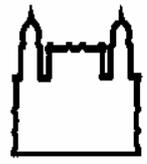




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

TESE DE MESTRADO

Estudo da imunogenicidade de vacinas de *Mycobacterium smegmatis* recombinante, expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal de *Leishmania infantum* (LiP0), contra a infecção por *Leishmania chagasi* em hamster

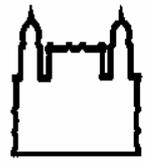
Melissa Moura Costa Abbehusen

**Salvador – Bahia – Brasil
2011**



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

Estudo da imunogenicidade de vacinas de *Mycobacterium smegmatis* recombinante, expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal de *Leishmania infantum* (LiP0), contra a infecção por *Leishmania chagasi* em hamster

Melissa Moura Costa Abbehusen

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil
2011

À Deus por estar sempre comigo

Aos meus filhos, Victor e Yasmin, por tornarem meus dias cada vez melhores

Ao meu amado esposo Vladimir pela compreensão

Aos meus pais Geraldo e Conceição por sempre me apoiarem

À minha avó Vanda pelo carinho

Às minhas irmãs Karina e Viviane pela amizade

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cláudia Ida Brodskyn pela orientação, confiança, compreensão e apoio.

Ao Dr. Ivan Pereira Nascimento por ter me cedido os clones transformados e pela orientação, paciência e apoio.

A Dr. Manoel Soto por ter me cedido a proteína e os plasmídeos de LiP0.

À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida no laboratório

A Dra. Valéria Borges, Dra. Theolis Bessa, Jorge Clarêncio e Dra. Camila Indiani de Oliveira pelo apoio intelectual.

À Joelma Trigo pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

À Laís Pereira pela inestimável ajuda, mão de obra e paciência.

À Equipe-Cláudia: Natalia Machado, Claire Silva, Dirceu Costa, Maiana Pitombo e Morgana pelo apoio técnico, intelectual e emocional.

Aos amigos do LIMI-LIP, Jorge Tolentino, Nívea Farias Luz, Deboraci Brito Prates, Theo de Araújo, Jaqueline Ferreira, Jaqueline Gonçalves, Evelin, Diego Moura, Márcia Weber, Ana Paula Almeida, Barbara, Petter Ethinger e Sarah Falcão, pela amizade e convivência agradável.

A Kyioshi Ferreira pelos ensaios em Real Time PCR.

A Daniel Ruiz Abanades e Leonardo Arruda pela ajuda nos ensaios moleculares.

Ao apoio técnico de Natali Alexandrino, Edvaldo Passos e Elaine Arruda.

Aos meus amigos da pós-graduação pela ótima convivência e por toda ajuda direta e indireta que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação pelo bom desempenho em suas atividades de ensino.

A Adrielze e Andrezza, secretárias do LIP-LIMI, por todo apoio.

A todo pessoal da secretaria da pós-graduação por toda ajuda fornecida.

Aos funcionários do Biotério pela boa relação e pelo fornecimento dos animais.

Ao CNPq, iii e à FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 09 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE QUADROS..... | 11 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 Aspectos gerais da leishmaniose | 15 |
| 1.2 Resposta imune na leishmaniose visceral | 17 |
| 1.3 O hamster como modelo experimental na leishmaniose visceral | 18 |
| 1.4 Vacinas para leishmaniose visceral | 20 |
| 1.4.1 Vacinas empregando antígenos recombinantes | 21 |
| 1.4.2 Vacinas empregando bactérias ou vírus recombinantes como vetores de expressão | 22 |
| 1.4.2.1 <i>Mycobacterium</i> como vetor de expressão | 23 |
| 1.4.3 Vacinas de DNA..... | 25 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 28 |
| 3. HIPÓTESE..... | 30 |
| 4. OBJETIVOS..... | 30 |
| 4.1. Objetivo Geral..... | 30 |
| 4.2. Objetivos Específicos..... | 30 |
| 5. DESENHO EXPERIMENTAL..... | 32 |
| 5.1 Avaliação de diferentes vias de infecção | 32 |
| 5.2 Imunização com <i>rM. smegmatis</i> | 32 |
| 5.3 Imunização com pcDNA3LIP0 | 33 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 6.1 Animais | 34 |
| 6.2 Parasitas | 34 |

