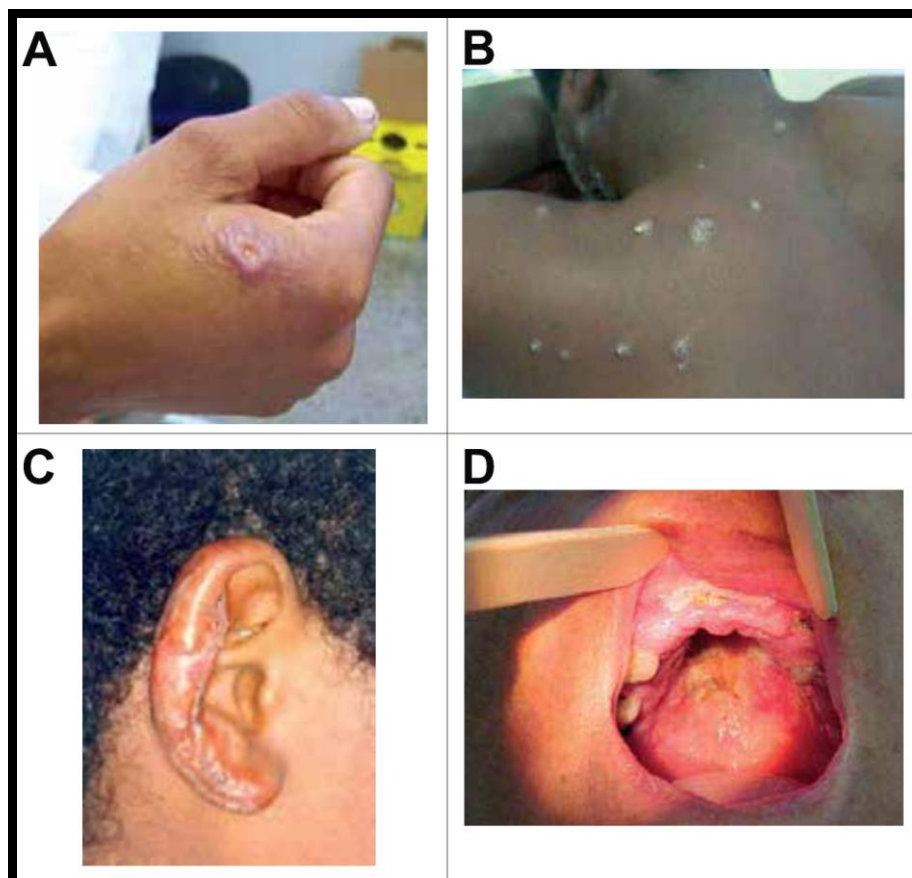


Figura 1.4 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar: (A) Leishmaniose cutânea localizada, (B) Leishmaniose cutânea disseminada, (C) Leishmaniose cutânea difusa e (D) Leishmaniose mucocutânea.

Fonte: Ministério da Saúde, 2013

Como dito anteriormente, a forma clínica varia de acordo com a espécie do parasito, sendo a LC e LDS, no Brasil, causadas tanto pela espécie do subgênero *Leishmania* (e.g., *L. amazonensis*) quando do subgênero *Viannia* (e.g., *L. braziliensis*), enquanto a forma de acometimento mucoso é causada mais frequentemente pela *L. braziliensis* e a forma difusa causada apenas por *L. amazonensis* (Brasil, 2013; Paniz-Mondolfi *et al*, 2013). Indivíduos que apresentem LC ou LDS, têm seu teste de intradermorreação de Montenegro positivo e sua resposta ao tratamento com antimonial é, geralmente, boa; enquanto indivíduos com a LDF, conhecida como polo anérgico da doença, apresentam teste de intradermorreação de Montenegro negativo e sua resposta ao antimonial tende a proporcionar uma recuperação clínica transitória; e a LM, conhecida como polo hiperérgico da doença, apresenta teste de Montenegro fortemente positivo e uma má resposta ao tratamento com antimoniais (Paniz-Mondolfi *et al*, 2013; Conceição-Silva & Alves, 2014).

## 1.2 Resposta imunológica na LTA

No momento do repasto sanguíneo realizado pelo vetor, formas promastigotas são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado e, rapidamente, são ingeridas por células fagocíticas, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Romão *et al*, 2007; Gollob, Viana & Dutra, 2014). Dentro do fagolisossomo dos macrófagos, as amastigotas que evadem os mecanismos de eliminação da célula hospedeira, iniciam o processo de proliferação no compartimento celular (Pace, 2014). A interação da *Leishmania* com o macrófago pode direcionar a uma variedade de respostas que pode depender de diferentes fatores, como a forma pela qual o macrófago é ativado ou pela espécie de do parasito (Gollob, Viana & Dutra, 2014).

Os macrófagos podem ser ativados pela via clássica (M1), produzindo reativos de nitrogênio (NO) o que leva a eliminação do parasito, ou pela via alternativa (M2), que induz expressão de arginase e promove a infecção por *Leishmania*. A ativação por via clássica é induzida por citocinas pró-inflamatórias (Th1), como IFN- $\gamma$ , enquanto que proteínas anti-inflamatórias (Th2), como IL-4, estimula a ativação de macrófagos pela via alternativa (Abdoli, Maspi & Ghaffarifar, 2017; Vellozo *et al*, 2017).

Células dendríticas, infectadas com amastigotas, migram para a zona de células T nos linfonodos de drenagem locais, onde ocorre a apresentação dos antígenos do parasito para as células T CD4+ e CD8+ e ativação dessas células para dar início a uma resposta específica contra *Leishmania* (Moll, 2000; Gollob, Viana & Dutra, 2014).

As células T CD8+ possuem atividade contra a infecção através da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 E TGF- $\beta$ ) e de sua atividade citotóxica. As células T CD4+, assim como as células T CD8+, também estão relacionadas à proteção contra *Leishmania* através da produção de citocinas capazes de ativar macrófagos para eliminação dos parasitos (perfil Th1), entretanto, uma resposta inflamatória muito forte pode levar a prevalência da doença. Essas células também podem ser direcionadas a produzir citocinas de perfil Th2, relacionada a persistência do parasito e, estudos mais recentes têm mostrado outro perfil desenvolvido, o Th17, pouco ainda conhecido, mas acreditado de estar relacionado a patogênese da leishmaniose (Scharton-Kersten & Scott, 1995; Moll, 2000; Gollob, Viana & Dutra, 2014; Abdoli, Maspi & Ghaffarifar, 2017).

Células auxiliares (Th) podem se diferenciar em linfócitos que produzem um perfil de citocinas do tipo Th1, que são citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , e estão associadas à eliminação do parasito. Quando as células apresentadoras de antígeno (APCs), como macrófagos, apresentam o antígeno às células T, estas se tornam ativadas e passam a secretar IFN- $\gamma$ , que, por sua vez, aumentam a atividade microbicida do macrófago por meio da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (Nylén & Eidsmo, 2012; Maspi, Abdoli & Ghaffarifar, 2016; Abdoli, Maspi & Ghaffarifar, 2017).

Os linfócitos auxiliares também podem se diferenciar em células que secretam citocinas com uma resposta primordial do perfil Th2, as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-13), associadas com a promoção da suscetibilidade e disseminação da doença, pois esta induz uma resposta humoral, ineficiente contra infecção por *Leishmania* podendo fazer com que os macrófagos não respondam a sinais de ativação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , já que o perfil Th2 também inibe algumas funções de fagocitose da célula, o que é necessário para a destruição do parasito. (Nylén & Eidsmo, 2012; Maspi, Abdoli & Ghaffarifar, 2016; Abdoli, Maspi & Ghaffarifar, 2017).

O direcionamento para o perfil Treg leva a produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  que contribuem para uma moderação da resposta de células T de perfil Th1 (Mansueto *et al*, 2007) ou progressão da doença (Maspi, Abdoli & Ghaffarifar, 2016), levando em consideração que IL-10 participa da regulação para baixo do perfil Th1 através da supressão de IL-12 e IFN- $\gamma$  além de diminuir a atividade microbicida de macrófagos. TGF- $\beta$ , outra citocina regulatória, também é parcialmente responsável pela supressão da resposta protetora (Mansueto *et al*, 2007). As informações sobre o papel das células Treg em humanos é limitada, porém estudos mostram a sua presença em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes na forma aguda de leishmaniose cutânea localizada ou curados, assim como em PBMC advindas de controles saudáveis em resposta a *Leishmania guyanensis* (Bourreau *et al*, 2009).

Outro grupo de linfócitos, cujo papel frente a infecção por *Leishmania*, vem sendo estudadas são as células produtoras de IL-17, que foram recentemente caracterizadas como uma linhagem independente de linfócitos T efetores, as Th17. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória e estudos vem indicando uma correlação entre esta citocina e uma alta resposta inflamatória o que pode contribuir na patogênese da doença assim como as células de perfil Th2 (Soong, Hernard &

Melby, 2012). Primariamente reportado em 2009, por Bacellar e colaboradores, linfócitos advindos de pacientes com leishmaniose mucosa ou cutânea apresentavam níveis mais altos da produção de IL-17 do que linfócitos oriundos de pacientes controles não infectados.

### 1.3 Tratamento da LTA

A terapêutica utilizada para leishmaniose tegumentar possui, além de um alto custo, um tempo prologado de administração e toxicidade considerável. Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) e os de segunda escolha, anfotericina B e pentamidina. (Singh, Kumar & Singh, 2012; Ministério Da Saúde, 2013; Handler *et al*, 2015). Casos de resistência ao antimonial vêm surgindo na Índia, além de haver um grande potencial de resistência às drogas de segunda escolha (Torres-Guerrero *et al*, 2017)

Há dois tipos de antimoniais pentavalentes utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, porém só o primeiro é comercializado no Brasil. É preconizada pela Organização Mundial de Saúde a dose de 10-20 mg de  $Sb^{+5}$ /kg/dia por 20 dias para a forma cutânea e a dose de 20 mg de  $Sb^{+5}$ /kg/dia para as formas difusa e mucosa por 20 e 30 dias, respectivamente. As injeções são realizadas por via parenteral (intramuscular ou endovenosa). Os efeitos adversos mais comuns são: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Além disso, na dose de 20 mg de  $Sb^{+5}$ /kg/dia, o antimonial pode causar alterações cardíacas, pancreáticas ou renais (Ministério da Saúde, 2013; Torres-Guerrero *et al*, 2017). Como droga de segunda escolha temos o desoxicolato de anfotericina B, que possui ótima atividade contra a *Leishmania*. É utilizado como fármaco de primeira escolha para gestantes, pois o antimonial pentavalente é altamente tóxico ao feto. O esquema de tratamento preconizado é de 1 mg/kg/dia administrado, por via endovenosa, em dias alternados até uma dose total 25 a 40 mg/kg. Os efeitos adversos são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia, flebite no local da infusão, anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (Ministério da Saúde, 2013; Torres-Guerrero *et al*, 2017). Há também a anfotericina B lipossomal, que é usada para leishmaniose visceral, porém seu uso

para leishmaniose tegumentar não foi aprovado, sendo utilizada no caso em que todas as outras opções terapêuticas não tenham sido eficazes ou tenham sido contraindicadas (*off label*). Neste caso é administrada na dose de 1-4 mg/kg/dia, por infusão venosa. Possui efeitos adversos como febre, cefaléia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios, flebite no local da infusão e dor lombar. As pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) também são drogas de segunda escolha. A dose recomendada é de 4 mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, em dias alternados. Os efeitos adversos compreendem dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaléia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Há possibilidade de gerar diabetes mellitus a partir da administração da dose total de 1 grama (Ministério da Saúde, 2013; Torres-Guerrero *et al*, 2017).

#### **1.4 Vacina**

Apesar de inúmeros esforços, até dado momento não se encontra disponível uma vacina segura e eficaz para leishmaniose. Tentativas vêm sendo realizadas ao longo do tempo buscando uma imunização contra *Leishmania*. Em 1937, na União Soviética, e posteriormente em Israel, foram feitas tentativas de vacinação em massa de humanos com parasitos vivos, ambos proporcionando alto grau de proteção, essa prática foi conhecida como “leishmanização”. Porém, esse tipo de vacinação com parasitos vivos pode acarretar diversos problemas como desenvolvimento de lesões, exacerbação de psoríase e outras doenças de pele e até imunossupressão, o que tornou inviável o uso da vacina. (Handman, 2001; Silva *et al*, 2013).

O estudo com parasitos mortos foi o que substituiu a leishmanização. Os ensaios para este tipo de vacinação foram conduzidos desde 1940 e foi primeiramente realizada por pesquisadores brasileiros. Mayrink e colaboradores (1970) desenvolveram uma vacina com isolado de 4 espécies de *Leishmania*, depois simplificado para uma única espécie, composta por isolado morto de *L. amazonensis*, que se mostrou segura e foi testada como medida profilática na Colômbia e no Equador, porém a mesma não mostrou eficácia (Nagil & Kaur, 2011). A vacina desenvolvida por Mayrink foi efetiva em reduzir a dose do antimonial necessária para atingir a cura e baseando-se nos testes realizados a vacina foi

registrada (Leishvacin®) para se administrada junto com a terapia com antimonial no Brasil, mas não como medida profilática (Khamesipour *et al*, 2006).