| | |
|--|----|
| 6.3 Expansão de <i>rM. smegmatis</i> | 34 |
| 6.4 <i>Western Blotting</i> para detecção da expressão do gene da LiP0 expressa pelo <i>rM.smegmatis</i> | 35 |
| 6.5 DNA plasmideal e proteína recombinante | 35 |
| 6.6 Imunizações | 36 |
| 6.6.1 Imunização com <i>rM.smegmatis</i> | 36 |
| 6.6.2 Imunização com pcDNA3LiP0 | 36 |
| 6.7 ELISA para detecção de IgG anti- <i>M. smegmatis</i> e IgG anti-LiP0 | 37 |
| 6.8 Infecção | 38 |
| 6.8.1 Avaliação da via de Infecção | 38 |
| 6.8.2 Infecção por Via Endovenosa | 38 |
| 6.9 Determinação da carga parasitária por diluição limitante | 38 |
| 6.10 Extração de RNA e preparo do cDNA para detecção de citocinas | 38 |
| 6.11 Quantificação da produção de citocinas por PCR em Tempo Real..... | 40 |
| 6.12 Análise Estatística | 42 |
| 7. RESULTADOS | 43 |
| 7.1 Avaliação das vias de infecção | 43 |
| 7.1.1 Carga parasitária no linfonodo, fígado e baço | 44 |
| 7.2 Imunização com <i>rM. smegmatis</i> expressando a proteína LiP0 | 46 |
| 7.2.1 Avaliação da expressão da LiP0 por <i>Western Blotting</i> | 46 |
| 7.2.2 Detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>M. smegmatis</i> em soros de hamsters pelo método de ELISA | 47 |
| 7.2.3 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-LiP0 em soros de hamsters pelo método de ELISA | 48 |
| 7.2.4 Análise de citocinas por Real Time PCR | 49 |
| 7.2.5 Análise da carga parasitária no linfonodo | 50 |
| 7.2.6 Análise do peso e carga parasitária no fígado | 52 |
| 7.2.7 Análise do peso e carga parasitária no baço | 54 |

| | |
|--|----|
| 7.3 Imunização com pcDNA3LiP0 | 56 |
| 7.3.1 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-LiP0 em soros de hamsters pelo método de ELISA | 56 |
| 7.3.2 Análise da carga parasitária no linfonodo | 58 |
| 7.3.3 Análise do peso e carga parasitária no fígado | 60 |
| 7.3.4 Análise do peso e carga parasitária no baço | 62 |
| 8. DISCUSSÃO..... | 64 |
| 9. CONCLUSÕES..... | 70 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC- Células Apresentadoras de Antígenos
- BCG - Bacilo Calmette-Guérin
- cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar
- CD 4⁺- Co-receptor de linfócito T auxiliar
- CD 8⁺- Co-receptor de linfócito T citolítico
- CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
- CpG ODN - *Cytosine-phosphate-Guanosine Oligodeoxynucleotides*
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- ELISA- Ensaio Imunoenzimático
- EV- Endovenosa
- ID- Intradérmica
- IFN- γ - Interferon gama
- Ig - Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- IM- Intramuscular
- IP - Intraperitoneal
- LACK- Receptor para cinase C ativada homóloga da *Leishmania*
- LC – Leishmaniose cutânea
- LiP0- Protéina acida ribossomal
- LRP – “Leishmania Ribosomal Proteins”
- LV- Leishmaniose visceral
- LVC - Leishmaniose visceral canina
- MHC- Complexo principal de histocompatibilidade
- NK- “Natural killer”
- NO - Óxido Nítrico
- NOS2 – Óxido Nítrico Sintetase Indutível
- OD - Densidade óptica
- PCR- Reação em cadeia da polimerase

M. smegmatis: Mycobacterium smegmatis

r*M. smegmatis: Mycobacterium smegmatis* recombinante

RNA- Ácido ribonucléico

RNA_m- Ácido ribonucléico mensageiro

rpm- rotações por minuto

SBF- Soro bovino fetal

TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta

Th- Linfócito T auxiliar

Th1- “T helper 1”

Th2- “T helper 2”

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Carga parasitária no linfonodo, fígado e baço de hamsters desafiados com *L. chagasi*, analisando-se as vias de infecção.

Figura 2. Avaliação da expressão do gene da proteína ácida ribossomal de *L. infantum* (LiP0) pela técnica de *Western Blotting*.

Figura 3. Avaliação da resposta imune humoral anti-*M. smegmatis* em Hamsters Golden Syrius imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0.

Figura 4. Avaliação da resposta imune humoral anti-LiP0 em hamsters Golden Syrius imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0.

Figura 5. Avaliação da expressão de citocinas em hamsters Golden Syrius imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0.

Figura 6. Carga parasitária no linfonodo de hamsters imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

Figura 7. Peso e carga parasitária no fígado de hamsters imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

Figura 8. Peso e carga parasitária no baço de hamsters imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

Figura 9. Avaliação da resposta imune humoral anti-LiP0 em Hamsters Golden Syrius imunizados com pcDNA3, pcDNA3 LiP0 e pcDNA3 LiP0 + rLiP0 e CpG.

Figura 10. Carga parasitária no linfonodo de hamsters imunizados com pcDNA3 LiP0, pcDNA3 e pcDNA3LiP0 + rLiP0+CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

Figura 11. Peso e carga parasitária no fígado de hamsters imunizados com pcDNA3 LiP0, pcDNA3 e pcDNA3LiP0 + rLiP0+CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

Figura 12. Peso e carga parasitária no baço de hamsters imunizados com pcDNA3 LiP0, pcDNA3 e pcDNA3LiP0 + rLiP0+CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*.

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 Descrição e identificação dos genes estudados, sequência dos *primers* utilizados e características do produto de amplificação.

RESUMO

ESTUDO DA IMUNOGENICIDADE DE VACINAS DE *Mycobacterium smegmatis* RECOMBINANTE, EXPRESSANDO O GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA ÁCIDA RIBOSSOMAL DE *Leishmania infantum* (LiP0), CONTRA A INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* em hamster. A Proteína ácida ribossomal de *Leishmania infantum* (*L. infantum*) - LiP0 é um componente estrutural da subunidade maior do ribossomo e já foi descrita como um antígeno imunodominante, que participa na síntese de outras proteínas e é capaz de induzir resposta imune humoral específica em soro de pacientes e cães infectados com *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*). *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), é uma micobactéria oportunista, que apresenta crescimento rápido e uma poderosa capacidade adjuvante, já sendo utilizado como vetor de expressão para diversos antígenos. Neste trabalho avaliamos a capacidade imunoprotetora do *Mycobacterium smegmatis* recombinante (*rM.smegmatis*) expressando o gene que codifica a LiP0, bem como o plasmídeo e/ou proteína LiP0 utilizando estratégia homóloga (composta de plasmídeo de DNA) e heteróloga (composta de plasmídeo de DNA adicionado a proteína recombinante e CpG), contra a infecção causada por *L. chagasi* em hamsters. Hamsters foram imunizados e posteriormente infectados com *L. chagasi* por via endovenosa. Os animais imunizados com a micobactéria, apesar de apresentarem resposta imune humoral anti-*M. smegmatis*, não produziram anticorpo contra LiP0, que só foram detectados no soro dos animais que receberam a estratégia heteróloga de imunização. Na análise de citocinas, observou-se que os animais imunizados com *rM.smegmatis* LiP0 apresentaram maior concentração de IFN- γ e menor quantidade de TGF- β e IL-10 quando comparado aos grupos controle, sugerindo uma resposta Th1. Em diferentes momentos após o desafio, o grau de proteção avaliado pela carga parasitária em órgãos alvo, foi estimado por ensaio de diluição limitante. Nenhuma diferença foi observada na carga parasitaria do baço, fígado e linfonodo em hamsters imunizados ou controles em todos os pontos da avaliação, sugerindo que a LiP0, não protegeu hamsters imunizados tanto com o *Mycobacterium* expressando o gene que codifica a proteína, nem como vacina de DNA utilizando a estratégia homóloga ou heteróloga contra infecção por *L.chagasi*.

Palavras-chave: Vacina, leishmaniose visceral, *Mycobacterium smegmatis*, proteína ácida ribossomal.

ABSTRACT

The acid ribosomal protein of *Leishmania infantum* (*L. infantum*) - LiP0 is a structural component of the ribosomal subunit and it was described as an immunodominant antigen recognized either by serum of patients and dogs infected by *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) and cooperates in the synthesis of other proteins. *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) is an opportunistic bacteria, which presents rapid growth, is a potent adjuvant and has been used as carrier of antigens in several different experimental models of immunoprotection. In this work we evaluate the immunoprotective capacity of recombinant *M. smegmatis* (*rM. smegmatis*) carrying the gene of LiP0 and the DNA or protein of LiP0 using homologous strategy (composed of plasmid DNA) and heterologous (consisting of plasmid DNA and recombinant protein more CpG) to immunize hamsters against infection by *L. chagasi*. The immunized animals produced anti-*M. smegmatis* antibodies but they did not produce antibody against LiP0, detected only in animals who received the heterologous strategy of vaccination. In the analysis of cytokines, we observed that animals immunized with *rM. smegmatis* LiP0 had higher concentration of IFN- γ and lower amounts of TGF- β and IL-10 compared to control groups, suggesting a Th1 response. At different times after challenge, the degree of protection, evaluated by parasite load in the target organs, was estimated by limiting dilution assay. No difference was observed in the parasite load in the spleen, liver and lymph node between immunized hamsters and controls at all points of evaluation. There was no protection in animals immunized with *rM. smegmatis* expressing the acidic ribosomal protein gene, suggesting that LiP0 did not protect hamsters immunized with either *Mycobacterium* expressing the gene encoding the protein or DNA as a vaccine strategy using homologous or heterologous against infection *L. chagasi*.