Convit e seu grupo na Venezuela (1987) utilizaram cepas de *L. mexicana* autoclavadas em associação com BCG como adjuvante para imunoterapia e/ou imunoquimioterapia. Vários estudos profiláticos foram realizados, mas se tornaram inconclusivos ou com baixos resultados de proteção (Khamesipour *et al*, 2006).

O que temos, atualmente, são diversos tipos de preparados em estágios mais ou menos avançados de teste como parasitos mortos; vacinas de subunidades, frações purificadas, recombinantes ou modificados ou atenuados geneticamente; e vacinas a base de DNA (Handman, 2001; Birnbaum & Craft, 2011), cada qual mostrando algum grau de proteção.

Um estudo de McAtee e colaboradores (2016) com proteína purificada mostrou uma redução na carga parasitária e aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$ . Utilizou-se a LdNH36, uma proteína purificada advinda de *L. donovani*, que vem sendo identificada por induzir imunidade protetora cruzada e resposta específicas aumentadas de células T CD4+ e CD8+. Camundongos BALB/c foram imunizados com três doses, por via intradérmica, com LdNH36 associada ou não ao adjuvante glicopiranosil lipídio (GLA-SE) e como controle foram utilizados apenas o adjuvante ou salina. Os animais foram desafiados com *L. mexicana* por via subcutânea duas semanas após a última imunização. A análise dos resultados mostrou que os grupos imunizados com a proteína associada ao adjuvante apresentaram um número significativamente maior de células produtoras de IFN- $\gamma$  e carga parasitária significativamente menor. O tamanho das lesões dos animais imunizados apresentou uma tendência à diminuição em relação ao controle que, no entanto, não apresentou diferença estatística.

O grupo de Maspi *et al* (2017) realizou um estudo com vacina de DNA, utilizando genes específicos: Fator de Iniciação eucariótica de *Leishmania* (LeIF) e Antioxidante Tiol-específico (TSA). Esses genes são conhecidos, respectivamente, por induzir produção de citocinas de perfil Th1; e por estar presente tanto na forma amastigota quanto na promastigota, além de estar associado à proteção contra leishmaniose em modelo murino. Foi realizada a imunização de camundongos da linhagem BALB/c, por via intramuscular com plasmídeos codificando LeIF, TSA, LeIF-TSA e como grupo controle foram usados pEGFP-N1 (plasmídeo vazio) e PBS. Os animais foram desafiados com promastigotas de *L. major* por via subcutânea. Essa imunização conferiu uma imunidade parcial aos camundongos. Este mesmo

grupo (Maspi *et al*, 2017) fez um trabalho similar com LelF e TSA, só que adicionando o antígeno LACK (homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada). Esta é uma proteína conservada expressa em ambas formas de *Leishmania* de diferentes espécies, essencial para a viabilidade do parasito e seu estabelecimento no hospedeiro (Hammoudeh *et al*, 2014). A imunização foi realizada com os genes isolados, fusionados ou em um *cocktail*. Tanto os camundongos BALB/c imunizados com o *cocktail* de genes quanto os imunizados com o plasmídeo com genes fusionados apresentaram aumento na produção de IFN- $\gamma$  e média das lesões significativamente menores do que os outros grupos imunizados com genes isolados ou LelF, respectivamente (Maspi *et al*, 2017).

Há outros estudos que mostram que antígenos brutos de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* possuem efeito protetor contra infecção por *Leishmania*. Foi observado, em estudo *in vitro*, que extratos totais de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* desencadearam uma resposta proliferativa e produção de IFN- $\gamma$  mais altas em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose tegumentar por *L. braziliensis* em comparação aos controles sadios e as PBMC estimuladas por antígenos particulados ou solúveis de *L. braziliensis* (Telino *et al*, 2006).

Foi demonstrado por Pinto *et al* (2003) que a imunização oral com o antígeno total de promastigotas de *L. amazonensis*, em duas doses, conferiu aos camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 mais resistência a infecções subsequentes deste protozoário. Outro estudo do mesmo grupo, demonstrou que a vacinação por via intranasal com o extrato de *L. amazonensis* conferiu proteção duradoura contra a infecção homóloga do parasito em modelo murino da linhagem BALB/c (Pinto *et al*, 2004).

Em um estudo realizado por Grenfell e colaboradores (2010) foi observado que, em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* (sin. *L. infantum*), a imunização com o extrato total de promastigotas de *L. braziliensis* induziu uma significativa redução da carga parasitária no fígado, enquanto o extrato total de promastigotas de *L. amazonensis* induziu uma diminuição da carga parasitária no fígado e no baço.

Em 2016, foi realizada por Pratti e colaboradores, um trabalho com imunização de camundongos da linhagem C57BL/6 com duas doses de extratos totais de *L. amazonensis* (LaAg), associado ou não ao adjuvante ADDAVAX®, por via intranasal. Uma semana após a última dose, os animais foram desafiados com a



espécie homóloga por via subcutânea. Os animais imunizados com o LaAg mostraram produção mais alta de IFN- $\gamma$  e lesões significativamente menores no decorrer do desenvolvimento da infecção e a carga parasitária significativamente menor. O adjuvante neste trabalho não potencializou o efeito de LaAg.

Atualmente há um estudo de Sanches *et al* (2017), onde o grupo imunizou camundongos BALB/c, por via subcutânea, com duas doses de antígenos totais de *L. amazonensis* em associação ao adjuvante ácido poliinosínico-policitidílico [Poly(I:C)] [TLA-Poly(I:C)]. Após a segunda dose os camundongos foram desafiados com promastigotas da espécie homóloga pela mesma via. Pôde então ser observado que os animais imunizados com TLA-Poly(I:C) tiveram uma produção significativamente maior de IFN- $\gamma$  do que o grupo imunizado apenas com o antígeno total. Em relação ao diâmetro das patas e ao grau inflamatório na análise histopatológicas das mesmas, foi observado que o grupo imunizado com antígenos totais em associação ao adjuvante possuíam, respectivamente, lesões e grau inflamatório significativamente mais baixos, assim como a carga parasitária.

Levando em consideração os resultados satisfatórios com antígenos totais, foi considerado que uma vacina com o extrato integral do parasito seria o ideal para este estudo, com a participação dos componentes do parasito mais semelhante com a infecção natural, já que na infecção experimental, não atua apenas uma proteína isolada. Sendo assim, o foco deste estudo é avaliar a capacidade protetora e imunogênica de extratos totais de promastigotas mortas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, com e sem o adjuvante CpG-ODN no modelo murinho.

## 1.5 Adjuvante

Quando algum tipo de ameaça consegue adentrar as barreiras externas de proteção do corpo do hospedeiro, mecanismos de defesa são ativados contra essa infecção e a resposta imune inata é a primeira a ser requisitada. As células do sistema imune inato reconhecem estruturas moleculares conservadas comuns a diversos tipos de patógenos, os chamados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs), estes por sua vez são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como os receptores Nod-Like (NLRs), RIG-I-like (RLRs) e Toll-like (TLRs) (Bode *et al*, 2011). Quando estimulados, os TLRs,

induzirão a produção de citocinas pró-inflamatórias e reativos intermediários de nitrogênio que atuarão para ativação da resposta inata (Coelho-Castelo *et al*, 2009).

Assim, os PAMPs são utilizados como adjuvantes para modular uma resposta imune (Leleux, Pradhan & Roy, 2017). A utilização deste pode potencializar a atividade de uma vacina (Birnbaum & Craft, 2011; Srivastava *et al*, 2013). No caso da leishmaniose tegumentar, o direcionamento de uma resposta protetora se iniciaria através do reconhecimento pelo receptor toll-like 9 (TLR-9) que orienta para uma resposta com produção de citocinas de perfil Th1 (Srivastava *et al*, 2013). Oligodesoxinucleotídeo rico em motivos CpG (CpG-ODN) é um adjuvante que já possui capacidade de estimular células do sistema imune inato a produzir citocinas de perfil Th1, prover uma proteção mais potente e duradoura, além de ser reconhecido pelo TLR-9 (Bode *et al*, 2011). O CpG-ODN compreende sequências de DNA que contêm bases de citosina e guanina, encontradas normalmente em procariotos, e que induzem uma forte influência na resposta imunológica (Mohan, Verma & Rao, 2013), quando administrado em conjunto com antígenos influenciam na imunogenicidade do composto (Klinman, 2004). Trabalhos mostraram que este adjuvante produziu efeito protetor na infecção por *Leishmania*.

Stacey & Blackwell (1999) imunizaram camundongos BALB/c com antígenos solúveis de *Leishmania major* (SLA) associado a CpG e desafiados com a espécie homóloga. Animais imunizados com SLA associado ao CpG apresentaram redução do diâmetro das patas comparado aos camundongos vacinados apenas com SLA e aumentou a sobrevivência dos animais em comparação ao grupo não vacinado.

O grupo de Walker e colaboradores (1999) testou diferentes CpG-ODN (1826, 1911, 1758 e 1835) e observaram que o CpG-ODN 1826 conferiu melhor proteção a camundongos BALB/c quando combinados com antígenos totais de *L. major* e desafiados com a espécie homóloga além de induzir produção de citocinas de perfil Th1.

Ramirez *et al* (2014) imunizaram camundongos BALB/c com antígenos recombinantes de *L. major* (LmL3 e LmL5) em associação ao CpG e desafiaram com *L. chagasi* (= *infantum*) ou *L. amazonensis*. Os animais vacinados mostraram um perfil de resposta Th1 contra os antígenos testados. A imunização retardou o desenvolvimento da lesão e controlou a carga parasitária no local da infecção no desafio com *L. amazonensis*, e apresentou redução na carga parasitária nos linfonodos de drenagem, no fígado e no baço quando desafiados com *L. chagasi* (= *infantum*).

Já Katebi e colaboradores (2015) utilizaram uma espécie de *Leishmania* não patogênica (*L. tarentolae*) recombinante secretora de PpSP15 (molécula presente na saliva do flebotomo *Phlebotomus papatasi*) associada ao adjuvante CpG para imunizar camundongos BALB/c. A vacina aprimorou a resposta imune contra *L. major*. Puderam ser observadas no grupo vacinado patas com diâmetros menores do que o grupo controle e o grupo imunizado sem adjuvante, além de uma carga parasitária reduzida.

## 1.6 Justificativa

Diversas estratégias têm sido seguidas para a obtenção de vacinas contra as leishmanioses, mas até o momento não se dispõe de um produto com eficácia comprovada em humanos. Devido aos fatores já citados, a problemática do tratamento em conjunto com os casos de resistência e a falta de eficiência nas medidas de controle, uma vacina seria um meio mais eficaz e seguro que propiciaria a forma mais abrangente e econômica de controle destas endemias (Mutiso *et al.* 2013).

Considerando-se a diversidade de espécies de *Leishmania* capazes de causar doença humana, uma questão fundamental que se coloca para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses é se a mesma vacina poderá proteger contra diferentes espécies do parasito. Esta questão foi abordada no presente projeto que visou a contribuir para a compreensão de mecanismos de imunoproteção, para a identificação de extratos candidatos a vacina e a avaliação da imunidade produzida por antígenos homólogos e heterólogos na leishmaniose cutânea murina experimental causada por *L. amazonensis*. Esta espécie é uma das principais espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil e responsável pelos casos da forma de leishmaniose difusa, que não possui tratamento eficaz até dado momento (Ministério da Saúde, 2013).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia protetora e imunogenicidade de extratos totais de promastigotas mortas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, com e sem o adjuvante CpG-ODN (oligodesoxinucleotídeos ricos em motivos CpG), no modelo murino de leishmaniose cutânea experimental causada por *L. amazonensis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia protetora da imunização com extratos totais de promastigotas mortas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* na infecção experimental por via subcutânea de camundongos com *L. amazonensis* através do acompanhamento da evolução clínica e quantificação da carga parasitária;

- Caracterizar o perfil de citocinas presente na resposta imune anti-*Leishmania* associada à proteção conferida pela imunização com os extratos vacinais associados ou não ao adjuvante;

- Comparar a proteção conferida pela imunização com os extratos homólogos e heterólogos.

- Avaliar a eficácia do CpG-ODN como adjuvante frente a infecção experimental murina por *L. amazonensis*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 fêmeas entre seis e oito semanas de idade, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz. Os animais foram mantidos em microisoladores de polissulfona acoplados a *racks* estéreis ventilados, equipados com filtros de entrada e saída de ar (Alesco), com temperatura controlada ( $21 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas nos biotérios dos Pavilhões Leônidas Deane e Helio e Peggy Pereira do IOC. Foram mantidos cinco camundongos por microisolador em maravalha de pinus autoclavada, receberam ração peletizada (Nuvilab CR-1 autoclavável, marca Nuvital) e água autoclavada *ad libitum*. O protocolo de experimentação foi licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) para execução entre 1/1/2015 e 1/1/2019 - Licença LA-005/2014.

#### 3.2 Parasitos

Foram utilizadas cepas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), fornecidas pela coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz. Os parasitos, *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, foram inoculados em camundongos C57BL/6 (por via subcutânea) ou BALB/c (por via intradérmica) fêmeas, respectivamente. Após um período em torno de três meses (*L. amazonensis*) ou um mês (*L. braziliensis*), os parasitos foram isolados das lesões e cultivados em meio de cultura Schneider (pH 7,2; Sigma) suplementado com antibióticos (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina; Sigma) e 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e 2% de urina humana (no caso da *L. braziliensis*) com o número máximo de seis passagens.

#### 3.3 Antígenos

Para a obtenção dos antígenos totais de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, promastigotas de fase estacionária de cultura foram obtidas e submetidas a dez ciclos de congelamento e descongelamento (-196 °C e 37 °C, respectivamente) e

sonicadas em equipamento de ultrassom (Unique) por 15 minutos (110 Watts). Após esse procedimento foi realizada a dosagem de proteínas baseado em leitura de densidade ótica e lida em dois comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm de acordo com o protocolo de quantificação do equipamento (GeneQuant pro, Amersham Bioscience), que faz o cálculo da correção para dosagem estimada. A concentração de cada preparação foi ajustada para 1 mg/mL de proteína em PBS.

### **3.4 Imunização**

Camundongos foram inoculados com extratos totais de promastigotas mortas de *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb) ou salina tamponada (PBS), com ou sem adjuvante CpG-ODN (ODN 1826, InvivoGen). Os antígenos e o adjuvante foram utilizados na concentração de 1 µg/µl. As imunizações foram feitas com 25 µg de antígeno associado a 25µg de PBS ou 25µg de antígeno associado a 25 µg de adjuvante em um volume total de 0,05 ml por via subcutânea no coxim plantar. Foram realizadas duas inoculações das seguintes preparação (PBS, CpG, La, Lb, La + CpG, Lb + CpG) em cada grupo com duas semanas de intervalo entre elas.

Inicialmente, a imunização era realizada no coxim plantar esquerdo, a partir do experimento 4.3, as imunizações passaram a ser no coxim plantar direito.

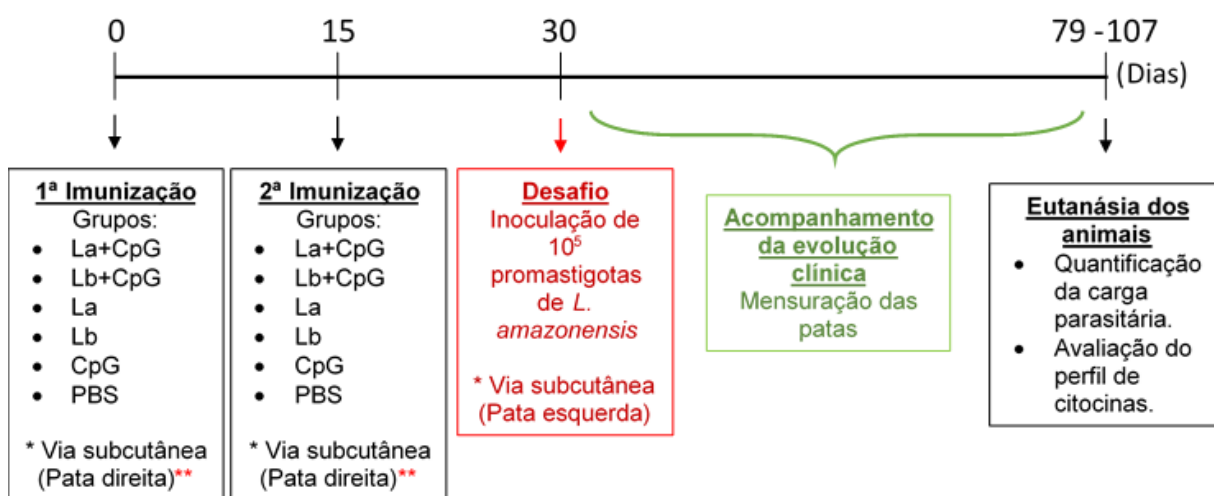
### **3.5 Infecção experimental de camundongos**

Os animais foram infectados com  $10^5$  promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* em um volume de 0,05 ml de PBS por via subcutânea no coxim plantar traseiro esquerdo.

### **3.6 Desenho experimental**

No dia zero, foram separados seis grupos com cinco camundongos em cada. Cada grupo foi inoculado com uma preparação: La-CpG, Lb-CpG, La, Lb, CpG ou PBS por via subcutânea na pata direita. Inicialmente, a imunização era realizada na pata esquerda, porém a partir do terceiro experimento passou a ser realizada na pata direita. Duas semanas após a primeira imunização, cada grupo recebeu uma

dose reforço do preparado recebido da primeira imunização. Quatro semanas após a primeira imunização, os camundongos foram desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea na pata esquerda. Foi realizado um acompanhamento da evolução clínica, por mensurações semanais das patas, por até 11 semanas. O período de eutanásia de cada experimento variou entre sete e 11 semanas, para quantificação de carga parasitária e avaliação do perfil de citocinas (Figura 3.1). Essa variação foi devido a problemas que atrasaram o estudo e ao curto prazo para realização dos experimentos.



**Figura 3.1 – Desenho experimental.** Protocolo experimental para imunização e desafio *in vivo*.

### 3.7 Acompanhamento do desenvolvimento das lesões

Após a infecção subcutânea, o desenvolvimento das lesões foi monitorado semanalmente através da medida do diâmetro da pata infectada com um paquímetro digital (Mitutoyo). O valor foi expresso pela média da diferença das patas infectadas em comparação com a patas contralaterais. Este acompanhamento durou entre sete e 11 semanas.

### 3.8 Quantificação da carga parasitária

Entre sete e 11 semanas os animais foram eutanasiados para a quantificação da carga parasitária, individual, através das seguintes técnicas:

- Análise de diluição limitante: realizada segundo metodologia descrita por Belkaid *et al* (2000). A lesão da pata infectada foi retirada e homogeneizada em *grinder*, e diluída serialmente em placa de 96 poços de fundo chato contendo meio Schneider suplementando com L-glutamina (0,2 M), antibióticos (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina; Sigma) e 10% de soro fetal bovino na proporção de 1/10. O número de parasitos viáveis nos tecidos foi determinado pela diluição mais alta em que as promastigotas foram evidenciadas após sete dias de incubação (estufa B.O.D., FANEM, modelo 347) a 26 °C. O resultado foi calculado na fórmula abaixo e expresso em log.

$$\text{Número de parasitos} = \text{Diluição inicial} \times \text{Diluição seriada}^{\left( \begin{array}{c} \text{N}^\circ \text{ de poços} \\ \text{positivos} \end{array} \right)}$$

- Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa (qPCR): as reações de PCR foram precedidas de extração de DNA total de amostras dos linfonodos poplíteos. Para isso as amostras foram digeridas em 10 µl de proteinase k (2 mg/mL) em tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 10 mM, EDTA 5 mM e SDS 0,5%). Após a digestão, foram adicionados 500 µl de fenol e as amostras foram centrifugadas (Hettich Universal 320R) a 18600 G à 4 °C por 15 minutos. Posteriormente, a fase superior foi recolhida e a ela foram adicionados 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (23/1) e, novamente, as amostras foram submetidas a centrifugação a 18600 G à 4 °C por 15 minutos. Novamente, a fase superior das amostras foi recolhida, adicionada 1 mL de álcool absoluto e submetida a nova centrifugação por 10 minutos. O líquido foi vertido e os microtubos com os precipitados foram deixados para secar. Depois de secos, foram adicionados 30 µl de água destilada e deixados durante a noite na geladeira. As amostras foram lidas no espectrofotômetro de microvolumes (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) com leituras das absorbâncias a 260nm e posteriormente as concentrações ajustadas em água tipo I estéril para 10 ng/µl.

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 10 µl por poço para preparação da placa, utilizando-se o *kit SYBR® Green* (Applied Biosystems). Cada poço era constituído por 2 µl de amostra mais 8 µl do



mix (primer forward, reverse e SyBR). Foi utilizado o primer kDNA-3 (Weirather *et al*, 2011) na concentração de 5 pmol/μl (0,5 μl de forward primer [GGGTAGGGGCGTTCTGC] – 0,5 μl de reverse primer [CCCGGCCTATTTTACACCAACC] – 5 μl de SyBR – 2 μl de água destilada) e β-actina (Giulietti *et al*, 2001) na concentração de 1 pmol/μl (1 μl de forward primer [AGAGGGAAATCGTGCGTGAC] – 1 μl de reverse primer [CAATAGTGATGACCTGGCCGT]- 5 μl de SyBR – 1 μl de água destilada). Simultaneamente uma curva de concentração foi feita em duplicata com DNA de *L. amazonensis* com concentração de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>5</sup> pg. Posteriormente lida no termociclador (StepOnePlus™, Thermo Fisher Scientific) com os seguintes tempos e temperaturas: 95 °C por 20 segundos, 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos (40 vezes), 95 °C por 15 segundos, seguido de curva de dissociação.

### 3.9 Determinação do perfil de citocinas

O perfil de citocinas associado à imunoproteção foi avaliado em sobrenadantes de células dos linfonodos poplíteos. Os linfonodos foram macerados em malha contendo meio RPMI completo (10% de SFB, penicilina, estreptomicina e l-glutamina) e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C. As células ressuspendidas em RPMI foram contadas com auxílio do corante vital azul de Trypan e ajustadas para a concentração de 2x10<sup>5</sup> células/poço e distribuídas em placas de 96 poços.

As células foram estimuladas ou não com os antígenos em estudo (La) ou com o mitógeno concanavalina A (10 μg/mL, 2 μg/poço), como controle positivo. As placas contendo as células foram incubadas em estufa (Panasonic Healthcare Co. Ltd. COM-19AIC UV-PA) a 37 °C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período as placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e dosado por cytometric bead array utilizando o kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson). As proteínas dosadas foram IL-2, IL4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-17A, e IL-10.

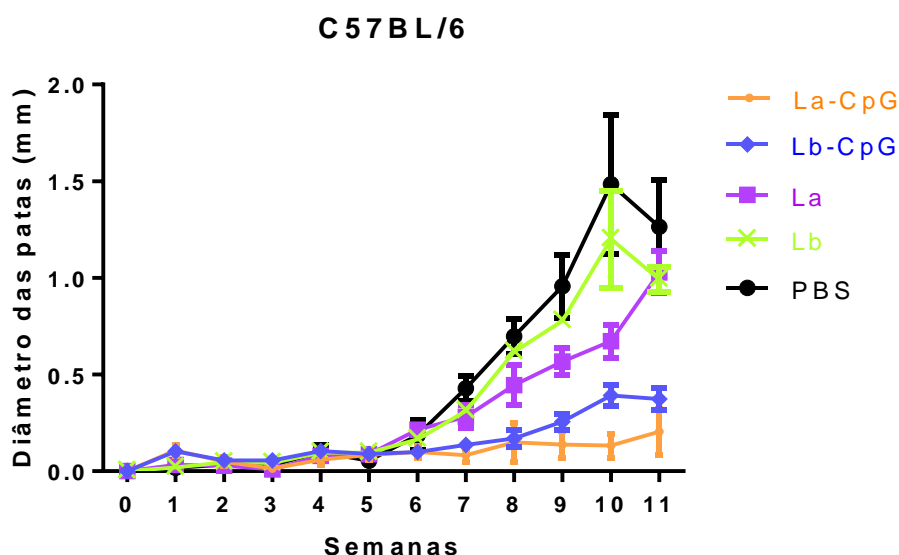
### **3.10 Análise estatística dos resultados**

Foram utilizados testes Two-way ANOVA, Kruskal-Wallis e os pós-testes de Bonferroni e Dunn com o auxílio do programa InStat versão 3.00 (GraphPad). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1: Piloto – Imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c por via subcutânea

Camundongos das linhagens C57BL/6 imunizados com La ou Lb em associação com o adjuvante CpG (La-CpG e Lb-CpG, respectivamente) apresentaram lesões significativamente menores do que o grupo controle (PBS) a partir da oitava semana pós-infecção (Figura 4.1).



**Figura 4.1 - Média da diferença da mensuração da pata de camundongos C57BL/6 desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea em comparação com a pata contralateral.**

Os animais foram imunizados previamente com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*) ou PBS.

- O grupo La-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS desde a sétima semana, Lb desde a oitava semana e La desde a nona semana ( $p \leq 0.05$ ).