Key-words: Vaccines, visceral leishmaniasis, *Mycobacterium smegmatis* and acidic ribosomal protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

As Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, que têm como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses têm ampla distribuição mundial, afetando 12 milhões de indivíduos, estando presentes em quase todos os continentes. A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas em 88 países sofrem o risco de contrair a infecção, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano. No entanto, a notificação obrigatória só ocorre em 32 países onde as leishmanioses são prevalentes gerando um baixo índice de notificações (DESJEUX *et al* 2004, COLLIN *et al.* 2006, SINGH *et al.*, 2006).

Os protozoários do gênero *Leishmania*, são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos, que têm seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, o qual é também o vetor da doença (LAINSON & SHAW, 1987). A forma flagelada, promastigota, está presente no interior do trato digestivo do vetor e a forma amastigota, sem flagelo, no interior dos fagolisossomos de células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (NEVES, 2005; REY, 2008).

A infecção do hospedeiro invertebrado acontece quando a fêmea do flebótomo, pertencente à família *Phlebotomatidae*, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (VERONESI, FOCACCIA 1996), ao se alimentar de um hospedeiro mamífero infectado, ingere macrófagos parasitados por amastigotas da *Leishmania*. No interior do trato digestivo do inseto os macrófagos, protegidos das proteases digestivas pela matriz peritrófica (PIMENTA *et al.*, 2001), se rompem e as formas amastigotas livres se dividem e se transformam em promastigotas (ALEXANDER *et al.*, 1999). Após a digestão, a matriz se rompe e as promastigotas migram e aderem ao epitélio das regiões anteriores do intestino do flebótomo (SCHLEIN, 1993). No momento do repasto sanguíneo, quando o flebótomo infectado pica hospedeiros mamíferos, inocula formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva (NEVES, 2005; REY, 2008). As promastigotas são fagocitadas por macrófagos que se instalam no interior do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (GENARO, 2000).

As leishmanioses são caracterizadas tanto por sua diversidade como pela sua complexidade (HERWALDT, 1999), pois são causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* e transmitidas ao homem por aproximadamente 30 espécies de flebótomos (PEARSON, 1996; CUNNINGHAM, 2002), sendo que a forma e a severidade da doença dependem da infectividade e espécie do parasito, além do estado imunológico do hospedeiro vertebrado. Dessa forma, as diferentes espécies de *Leishmania*, apesar de apresentarem similaridades genéticas e morfológicas podem promover alterações patológicas diferentes (HANDMAN, 2001), levando a um amplo espectro de formas clínicas, que variam desde uma infecção assintomática até uma forma tegumentar (cutânea e/ou mucosa) ou visceral (CUNNINGHAM, 2002).

A leishmaniose visceral (LV) é uma das formas mais graves que pode ser fatal se não tratada e consiste em uma infecção generalizada que acomete o sistema retículo endotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). Embora amplamente distribuída no mundo, a LV ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas estando entre as três mais importantes enfermidades transmitidas por vetor e entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, com uma incidência de 500.000 novos casos humanos e aproximadamente 59.000 mortes por ano (DESJEUX *et al.*, 2004, WHO, 2002). Na América Latina, a doença já foi descrita em doze países, sendo que o Brasil concentra 90% dos casos humanos (MILES *et al.* 1999) descritos em dezenove estados (FEITOSA *et al.* 2000). No Nordeste brasileiro, ocorre a maioria dos casos humanos (90%) (NASCIMENTO *et al.* 1996; FUNASA 2002) sendo a LV considerada um dos principais problemas de saúde pública (GENARO *et al.* 1996; MOURA *et al.* 1996).

As espécies que podem causar a LV pertencem ao subgênero *Leishmania* sendo *L. donovani* e *L. infantum* prevalentes no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Embora diferentes no nome e origem geográfica, estudos moleculares mostram que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie (MAURÍCIO *et al.*, 2000). No Brasil, a LV é considerada uma doença negligenciada e os casos de LV são atribuídos a *L. chagasi*. O controle da LV fundamenta-se no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, em atividades de educação em saúde, no combate ao vetor e na eliminação dos reservatórios (FUNASA, 2006). Contudo, essas medidas não têm demonstrado efetividade satisfatória para redução da incidência e na dispersão da doença (FUNASA, 2002).

1.2 Resposta imune na leishmaniose visceral

A imunidade anti-leishmânia é mediada tanto pela via inata quanto pela via adaptativa. Os macrófagos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania* participando na eliminação eficaz de parasitas. Paradoxalmente, a *Leishmania* utiliza a função fagocítica, como estratégia de interiorização e replicação dentro dos fagolisossomos (REINER *et al.*, 1995). A internalização de *Leishmania* por macrófagos leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e morte do parasita. A atividade subversiva dos parasitas neste processo é a inibição da produção de IL-12, necessária para a indução de IFN- γ , fundamental para a atividade leishmanicida do macrófago (AHUJA *et al.*, 1999). A produção de citocinas resulta no recrutamento de outras células pró-inflamatórias para o local da infecção (BELKAID *et al.*, 2000).

As diferentes formas clínicas da leishmaniose podem ser influenciadas pela resposta imune do hospedeiro. O curso da infecção dependerá dos passos iniciais da infecção que são essenciais na determinação do desenvolvimento de uma resposta entre distintas subclasses de células T *helper* (Th) levando a respostas pró e anti-inflamatórias (HEINZEL *et al.*, 1989; MILON *et al.*, 1995).

Após a infecção, células apresentadoras de antígenos irão secretar IFN- γ promovendo a diferenciação de células TCD4⁺ em células Th1 (SCOTT *et al.*, 1998; SCOTT, 1991; REINER & LOCKSLEY, 1995). O TNF- α também está envolvido na indução da ativação de macrófagos em sinergismo com IFN- γ , que leva a ativação de mecanismos leishmanicidas do macrófago pela síntese de óxido nítrico (MURRAY *et al.*, 1983; LIEW *et al.*, 1990), de radicais livres derivados do oxigênio e um aumento na concentração de enzimas lisossomais (MURRAY, 1981; CHANNON *et al.*, 1984; PASSWELL *et al.*, 1994). Além disso, o IFN- γ induz a ativação de células dendríticas e a secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos que induzem a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (GUMY *et al.*, 2004). A secreção de IL-12 pode ser desencadeada pela fagocitose do parasito e pode ser amplificada por IFN- γ (SUTERWAALA & MOSSER, 1999; MAROVICH *et al.*, 2000), estabelecendo um *feedback* positivo (BELOSEVIC *et al.*, 1989; HEINZEL *et al.*, 1995).

No entanto, a interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13) inibem a produção de intermediários reativos de oxigênio em macrófagos ativados por IFN- γ (BOGDAN *et al.*, 2000). Células T CD4⁺ e células T NK podem participar na produção de IL-4 nas

primeiras horas de infecção, e com isso modular a diferenciação para Th2 (VON DER WEID *et al.*, 1996; BRANDT *et al.*, 2000; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2000).

Neste contexto, a citocina regulatória IL-10, produzida por células T, B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais, representa um papel importante na progressão ou cura da doença. Inicialmente a IL-10 modula efetores Th1, e com a inibição da síntese de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , leva à redução na ativação de macrófagos e conseqüentemente a uma resposta Th2, promovendo uma infecção latente (BOGDAN *et al.*, 1991; BELKAID *et al.*, 2001).

Pacientes humanos com LV apresentam níveis séricos altos de TNF- α e de IL-6 que estão relacionadas com febre e astenia e o TNF- α pode contribuir para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes. O TGF- β está associado com a inibição da proliferação celular e pode ter papel importante na redução da produção de hemácias, neutrófilos e plaquetas pela medula óssea contribuindo para a patogênese da LV. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) não produzem IL-2, IL-12 ou IFN- γ quando estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Na doença aguda existe uma ausência ou baixa proliferação linfocitária e capacidade reduzida de produzir IFN- γ , fatores associados com a alta produção de IL-10, característica da LV. Também se observa uma ativação policlonal de linfócitos B, com produção exagerada de anticorpos, inclusive auto anticorpos, levando a um quadro de hipergamaglobulinemia e imunocomplexos circulantes, que não participam da resistência à leishmaniose (BACELLAR *et al.* 2000).

1.3 O hamster como modelo experimental na leishmaniose visceral

Camundongos e hamsters têm sido amplamente empregados como modelos experimentais para o estudo da LV. Diferentes linhagens de camundongos são geneticamente susceptíveis ou resistentes à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Entretanto, mesmo aqueles susceptíveis são capazes de controlar a infecção por *L. donovani* ou *L. chagasi* (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 1987), de forma que os modelos murinos não são ideais para se avaliar a infecção visceral, caracterizada por sua progressão e disseminação, geralmente vistas em humanos.

Na realidade, nenhum modelo experimental irá reproduzir exatamente a patologia de seres humanos. Para cada animal de laboratório utilizado, o desfecho da

infecção dependerá de uma combinação de fatores como a espécie de *Leishmania*, a virulência do parasito, o volume do inóculo e a rota de infecção (HANDMAN *et al.*, 2001). No entanto, os hamsters têm sido utilizados para estudar diferentes formas de leishmaniose causadas por diversas espécies de parasitas (CHILDS *et al.*, 1984; LINDOSO *et al.*, 2004). Diferentes rotas de infecção também têm sido utilizadas, sendo as mais comuns a intradérmica, a intracardíaca e a intraperitoneal (MATHIAS *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2004).