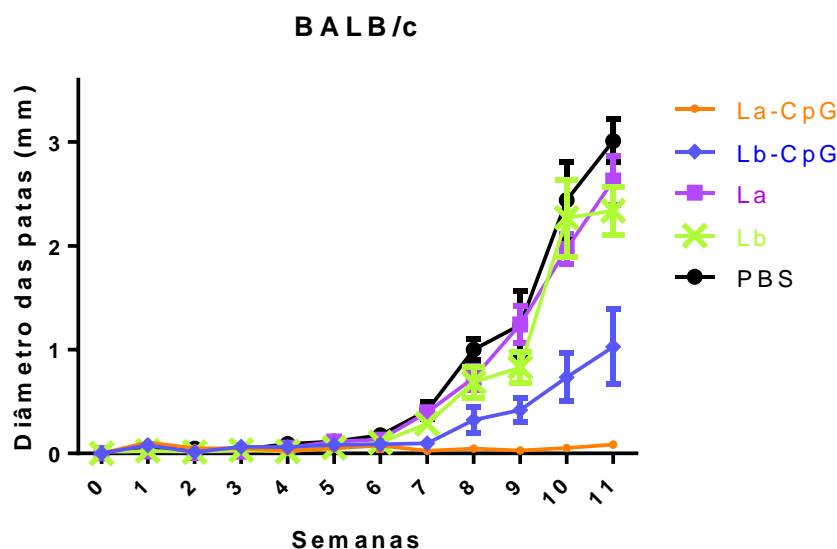
- O grupo Lb-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS e Lb desde a oitava semana e do grupo La na 11ª semana ( $p \leq 0.05$ ).

- O grupo La apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo PBS na nona e na décima semana e de Lb na décima semana ( $p \leq 0.05$ ).

A quantificação da carga parasitária não foi realizada nos camundongos da linhagem C57BL/6, pois a partir da 11ª semana, os valores da mensuração das patas de todos os grupos começaram a convergir. Desta forma decidiu-se então

mantê-los com a finalidade de serem observados nas semanas posteriores até a 17ª semana, quando foram eutanasiados. Neste momento, a única diferença foi entre os grupos imunizados com os extratos associados ao adjuvante e o grupo imunizado com La.

Nos camundongos da linhagem BALB/c, assim como nos da linhagem C57BL/6, também foram observadas lesões significativamente menores nos grupos imunizados com extratos em associação ao adjuvante do que as dos grupos controle por volta da oitava semana. A partir da décima semana a diferença de mensuração observada nas patas dos animais imunizados com antígeno bruto de *L. amazonensis* associado ao adjuvante (La-CpG) foram significativamente menores do que o grupo imunizado com antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante (Lb-CpG) (Figura 4.2).

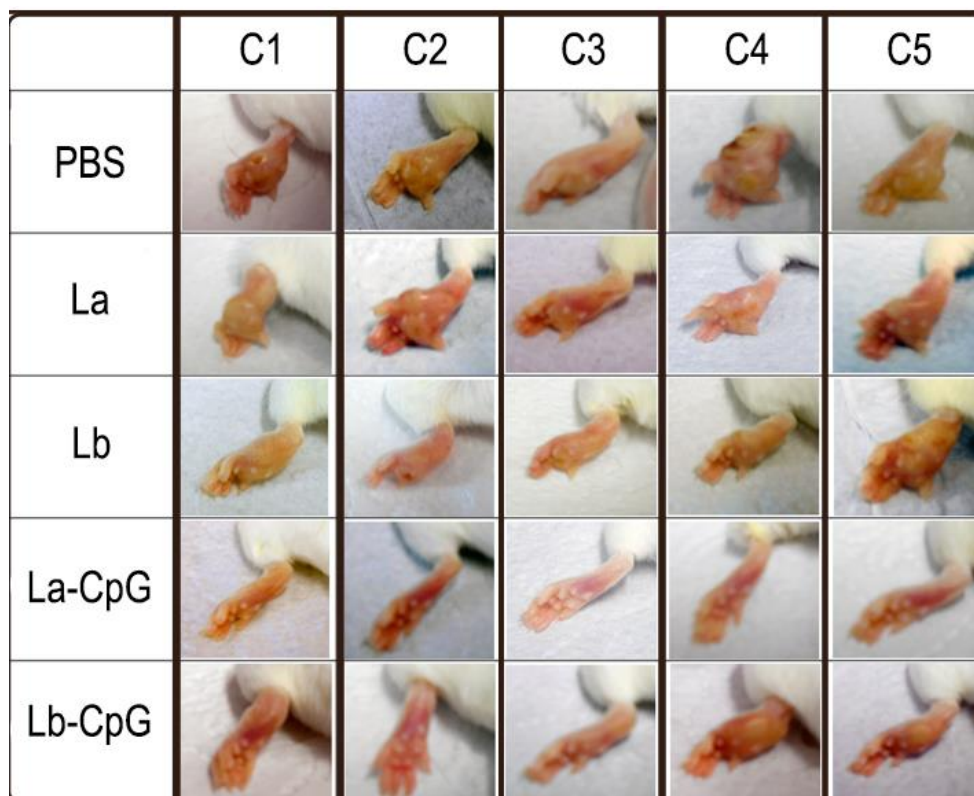


**Figura 4.2 - Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea em comparação com a pata contralateral.**

Os animais foram imunizados previamente com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*) ou PBS.

- O grupo La-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS, La e Lb desde oitava semana e a partir da décima semana mostrou diferença estatística entre todos os grupos ( $p \leq 0.05$ )
- O grupo Lb-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS desde a oitava semana, La desde a nona semana e dos grupos Lb desde a décima semana.
- O grupo Lb apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS na 11ª semana.

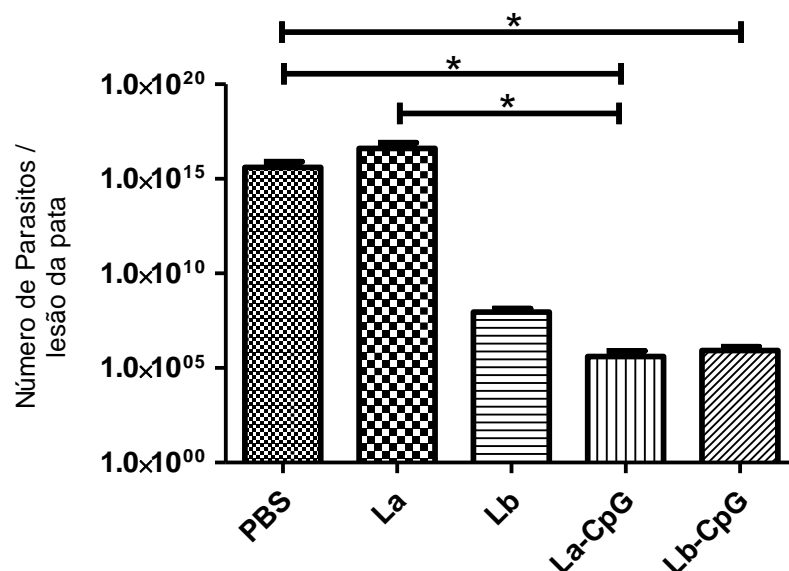
Ao final da 11ª semana de infecção, os diâmetros das patas dos camundongos da linhagem BALB/c imunizados com La-CpG ao adjuvante mostraram-se visivelmente menores quando comparadas às patas dos animais dos demais grupos, não sendo possível detectar macroscopicamente qualquer sinal clínico de lesão (Figura 4.3).



**Figura 4.3 - Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com  $10^5$  promastigotas *L. amazonensis* na 11ª semana após a infecção.**

A figura mostra os cinco animais (C1 a C5) de cada grupo segundo sua imunização: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*) ou PBS.

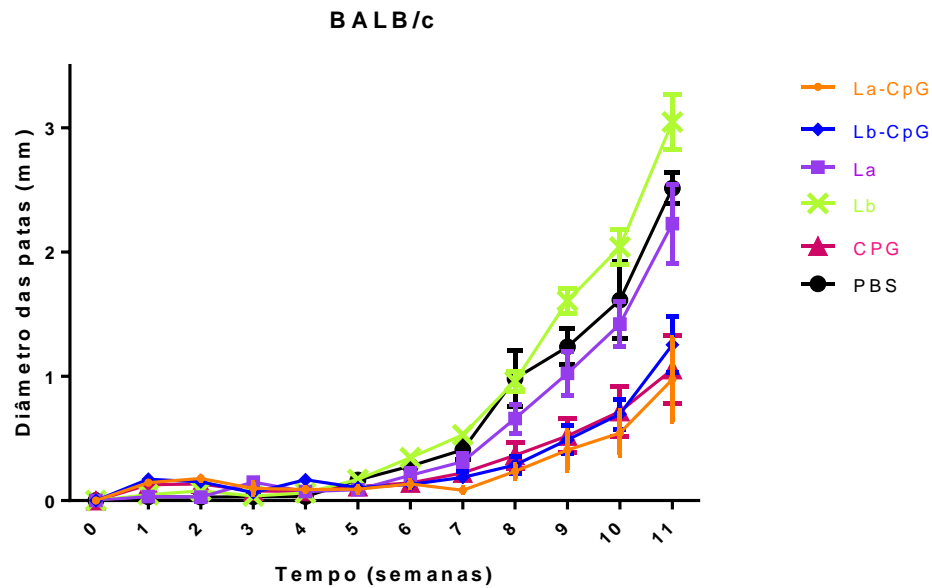
A avaliação da carga parasitária determinada pela análise de diluição limitante (ADL) ao final da 11ª semana de infecção nos animais da linhagem BALB/c mostrou que os grupos de camundongos imunizados com La-CpG ou Lb-CpG apresentaram quantidades menores de parasitos que o grupo controle. Além disso, observou-se que o grupo imunizado com La-CpG apresentou carga parasitária significativamente menor que o grupo imunizado com La (Figura 4.4).



**Figura 4.4 - Carga parasitária da lesão dos camundongos BALB/c desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*.** Os animais foram previamente imunizados com duas doses de: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*) ou PBS. \*  $p \leq 0.05$

## 4.2 Experimento 2: Imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea incluindo grupo CpG

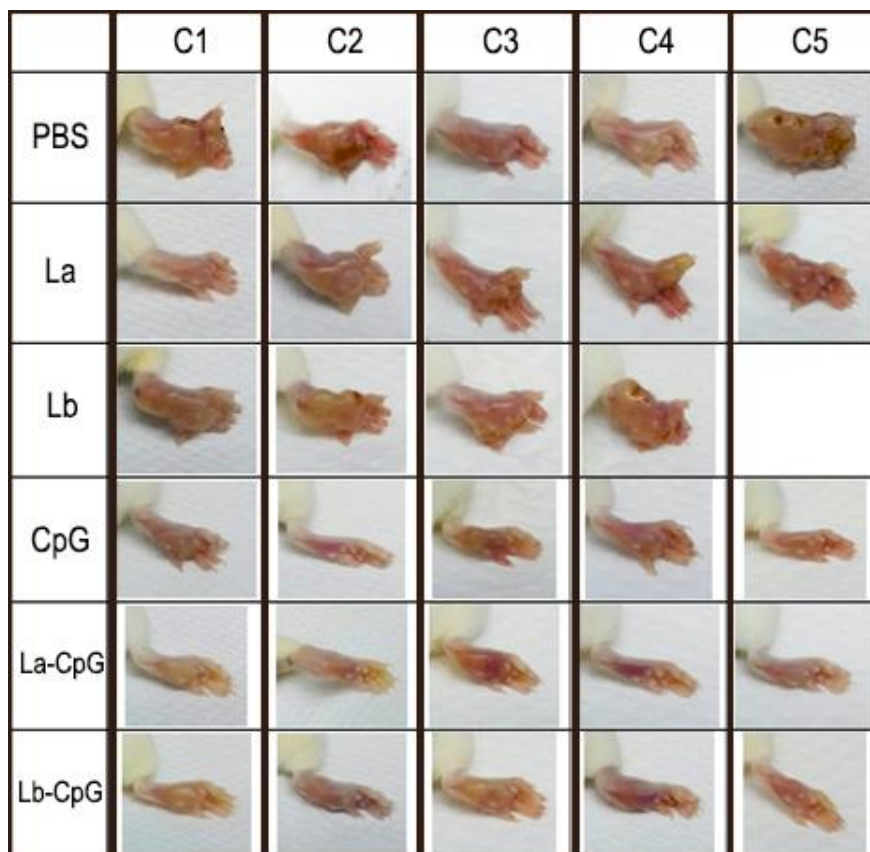
Após estes experimentos iniciais, os protocolos foram repetidos em camundongos BALB/c incluindo um novo grupo controle com animais inoculados somente com o adjuvante CpG e infecção por *L. amazonensis*. Os resultados obtidos nestes experimentos mostraram que camundongos imunizados com os extratos associados ao adjuvante foram os mesmos observados no experimento piloto. Camundongos imunizados com os extratos associados ao adjuvante apresentaram diâmetro das patas significativamente menores do que os demais grupos, mas, inesperadamente, isso não foi observado em relação ao grupo de animais inoculados apenas com adjuvante (Figura 4.5). As lesões dos animais dos grupos imunizados com os extratos associados ao adjuvante possuíam lesões macroscopicamente menores que as dos animais do grupo controle PBS (Figura 4.6).



**Figura 4.5 - Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea em comparação com a pata contralateral.**

Os animais foram imunizados previamente com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS. - Os grupos imunizados com La-CpG, Lb-CpG e CpG apresentaram patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS e Lb desde a oitava semana e do grupo La desde a nona semana ( $p \leq 0.05$ ).

- O grupo imunizado com La ou inoculado com PBS apresentaram patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo Lb desde a nona semana e na 11ª semana, respectivamente ( $p \leq 0.05$ ).