Hamsters infectados com formas visceralizantes de *Leishmania* (*L. donovani* ou *L. chagasi/infantum*), apresentam uma infecção progressiva no fígado, baço e medula óssea levando a muitas das manifestações clínicas desenvolvidas por seres humanos. São observadas diferentes alterações clínico-laboratoriais como anemia, leucopenia, trombocitopenia, e caquexia associada com o acúmulo de parasitas nas vísceras, além de hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia; e, se nenhuma medida terapêutica for iniciada os animais podem ir a óbito (GOSH *et al.*, 1987; PEARSON *et al.*, 1990; MELBY *et al.*, 2001). Contudo, muitos hamsters desenvolvem ascite severa antes de irem a óbito; e, estudos histológicos têm revelado a presença de glomerulonefrite mediada por imunocomplexos e amiloidose disseminada, que podem conduzir ao desenvolvimento de síndrome nefrótica (SARTORI *et al.*, 1991) sendo a última um achado raro em seres humanos e em cães com leishmaniose visceral (PEARSON *et al.*, 1996).

Esplenócitos de hamsters infectados com *L. donovani* expressam uma quantidade significativa de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Embora possuindo baixa ou nenhuma expressão de IL-4, quantidades substanciais de mRNA para TGF- β e IL-10 estão presentes. Além do mais, há uma expressão diminuída de mRNA para NOS2 e uma baixa geração de NO em hamsters infectados (MELBY *et al.*, 2001). Assim, a incapacidade em controlar a infecção pode estar relacionada à falta das funções efetoras dos macrófagos infectados (PEREZ *et al.*, 2006).

Por serem altamente susceptíveis os hamsters têm sido utilizados em estudos de fármacos, vacinas e mecanismos de imunossupressão (BASU *et al.*, 2005; GARG *et al.*, 2006). Além disso, são animais de fácil manipulação, de manutenção prática e de baixo custo, com possibilidade de obtenção em grande escala em curtos períodos de tempo e o tipo de resposta observada frente a estas infecções têm tornado estes vertebrados cada vez mais úteis em pesquisas. Entretanto, a carência de muitos reagentes e anticorpos

específicos de hamsters ainda constitui um obstáculo que vem sendo enfrentado, limitando as respostas obtidas planejadas em desenhos experimentais. Alguns destes obstáculos têm sido superados utilizando-se novas abordagens moleculares para a avaliação imunológica destes animais (MELBY *et al.*, 2001).

1.4 Vacinas para leishmaniose visceral

Estudos em vacinologia têm sido realizados com a intenção de criar uma nova estratégia eficiente para o controle e erradicação da LV (MODABBER, 1990; SANTOS *et al.*, 2002), a qual poderia proteger não somente os animais, como também, o homem, interferindo diretamente, ou indiretamente na cadeia epidemiológica de transmissão dessa importante endemia (MONJOUR *et al.*, 1985; MARZOCHI *et al.*, 1985; ASHFORD, 1996). No entanto, estes estudos apresentaram graus variados de proteção, o que tem incentivado a busca de novos imunógenos que possam proporcionar uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LV (HANDMAN, 2001).

Em geral, as vacinas para Leishmaniose são divididas em três categorias quanto ao processo de produção: (i) vacinas de primeira geração, onde foram empregadas preparações antigênicas tipicamente constituídas por antígenos brutos; (ii) vacinas de segunda geração, que consistem de parasitos vivos geneticamente modificados, bactérias ou vírus recombinantes como vetores de expressão e antígenos recombinantes e (iii) vacinas de terceira geração, que incluem as vacinas de DNA (PALATNIK-DESOUZA, 2008). Muito tem se trabalhado para a caracterização de antígenos parasitários capazes de induzir respostas imunes protetoras, possibilitando a produção de vacinas mais efetivas. Nesse contexto, as vacinas de segunda e terceira geração têm sido bastante exploradas (HANDMAN, 2001).

1.4.1 Vacinas empregando antígenos recombinantes

As proteínas recombinantes foram testadas isoladamente ou em combinação, sendo que na maioria das vezes para se obter o resultado desejado é necessário a formulação com adjuvante. Apesar de diferentes estudos utilizando antígenos recombinantes já terem sido realizados na intenção de se desenvolver uma vacina contra a LV, apenas alguns ofereceram um grau considerável de proteção. Entre os antígenos

testados, podemos destacar a proteína de superfície rHASPb1, que foi capaz de conferir proteção em camundongos contra desafio experimental com *L. donovani*, sem uso de adjuvante (STAGER *et al.*, 2000). A Leish-111f, uma proteína de fusão composta de três antígenos TSA (proteína oxidante tiol específico), LmSTI1 (proteína estresse induzível da *L. major*) e LeIF (Fator de Iniciação de Leishmania) fundidos, formulados com o adjuvante MPL-SE9 (Lipídio A do LPS atenuado) que protegeu camundongos contra LC e LV (COLER *et al.*, 2002, SKEIKY *et al.*, 2002, COLER *et al.*, 2007). Entretanto, com o uso de outros adjuvantes, esta formulação não conferiu proteção em cães infectados naturalmente com *L. infantum* (GRADONI *et al.*, 2005).