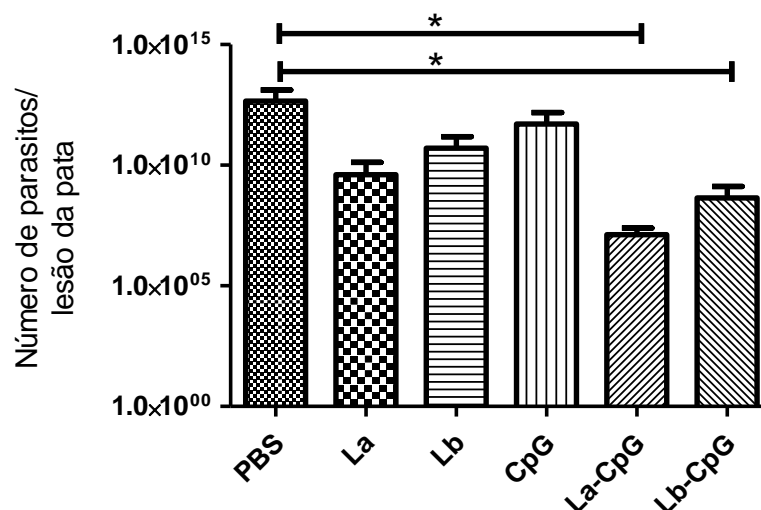


**Figura 4.6 - Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com  $10^5$  promastigotas *L. amazonensis* na 11ª semana após a infecção.**

A figura mostra os 5 animais (C1 a C5) de cada grupo segundo sua imunização: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS.

Observou-se, também, que a carga parasitária determinada por ADL na 11ª semana de infecção nos camundongos imunizados com La-CpG ou Lb-CpG apresentou níveis de parasitos significativamente mais baixos que os observados no grupo inoculado com PBS. Entretanto, o grupo imunizado apenas com CpG, apesar de apresentar medidas de lesões significativamente menores que os animais do grupo controle (PBS) não mostrou diferença significativa em relação a carga parasitária (Figura 4.7).



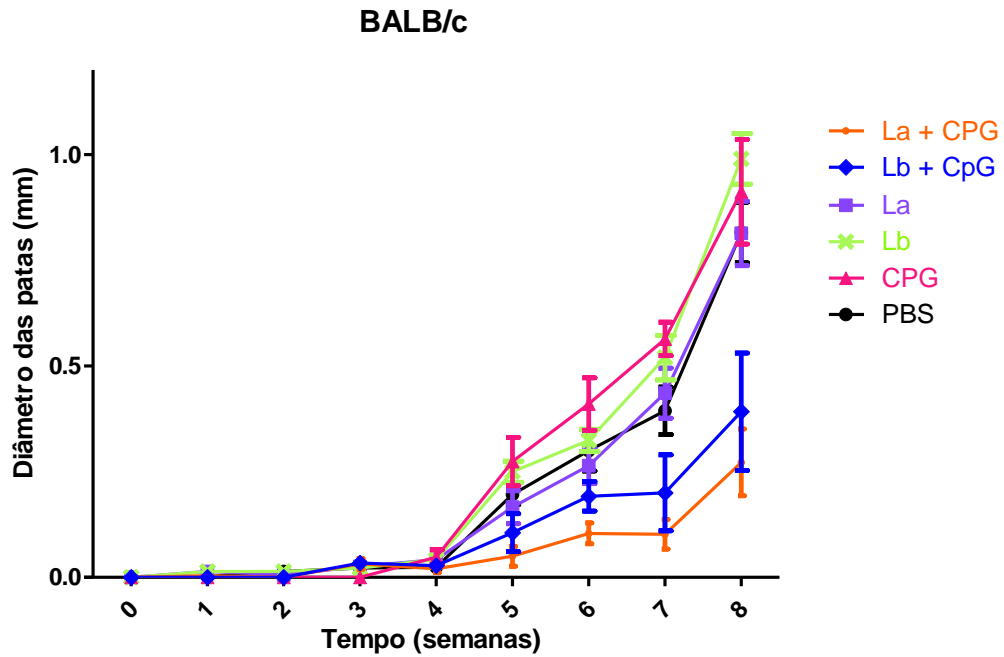


**Figura 4.7 - Carga parasitária da lesão dos diferentes grupos de camundongos BALB/c desafiados com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. amazonensis*.**

Os animais foram previamente imunizados com duas doses de: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS.  
\* p≤0.05

### 4.3 Experimento 3: Imunização de camundongos BALB/c e determinação de carga parasitária por PCR

Os mesmos grupos foram estabelecidos, repetindo o mesmo protocolo de imunização com o posterior desafio dos animais com 10<sup>5</sup> formas promastigotas de *L. amazonensis*. Porém, neste experimento, a imunização foi realizada na pata contralateral a da infecção. A progressão da doença foi avaliada semanalmente por meio das medições das patas infectadas comparadas com as patas contralaterais normais não infectadas e, como nos experimentos realizados anteriormente, observou-se que nos grupos imunizados com La e Lb associados ao adjuvante CpG, as lesões se apresentaram significativamente menores que as dos demais grupos (Figura 4.8). E dessa vez, o grupo inoculado apenas com adjuvante não apresentou proteção. Assim como nos experimentos anteriores, as lesões dos animais dos grupos La-CpG se apresentaram macroscopicamente menores (Figura 4.9),



**Figura 4.8 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea em comparação com a pata contralateral.**

Os animais foram imunizados previamente com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS.

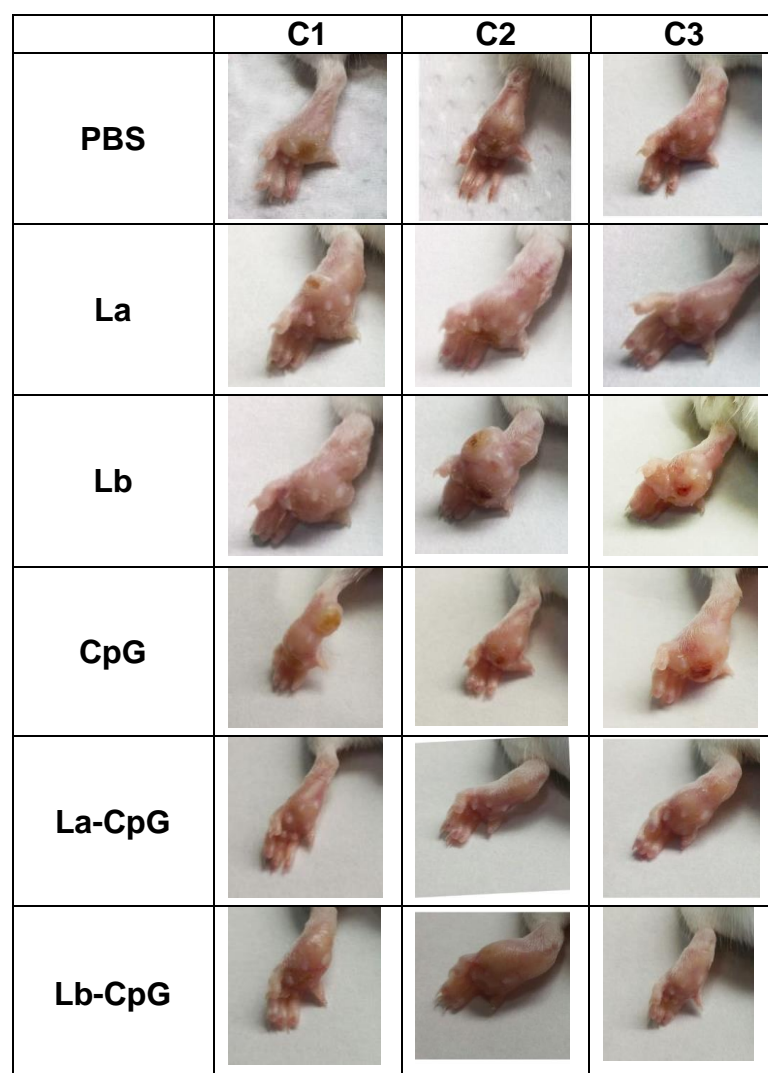
- O grupo imunizado com La-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos Lb e CpG desde a quinta semana; PBS desde a sexta semana; e que o grupo La desde a sétima semana.

- O grupo imunizado com Lb-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos CpG desde a quinta semana; La, Lb e PBS desde a sétima semana.

- O grupo imunizado com PBS apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo Lb na oitava semana.

- O grupo inoculado com PBS apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo CpG na sétima semana.

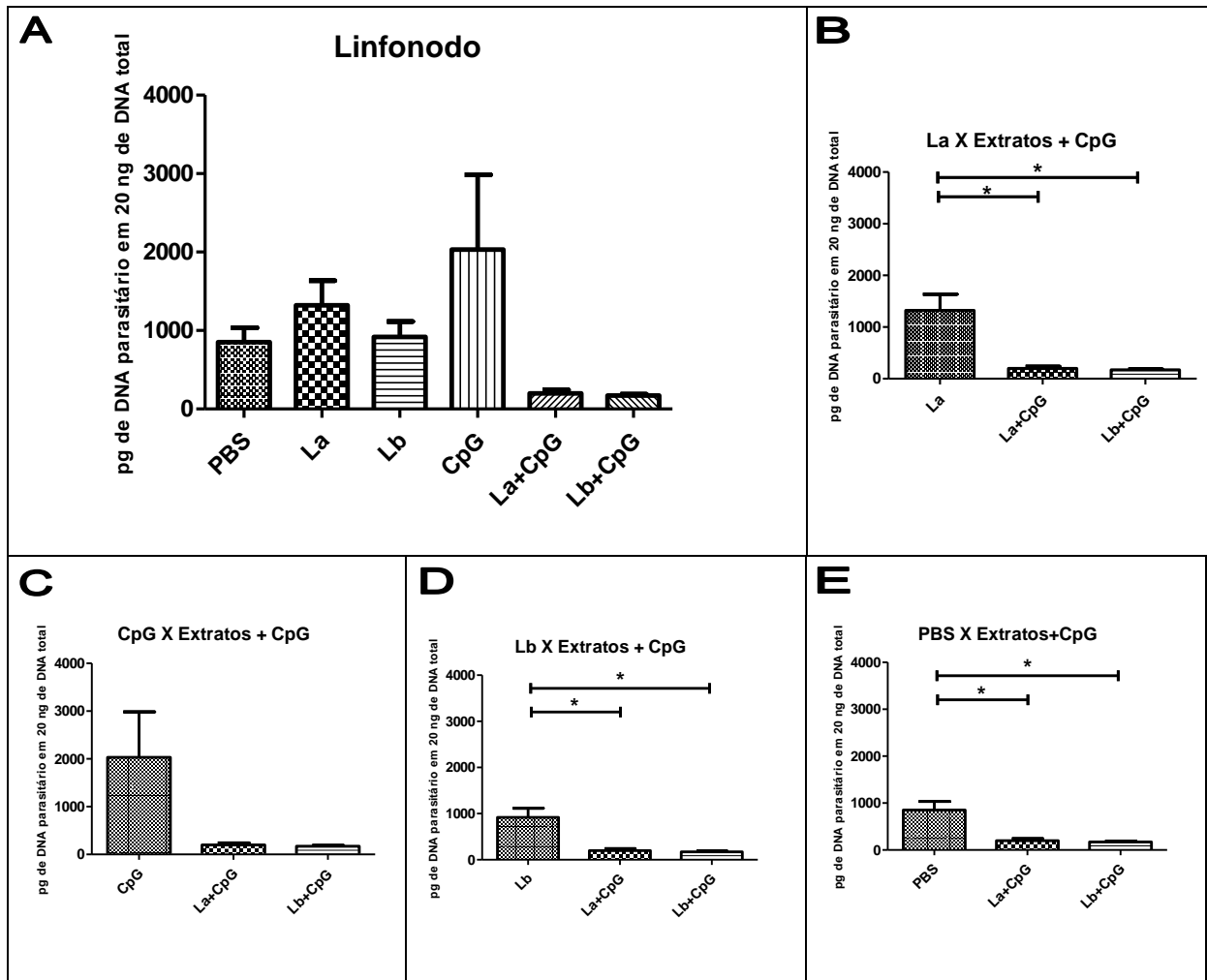
- O grupo imunizado com La apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo Lb na oitava semana.



**Figura 4.9 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com *L. amazonensis* na 8ª semana após a infecção.**

A figura mostra os 3 animais (C1 a C3) de cada grupo segundo sua imunização: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*), CpG ou PBS.

A carga parasitária nesse experimento foi determinada por PCR (Figura 4.10). Foi observado que, apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos numa análise geral, nota-se uma tendência de um nível mais baixo de parasitos, quando os grupos La-CpG e Lb-CpG foram comparados com os demais grupos (La, Lb e PBS) separadamente. Porém, pôde ser observada menor quantidade de DNA do parasito nos grupos imunizados com extratos em associação ao adjuvante, mas não foi vista diferença em relação ao grupo CpG (Figura 4.10).