A proteína P é formada por uma família de inúmeras proteínas ácidas ribossomais, que se encontra dentro das subunidades ribossomais 60S (TOWBIN *et al.*, 1982). Em eucariotos, a família da proteína P, consiste em três membros, P0, P1 e P2, que formam um complexo pentamérico, em que homodímeros P1/P2 estão ligados a uma única proteína P0, através de sua porção terminal NH₂ (UCHIMI *et al.*, 1990). Estudos de inibição com anticorpos e depleção de subunidades da proteína P demonstraram que estas proteínas participam nas sínteses de outras proteínas (STACEY *et al.*, 1988).

A proteína ácida ribossomal de *L. infantum* (LiP0) é um componente estrutural da subunidade maior do ribossomo e foi descrita como um antígeno imunodominante, capaz de induzir respostas imunes, observando-se a presença de anticorpos específicos em soro de pacientes e cães infectados com *L. chagasi* - *L. infantum* (IBORRA *et al.*, 2005).

Em um trabalho utilizando-se a região C-terminal da LiP0 presente em uma proteína multicomponente administrada com BCG como adjuvante observou-se proteção em cães contra infecção por *L. infantum* (MOLANO *et al.*, 2003). Em outro estudo, neste caso utilizando-se camundongos imunizados com rLiP0 (proteína recombinante), detectou-se em esplenócitos e células do linfonodo uma maior produção de IFN- γ , sem, no entanto conferir proteção (IBORRA *et al.*, 2003).

Posteriormente, observou-se em camundongos, a eficácia da administração da rLiP0 associada a oligodeoxynucleotídeos de CpG. Quando utilizados como adjuvantes vacinais, apresentam efeitos potentes em respostas imunes celulares, induzindo proteção de longo prazo. Foi demonstrado nessa associação, proteção contra a reprodução do

parasito associada à produção de IFN- γ , indução de resposta Th1, sem prevenir, no entanto, resposta do tipo Th2 (IBORRA *et al.*, 2005).

Da mesma forma, este mesmo grupo mostrou que a imunização de camundongos com proteínas ribossomais (LRP) de *Leishmania* combinadas com CpG ODN como adjuvante induziram uma resposta Th1 específica com produção de anticorpos anti-LRP e IFN- γ , mas não IL-4 após estimulação *in vitro* de esplenócitos. Após a infecção, foi detectada a presença de IL-12 dependente da produção de IFN- γ e uma produção reduzida de IL-4 e IL-10 a qual foi associada à proteção (IBORRA *et al.*, 2008).

Mais recentemente, Ramirez e colaboradores (2009) avaliaram a proteção a longo prazo conferida pela rLiP0 e mostraram que camundongos imunizados foram capazes de controlar uma reinfecção por *L. major*, reforçando a idéia que a proteína LiP0 é um candidato promissor para estudo no desenvolvimento de vacinas tanto para LC quanto para LV.

1.4.2 Vacinas empregando bactérias ou vírus recombinantes como vetores de expressão

Uma nova abordagem das vacinas de segunda geração é o uso de vírus ou bactérias recombinantes expressando antígenos de *Leishmania*, onde bactérias (BCG, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) ou vírus (vaccinia virus) são utilizados como vetores de expressão e sistema adjuvante. A utilização destes microorganismos visa a atrair células para o sítio da imunização e induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (FLESCH & KAUFMANN 1995) e IFN- γ (LAGRANDERIE *et al.*, 1996).

Foi estudada em camundongos BALB/c uma vacina administrada por via oral, onde se utilizou uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* expressando o gene que codifica a proteína de superfície gp63 de *L. major*. Esta vacina induziu uma forte resposta Th1 ao antígeno e mostrou boa proteção após desafio com *L. major* em camundongos BALB/c (XU *et al.*, 1995). Em outro estudo utilizando uma abordagem experimental similar, a imunização de camundongos BALB/c com *Toxoplasma gondii* ts-4 transgênico que expressa a KMP-11 levou a proteção dos animais contra a infecção por *L. major* (RAMIREZ *et al.*, 2002).