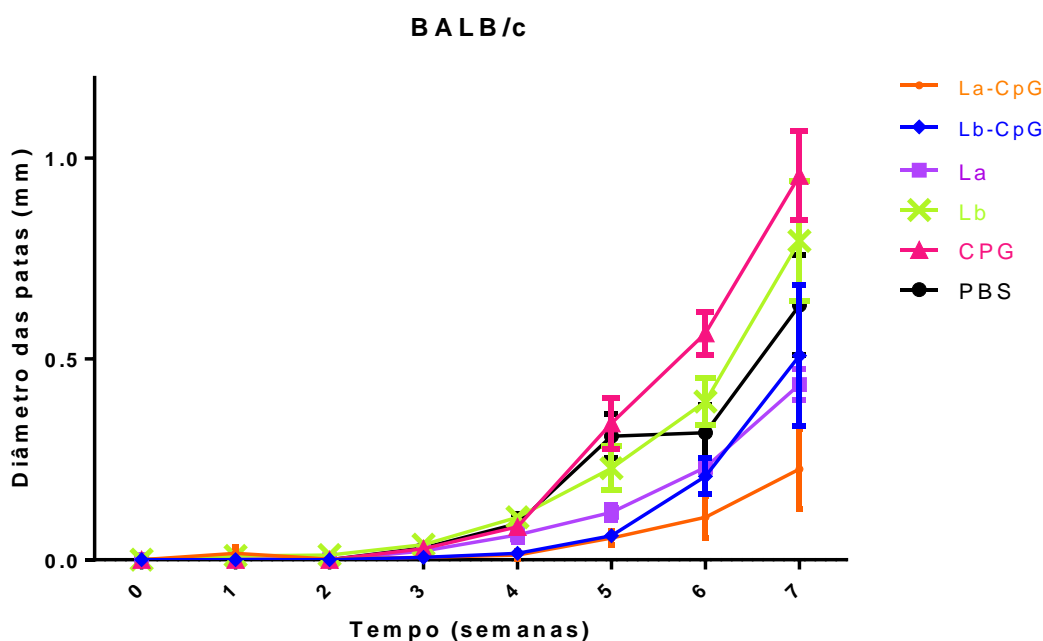
**Figura 4.10 - Carga parasitária no linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c.**

Os animais foram imunizados com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*), CpG ou PBS. Posteriormente, os camundongos foram desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* comparando os extratos associados ao adjuvante (La-CpG e Lb-CpG) com todos os outros grupos (A), apenas com La (B), apenas com CpG (C), apenas com Lb (D) ou apenas com PBS (E). \*  $p \leq 0.05$

#### 4.4 Experimento 4: Imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea e avaliação do perfil de citocinas

Foi realizado o último experimento, em camundongos da linhagem BALB/c, com os mesmos grupos estabelecidos anteriormente. Os animais receberam as duas doses de imunização e foram desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L.*

*amazonensis* e foram acompanhados pela medição semanal das patas por sete semanas. Na quinta semana, os grupos de animais imunizados com antígeno associado ao adjuvante se mostraram significativamente diferentes dos grupos controle, PBS e CpG. E na sétima semana, os camundongos imunizados com La-CpG apresentaram diâmetro de patas significativamente menores do que todos os grupos, incluindo Lb-CpG, que só apresentou diferença dos grupos imunizados com Lb ou CpG (Figura 4.11)



**Figura 4.11 – Média da diferença da mensuração da pata de camundongos BALB/c desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea em comparação com a pata contralateral.**

Os animais foram imunizados previamente com duas doses de La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS.

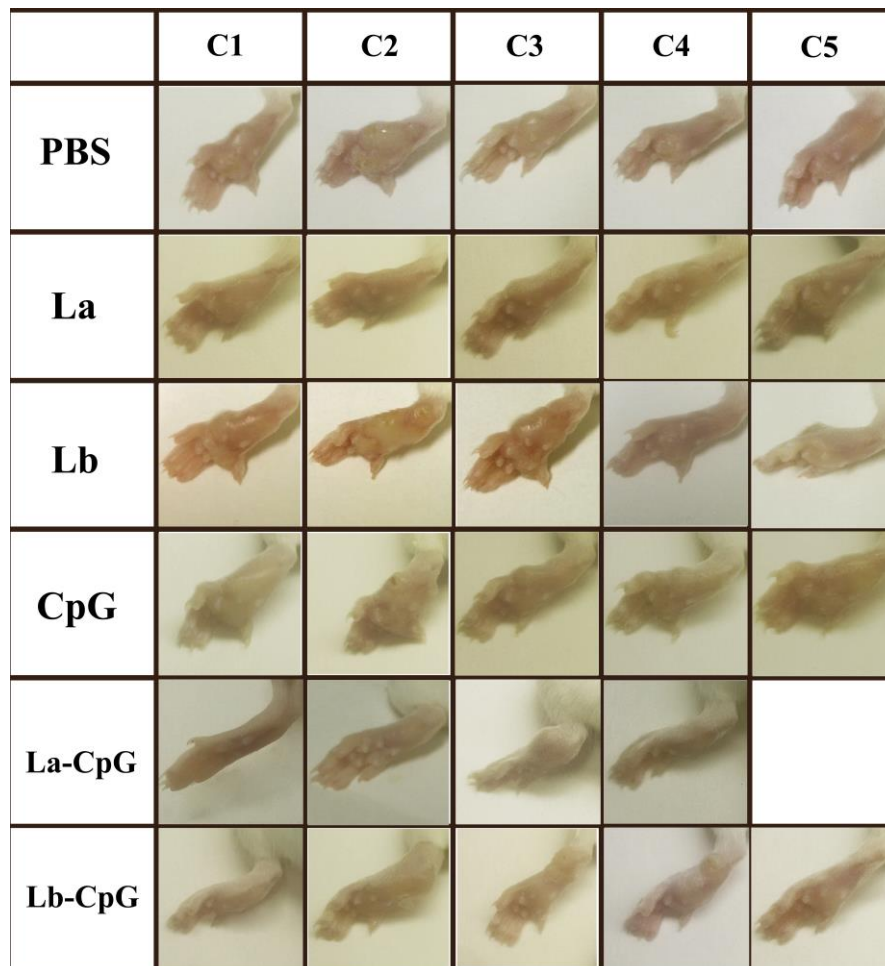
- O grupo imunizado com La-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS e CpG desde a 5ª semana; Lb desde a 6ª semana; e que os grupos La e Lb-CpG na 7ª semana.

- O grupo imunizado com Lb-CpG apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos PBS e CpG desde a 5ª semana e Lb na 7ª semana.

- O grupo imunizado com La apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que os grupos CpG desde a 5ª semana e Lb na 7ª semana.

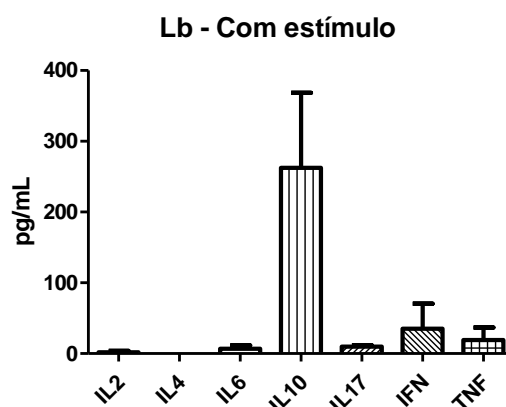
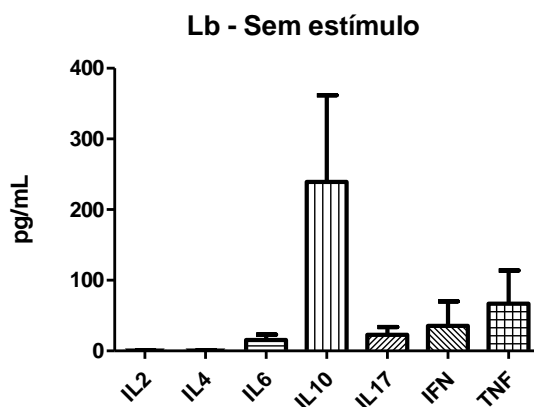
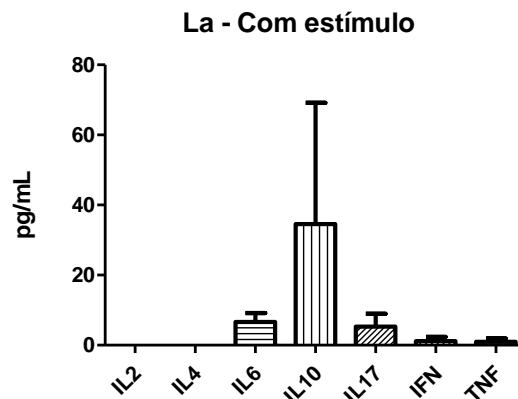
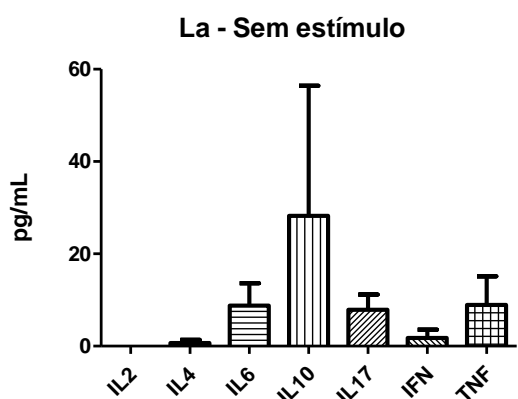
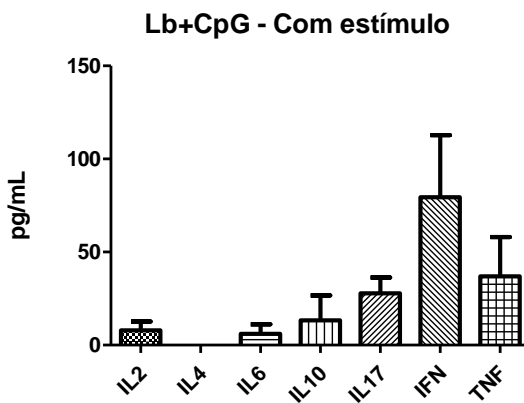
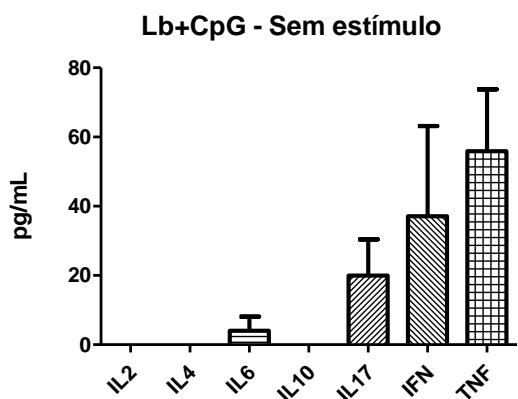
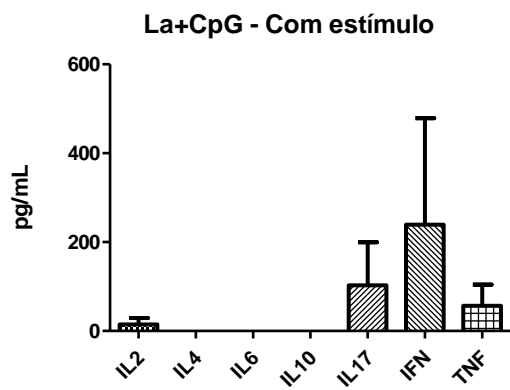
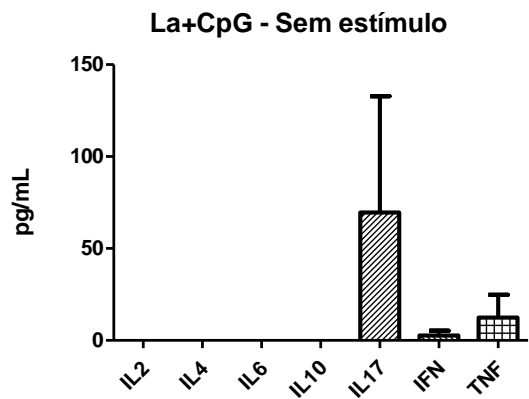
- O grupo inoculado com PBS apresentou patas com diâmetros significativamente menores do que o grupo CpG desde a 6ª semana.

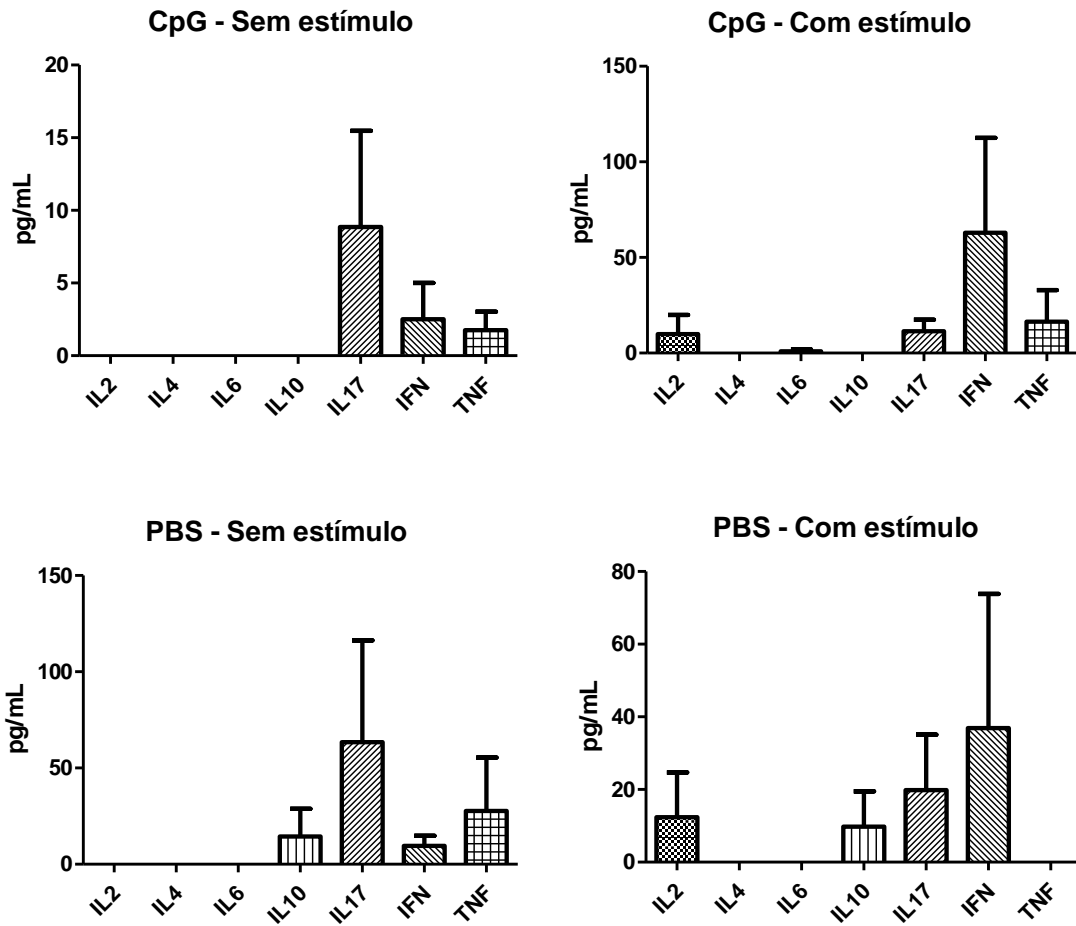
Na comparação das patas entre os diversos grupos, pôde-se notar que os animais do grupo imunizado com La-CpG, de modo geral, possuíam lesões macroscopicamente menores que as dos animais dos grupos controle (Figura 4.12).



**Figura 4.12 – Macroscopia das lesões nas patas de camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com *L. amazonensis* na 7ª semana após a infecção.** A figura mostra os 5 animais (C1 a C5) de cada grupo segundo sua imunização: La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS.

Para caracterizar o tipo de resposta associada à proteção, o perfil de citocinas foi avaliado (Figura 4.13). O grupo imunizado com La-CpG apresentou uma resposta, principalmente de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) antes e após o estímulo com antígeno *in vitro*, além de Th17 (IL-17). O grupo imunizado apenas com CpG, apresentou perfil semelhante, com diferença apenas na produção de IL-6 (Th2) após estímulo. Já os camundongos imunizados com Lb-CpG, quando não estimulados, apresentaram um perfil de citocinas do tipo Th1, integrando também IL-17 e IL-6 e após estímulo passou a produzir basicamente todas as citocinas. Os animais imunizados com La ou Lb sem adjuvante apresentaram altos níveis de IL-10, independente do estímulo com antígeno, em comparação aos outros grupos.





**Figura 4.13 – Perfil de citocinas no sobrenadante de culturas de linfonodo poplíteo de camundogs imunizados (estimulados ou não com antígenos de *L. amazonensis*).**

Camundongos BALB/c foram imunizados com La-CpG (extrato total de *L. amazonensis* associado ao adjuvante CpG), Lb-CpG (extrato total de *L. braziliensis* associado ao adjuvante CpG), La (extrato total de *L. amazonensis*), Lb extrato total de *L. braziliensis*, CpG ou PBS, posteriormente desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* por via subcutânea.



## 5 DISCUSSÃO

No experimento piloto, os modelos BALB/c e C57BL/6 foram utilizados. Nesses experimentos, tanto os camundongos da linhagem C57BL/6 quanto os da linhagem BALB/c mostraram redução do tamanho da lesão. Em relação ao número de parasitos, na linhagem BALB/c, os grupos imunizados com extratos associados ao adjuvante também mostraram carga parasitária menor do que a observada no grupo controle inoculado com PBS. Esses resultados, no que diz respeito a redução do número de parasitos, corroboram com os obtidos por Grenfell *et al* (2010) que observaram uma redução da carga parasitária em camundongos da linhagem BALB/c após imunização com extratos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e infecção por *L. infantum* (= *L. chagasi*).

O resultado do experimento subsequente, assim como no experimento piloto, mostrou redução de lesão (Figura 4.6), proporcionada pela imunização com La-CpG ou Lb-CpG. No entanto, o grupo imunizado apenas com CpG apresentou lesões significativamente menores que os grupos de camundongos imunizados com controle PBS ou somente com extratos totais (La ou Lb). O mesmo, porém, não foi visto em relação à carga parasitária, pois os grupos imunizados com extratos em associação ao adjuvante mostravam número de parasitos significativamente mais baixo que o grupo controle PBS. Isso não ocorreu com o grupo imunizado com CpG isoladamente. Todavia, estudos anteriores do nosso grupo já haviam mostrado que a imunização com CpG isoladamente não confere proteção (Santos, 2010). Levantou-se então uma hipótese para explicar o resultado inesperado da evolução clínica observada pelo tamanho das lesões das patas dos animais do grupo imunizado apenas com CpG. A proteção poderia estar sendo atingida pelo fato da imunização e da infecção terem sido realizados na mesma pata. Considerando-se que o adjuvante é constituído de DNA e que esta macromolécula é bastante estável (Reisner, 2014), é possível que ele ainda estivesse presente no sítio da infecção (o mesmo utilizado na imunização anterior) quando esta foi realizada. Desta forma, a presença residual do CpG teria direcionado a resposta imune, levando à proteção.

Nos experimentos seguintes (4.3 e 4.4), a imunização e a infecção passaram a ser realizadas em patas distintas. E, assim, observou-se que o grupo imunizado com CpG não mais apresentou proteção. Já a imunização com os extratos associados ao adjuvante manteve o perfil de proteção. Porém, no experimento 4.4, a

carga parasitária não apresentou diferença significativa entre os grupos de extratos associados ao adjuvante e o grupo controle PBS como foi visto nos experimentos anteriores. Isso provavelmente ocorreu pela redução do número amostral, uma vez que neste experimento foram utilizados apenas três animais por grupo para a análise da carga parasitária. Mesmo assim pode se ver uma tendência de redução da carga parasitária nesses grupos (La-CpG e Lb-CpG) e, quando analisadas separadamente com o grupo controle (PBS) ou com os grupos imunizados apenas com os extratos totais (La ou Lb), pôde ser observado diferença significativa entre os grupos.

Em relação ao perfil de citocinas, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, pôde ser observado que os camundongos imunizados com La-CpG tiveram uma produção de citocinas de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th17 (IL-17). Apesar de não se saber muito sobre a atuação de IL-17, acredita-se que ela esteja associada à patogênese da doença e que sua produção é induzida por IL-6 e TGF- $\beta$  (Maspi *et al*, 2016). Um ponto interessante é que os animais imunizados com La-CpG, apesar de apresentarem produção de IL-17, mostraram-se protegidos, o que se pode ver através do acompanhamento das lesões e pela análise macroscópica, onde as lesões se mostraram menores do que o grupo controle (PBS). O grupo imunizado com antígenos heterólogos e adjuvante (Lb-CpG) apresentou lesões significativamente menores do que o grupo controle (PBS), porém significativamente maiores do que o grupo imunizado com antígenos homólogos e adjuvante (La-CpG). Suas células de linfonodo, quando não estimuladas, apresentam produção de IL-6, que é conhecido por atuar em associação com TGF- $\beta$  no estímulo de produção de IL-17, que por sua vez está associada à patogênese da doença (Soong, Hearnard & Melby, 2012). A IL-17 é produzida por células de perfil Th17, cujo desenvolvimento pode ser promovido por IL-1 $\beta$  e IL-23, mas também pela associação de TGF- $\beta$  e IL-6. Além disso, IL-6 incita o aumento da produção de IL-21 e IL-23, que por sua vez levam ao desenvolvimento das células Th17. Por outro lado, o IFN- $\gamma$  suprime a diferenciação dessas células e por consequência, a produção de IL-17, através da diminuição de TGF- $\beta$  e IL-6 ou de IL-1 $\beta$  e IL-23 (Maspi, Abdoli & Ghaffarifar, 2016). Interessante que a única diferença no perfil de citocinas entre La-CpG e Lb-CpG seja a IL-6. Uma hipótese para o que pode estar acontecendo é que a IL-17 produzida pelos animais do grupo Lb-CpG seja induzida por IL-6, enquanto que a IL-17 produzida pelos animais do grupo La-CpG seja induzida por outro meio, que não necessariamente vai levar ao agravo das lesões, mas a um controle. Voltando a

atenção para o grupo imunizado apenas com adjuvante, pôde ser observado que, quando estimulado, há produção de IL-6 e IL-17, e mesmo com a produção de citocinas de perfil Th1, a infecção se exacerba. Todos os outros grupos apresentam uma produção mista de citocinas, incluindo citocinas tanto de perfil Th1 quanto de perfil Th2 e Treg, podendo-se inferir que o grupo com maior capacidade protetora seja o que possui um perfil de produção de citocinas Th1. Claro, que se pensarmos na infecção *in vivo* teremos outros processos acontecendo em simultâneo, além de outras citocinas envolvidas, e que tudo é muito mais complexo, entretanto a partir das análises realizadas nesse estudo, podemos inferir uma tendência para o perfil de citocinas necessário para moldar uma vacina com potencial de utilização no controle da LTA. Ressaltando que a imunização com antígenos de *Leishmania* em associação com o adjuvante em questão tem se mostrado um interessante candidato, não deixando de ressaltar a necessidade de estudos mais aprofundados.

Os resultados obtidos no presente estudo fortalecem os dados dos trabalhos anteriores descritos na literatura, os quais mostraram que os extratos totais são potenciais candidatos vacinais (Grenfel *et al*, 2010; Pinto *et al*, 2003; Pinto *et al*, 2004). Estes extratos, homólogos (*L. amazonensis*) e heterólogos (*L. braziliensis*) conferiram uma proteção significativa contra leishmaniose cutânea murina experimental causada por *L. amazonensis* quando associados ao adjuvante CpG-ODN, evento demonstrado pelo acompanhamento do desenvolvimento das lesões e determinação da carga parasitária.

Pinto e colaboradores (2003 e 2004) realizaram imunizações pelas rotas oral ou nasal utilizando extrato total de *L. amazonensis* sem adjuvante e desafio com espécie homóloga. Em ambas as vias de imunização, o extrato mostrou proteção em relação ao controle no desenvolvimento da lesão e carga parasitária mais baixa em relação ao controle PBS, novamente mostrando que os extratos totais de *Leishmania* têm capacidade protetora, apesar de ser uma rota diferente e sem a utilização de um adjuvante. O mesmo grupo diz que, quando a imunização ocorre por via subcutânea, há uma exacerbação das lesões dos camundongos imunizados com extrato de *L. amazonensis*, porém isso não foi observado em nosso estudo nos grupos dos animais imunizados apenas com esse extrato.

Neste estudo, pôde ser observado que uma proteção maior foi alcançada quando a imunização foi realizada com antígenos homólogos aos da infecção. E mesmo quando não houve diferença significativa, apresentou-se uma tendência a uma maior proteção, o que faz todo o sentido, já que os antígenos reconhecidos

quando foi realizado o desafio são idênticos aos da imunização. E essa diferença corroborou com o que foi visto por Telino *et al* (2006) que fizeram um estudo *in vitro* avaliando imunogenicidade com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes diagnosticados com LTA por *L. braziliensis*, estimulando essas células com extrato total de La ou Lb. Foi vista uma resposta proliferativa maior, assim como produção de IFN- $\gamma$  aumentada nas PBMCs estimuladas com o extrato total do antígeno homólogo.

Grenfell *et al* (2010) imunizaram camundongos BALB/c com três doses de extratos totais de *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb) em associação ao adjuvante saponina e, posteriormente, foi realizado o desafio com *L. infantum* (= *L. chagasi*). Foi observada uma diminuição da carga parasitária no fígado em camundongos imunizados tanto com Lb quanto com La, e no baço quando imunizados com La. Também foi avaliada a produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 pelas células esplênicas. Em relação a IL-4 e IL-10, os grupos imunizados com extratos e adjuvantes apresentaram níveis menores dessas citocinas em relação aos controles (saponina ou PBS), mas não pôde ser observada mudança em relação ao IFN- $\gamma$ . Em relação à carga parasitária, o estudo atual também mostrou número menor de parasitos nos grupos imunizados com extratos em associação ao adjuvante, mas não em relação aos controles (PBS ou CpG), ou aos extratos isoladamente, o que não é totalmente comparável ao estudo do grupo de Grenfell, pois eles não avaliaram apenas os extratos. Podemos dizer que o CpG associado aos extratos de La ou Lb ajudou a conduzir uma resposta imune apropriada, visto que sem o mesmo, não foi encontrada diferença entre imunização com os extratos isoladamente ou com controles. Já em relação à avaliação de citocinas, os níveis de IL-10 nesse estudo também tiveram tendência a serem mais baixos nos grupos de extratos associados ao adjuvante quando comparados ao controle PBS, mas em relação ao controle CpG os níveis eram semelhantes. O que mostra que este adjuvante de forma isolada tem uma tendência a controlar os níveis de citocinas de perfil Th2, mas não mostrou proteção no acompanhamento da lesão verificado pelo diâmetro das patas, evidenciando que o estímulo com antígenos do parasito é essencial para conduzir a uma resposta protetora. Foi vista também uma tendência ao aumento de IFN- $\gamma$  nos grupos de extratos em associação ao adjuvante, o que também pôde ser observado no trabalho de Grenfell e colaboradores (2010), apesar de também não apresentar diferença, provavelmente pelo número de animais por grupo ser muito pequeno.

Os resultados obtidos no presente estudo também corroboram com o de Sanches e colaboradores (2017) que imunizaram camundongos BALB/c com extrato total de La, utilizando ácido poliinosínico-policitidílico [Poly(I:C)] como adjuvante. Os animais imunizados com extrato total de La [TLA-Poly(I:C)] apresentaram lesões menores do que os animais imunizados com apenas o extrato ou com os controles [PBS ou Poly(I:C)], com carga parasitária mais baixa e uma produção aumentada de IFN- $\gamma$  por células esplênicas.

Ressaltamos que apesar dos resultados aqui apresentados mostrarem-se promissores a necessidade de estudos mais aprofundados incluindo novas análises, como, por exemplo, a avaliação de outras citocinas envolvidas na LTA como IL-12, que induz produção de citocinas de perfil Th1 necessária para o controle da doença (Okwor & Uzonna, 2016), assim como a análise destas citocinas para avaliar o perfil conferido pela vacina sem o estímulo de uma infecção. Informações para aumentar o conhecimento e assim galgar o caminho para o desenvolvimento de uma vacina com potencial de utilização no controle da LTA.

## 6 CONCLUSÕES

- Imunizações com extratos totais homólogos (*L. amazonensis*) ou heterólogos (*L. braziliensis*) de *Leishmania* induzem a proteção de camundongos BALB/c contra infecção experimental por *L. amazonensis* quando em associação ao adjuvante CpG-ODN;
- A vacinação com antígeno homólogo ao da infecção (*L. amazonensis*) aparenta ser mais eficiente do que o antígeno heterólogo no controle do desenvolvimento da lesão na infecção experimental por *L. amazonensis*;
- A imunização apenas com o antígeno total de *L. amazonensis* não induziu uma exacerbação da lesão quando comparado ao controle PBS, contrariamente ao descrito na literatura;
- A utilização do adjuvante CpG em associação com os antígenos brutos induziu uma resposta protetora de perfil Th1;
- A imunização com os extratos ou com o adjuvante isoladamente induziu a produção de um mix de citocinas dos perfis Th2, Treg e Th17;
- A imunização com o CpG isoladamente inoculado no mesmo local do desafio induz uma proteção, não observada quando o sítio de infecção é diferente;
- O CpG mostrou-se eficaz como adjuvante na imunização com antígenos brutos de *Leishmania*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdoli A, Maspi N, Ghaffarifar F 2017. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF-beta. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 51, 15-26.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WHOLC 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7, e35671.
3. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM 2009. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 200, 75-78.
4. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology*, 165, 969-977.
5. Birnbaum R, Craft N 2011. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatologic clinics*, 29, 89-102.
6. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*, 10, 499-511.
7. Borghi SM, Fattori V, Conchon-Costa I, Pinge-Filho P, Pavanelli WR, Verri WA, Jr. 2017. Leishmania infection: painful or painless? *Parasitology research*, 116, 465-475.
8. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppe P, Launois P 2009. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infection and immunity*, 77, 1465-1474.
9. Brasil. Ministério da Saúde 2013. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed., Brasília, 180 p.
10. Castellano RL 2005. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Vitae Academia Biomédica Digital*, 25.
11. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*, 5, 873-882.

12. Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD 2009. Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42(2):127-42
13. Dedet JP, Pratlong F, Lanotte G, Ravel C 1999. Cutaneous leishmaniasis. The parasite. *Clinics in dermatology*, 17, 261-268.
14. Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in dermatology*, 14, 417-423.
15. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, Gutierrez Fernandez J 2014. Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of infection in developing countries*, 8, 961-972.
16. Gatti GL, Freda N, Stabile M, Giacomina A, Balmelli B, Boileau R, Rosato L, Sisti A 2017. Deforming Mucocutaneous Leishmaniasis of the Nose. *The Journal of craniofacial surgery*, 28, e446-e447.
17. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401.
18. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO 2014. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite immunology*, 36, 367-376.
19. Grenfell RF, Marques-da-Silva EA, Souza-Testasica MC, Coelho EA, Fernandes AP, Afonso LC, Rezende SA 2010. Antigenic extracts of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* associated with saponin partially protects BALB/c mice against *Leishmania chagasi* infection by suppressing IL-10 and IL-4 production. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 818-822.
20. Grimaldi G, Jr., Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*, 6, 230-250.
21. Hammoudeh N, Kweider M, Abbady AQ, Soukkarieh C 2014. Sequencing and Gene Expression Analysis of *Leishmania tropica* LACK Gene. *Iranian journal of parasitology*, 9, 574-583.
22. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73, 911-926; 927-918.
23. Handman E 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews*, 14, 229-243.
24. Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.



25. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F 2016. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in parasitology*, 32, 392-401.
26. Katebi A, Gholami E, Taheri T, Zahedifard F, Habibzadeh S, Taslimi Y, Shokri F, Papadopoulou B, Kamhawi S, Valenzuela JG, Rafati S 2015. *Leishmania tarentolae* secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against *Leishmania major* infection in a susceptible BALB/c mice model. *Molecular immunology*, 67, 501-511.
27. Kaye P, Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, 9, 604-615.
28. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH 2015. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatologic clinics*, 33, 579-593.
29. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *The Indian journal of medical research*, 123, 423-438.
30. Klinman DM 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature reviews. Immunology*, 4, 249-258.
31. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 435-443.
32. Loeuillet C, Banuls AL, Hide M 2016. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & vectors*, 9, 144.
33. Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E 2007. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 20, 435-445.
34. Martins-Melo FR, Lima Mda S, Ramos AN, Jr., Alencar CH, Heukelbach J 2014. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. *PloS one*, 9, e93770.
35. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifard F 2016. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and global health*, 110, 247-260.
36. Maspi N, Ghaffarifard F, Sharifi Z, Dalimi A, Dayer MS 2017. Comparative Assessment of Induced Immune Responses Following Intramuscular Immunization with Fusion and Cocktail of LeIF, LACK and TSA Genes Against Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*.

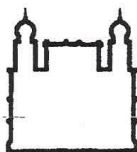
37. Maspi N, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Dayer MS 2017. Immunogenicity and efficacy of a bivalent DNA vaccine containing LeIF and TSA genes against murine cutaneous leishmaniasis. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125, 249-258.
38. McAtee CP, Seid CA, Hammond M, Hudspeth E, Keegan BP, Liu Z, Wei J, Zhan B, Arjona-Sabido R, Cruz-Chan V, Dumonteil E, Hotez PJ, Bottazzi ME 2017. Expression, purification, immunogenicity and protective efficacy of a recombinant nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*, a vaccine candidate for preventing cutaneous leishmaniasis. *Protein expression and purification*, 130, 129-136.
39. Mohan T, Verma P, Rao DN 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138, 779-795.
40. Moll H 2000. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 479, 163-173.
41. Mutiso JM, Macharia JC, Kiiro MN, Ichagichu JM, Rikoi H, Gicheru MM 2013. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *Journal of biomedical research*, 27, 85-102.
42. Nagill R, Kaur S 2011. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *International immunopharmacology*, 11, 1464-1488.
43. Neuber H 2008. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 6, 754-765.
44. Neves D, Melo A, Genaro O, PM L 2004. *Parasitologia humana*. 10.ed, São Paulo, 428 p.
45. Nylen S, Eidsmo L 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, 34, 551-561.
46. Pace D 2014. Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10-18.
47. Paniz Mondolfi AE, Duffey GB, Horton LE, Tirado M, Reyes Jaimes O, Perez-Alvarez A, Zerpa O 2013. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*, 52, 446-455.
48. 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.

49. 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. *Infection and immunity*, 72, 4521-4527.
50. Pratti JE, Ramos TD, Pereira JC, da Fonseca-Martins AM, Maciel-Oliveira D, Oliveira-Silva G, de Mello MF, Chaves SP, Gomes DC, Diaz BL, Rossi-Bergmann B, de Matos Guedes HL 2016. Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57Bl/6 mice. *Parasites & vectors*, 9, 534.
51. Ramirez L, Corvo L, Duarte MC, Chavez-Fumagalli MA, Valadares DG, Santos DM, de Oliveira CI, Escutia MR, Alonso C, Bonay P, Tavares CA, Coelho EA, Soto M 2014. Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania major* ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 7, 3.
52. Rangel EF, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 937-954.
53. Reisner H 2014. *Pathology: A Modern Case Study*. McGraw-Hill Education.
54. Romão PRT, Dias RO, Cruz KK, Marques FCS, Monteiro MCM 2007. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*, 3(1), 1-10.
55. Sanchez MV, Elicabe RJ, Di Genaro MS, Germano MJ, Gea S, Garcia Bustos MF, Salomon MC, Scodeller EA, Cargnelutti DE 2017. Total *Leishmania* antigens with Poly(I:C) induce Th1 protective response. *Parasite immunology*.
56. Santos JR 2010. Avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora da proteína recombinante Lack de *Leishmania amazonensis* na leishmaniose experimental murina / Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant Lack of *Leishmania amazonensis* in murine experimental leishmaniasis. Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 94 p.
57. Scharton-Kersten T, Scott P 1995. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of leukocyte biology*, 57, 515-522.
58. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME 2017. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International journal of molecular sciences*, 18.

59. Silva KLO, Santos DP, Coelho NMD, Silva DC, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Júnior E 2013. Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. Archives of Health Investigation, 2(4), 18-28.
60. Singh N, Kumar M, Singh RK 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pacific journal of tropical medicine, 5, 485-497.
61. Soong L, Henard CA, Melby PC 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. Seminars in immunopathology, 34, 735-751.
62. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B 2013. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. Clinical and experimental immunology, 172, 403-409.
63. Stacey KJ, Blackwell JM 1999. Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. Infection and immunity, 67, 3719-3726.
64. Stanley AC, Engwerda CR 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunology and cell biology, 85, 138-147.
65. Telino E, De Luca PM, Matos DC, Azeredo-Coutinho RB, Meirelles MN, Conceicao-Silva F, Schubach A, Mendonca SC 2006. *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. Clinical and experimental immunology, 143, 338-344.
66. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R 2017. Leishmaniasis: a review. F1000Research, 6, 750.
67. Vale ECS, Furtado T 2005. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. Anais Brasileiros de Dermatologia, 80, 421-428.
68. Vellozo NS, Pereira-Marques ST, Cabral-Piccin MP, Filardy AA, Ribeiro-Gomes FL, Rigoni TS, DosReis GA, Lopes MF 2017. All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to *Leishmania major*. Frontiers in immunology, 8, 1560.
69. Von Stebut E 2015. Leishmaniasis. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG, 13, 191-200; quiz 201.
70. Walker PS, Scharon-Kersten T, Krieg AM, Love-Homan L, Rowton ED, Udey MC, Vogel JC 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective

- immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6970-6975.
71. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania spp.* in human samples. *Journal of clinical microbiology*, 49, 3892-3904.
72. Werneck GL 2014. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de saude publica*, 48, 851-856.
73. Woolhouse ME, Dye C, Etard JF, Smith T, Charlwood JD, Garnett GP, Hagan P, Hii JL, Ndhlovu PD, Quinnell RJ, Watts CH, Chandiwana SK, Anderson RM 1997. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 338-342.
74. World Health Organization (WHO). Department of Control of Neglected Tropical Diseases., Crompton DWT, Daumerie D, Peters P, Savioli L, World Health Organization. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland, ix, 172 p. pp.
75. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2017 Apr [Acesso em 15 jan 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

## 8 APÊNDICES E/OU ANEXOS



Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

### LICENÇA

**L-005/2014**

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-007/2014), intitulado “Desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose”, sob a responsabilidade de **SÉRGIO COUTINHO FURTADO DE MENDONÇA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 01/01/2019 e inclui o uso total de:

***Mus musculus* (camundongo), cepas:**

- BALB/c: total 760 animais fêmeas
- C57BL/6: total 440 animais fêmeas

**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2014.

Ada Maria de Barcellos Alves  
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz  
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056