De forma semelhante, o vírus Vaccínia, quando empregado como vetor expressando as proteínas de superfície de promastigotas GP46/M-2/PSA-2, induziu proteção contra posterior desafio por *L. amazonensis* (MCMAHON-PRATT *et al.*, 1993). Este mesmo vírus, expressando o antígeno LACK (receptor homólogo da quinase C ativada de *Leishmania*), protegeu cães contra infecção por *L. infantum* (RAMIRO *et al.*, 2003). Finalmente, a utilização desta mesma formulação protegeu camundongos contra *L. major*, utilizando uma estratégia *prime-boost* (sensibilização e reforço) (GONZALO *et al.*, 2002).

1.4.2.1 *Mycobacterium* como Vetor de Expressão

O bacillus *Calmette-Guérin* (BCG), é uma forma atenuada de *Mycobacterium bovis*. É a vacina mais utilizada no mundo, tendo sido administrada a 3 bilhões de indivíduos desde 1948, com baixa frequência de efeitos adversos sérios. Além disso, esta micobactéria funciona como um excelente adjuvante, pois é capaz de induzir uma resposta imune tanto humoral quanto celular e vem sendo utilizada no desenvolvimento de vacinas contra diferentes patógenos. A partir de uma única dose, que pode ser aplicada logo após o nascimento, pode-se produzir uma imunidade de longa duração que irá persistir por até 10 anos (OHARA, YAMADA 2001).

O BCG já foi testado experimentalmente como candidato vacinal expressando diversos antígenos de diferentes de microrganismos como vírus (HIV), bactérias (*Clostridium tetani*, *Borrelia burgdoferi*, *Streptococcus pneumoniae*) e parasitas (*Plasmodium falciparum*, *L. major* e *L. chagasi*, *Schistosoma mansoni*) (OHARA, YAMADA 2001).

A primeira proteína recombinante de *Leishmania* a ser expressa em diferentes vetores de expressão foi a gp63, uma metaloproteinase expressa na superfície de promastigotas de *L. major*, e quando utilizado como proteína recombinante, não protegeu camundongos contra a infecção por *L. major* (HANDMAN *et al.*, 1990). Entretanto, a imunização utilizando o gp63 expresso em BCG induziu significativa proteção em camundongos quando desafiados com *L. major* (ABDELHAK *et al.*, 1995) e promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* (CONNEL *et al.*, 1993).

Mais recentemente, o LCR1, antígeno extraído de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. chagasi*, que estimulam a proliferação de linfócitos T, também foi

expresso em BCG e conferiu proteção parcial em camundongos imunizados por via subcutânea e desafiados com *L. chagasi* (STREIT *et al.*, 2000). No entanto, o BCG é uma micobactéria patogênica e de crescimento lento, necessitando 3 a 6 semanas de cultivo em meio sólido (OHARA, YAMADA 2001). Nesse contexto, a busca por novas alternativas se faz necessário.

Alternativamente, o *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), é uma micobactéria de baixa patogenicidade que apresenta crescimento rápido, podendo propagar uma geração a cada 1-3 horas. Possui uma poderosa capacidade adjuvante, já sendo utilizado como modelo para *M. tuberculosis* e para outros genes estrangeiros, apresentando um alto nível de expressão. Diferentemente de outras espécies de micobactérias, como o BCG que sobrevive nas células do hospedeiro por inibição do amadurecimento do fagossomo, *M. smegmatis* é rapidamente destruído pelas proteases dos fagossomos de células infectadas, facilitando uma rápida absorção dos antígenos expressos e uma apresentação cruzada do antígeno (LÜ *et al.*, 2009).

M. smegmatis recombinante (*rM. smegmatis*) já foi testado experimentalmente como candidato vacinal para *M. tuberculosis*, como um sistema de expressão alternativo para BCG ou *M. tuberculosis*, e na imunoterapia contra o câncer expressando citocinas (LÜ *et al.*, 2009). Em outro estudo *rM.smegmatis* expressando Omp26, uma proteína de membrana de *Helicobacter pylori* conferiu proteção em camundongos após desafio com (LÜ *et al.*, 2009).

Mais recentemente foi publicado um estudo em que a imunização com *rM.smegmatis* expressando a fusão das duas proteínas de *M. tuberculosis* fundidas ESAT6-CFP10 conferiu a mesma proteção que o BCG em camundongos desafiados com *M. tuberculosis* (ZHANG *et al.*, 2010), tornando-se um bom candidato para substituição do BCG. No entanto, até o momento, nunca havia sido testada alguma forma de imunização utilizando-se o *rM. smegmatis* como vetor de expressão de antígenos para profilaxia da leishmaniose.

1.4.3 Vacinas de DNA

Vacinas de DNA, também conhecidas como vacinas “genéticas”, “de ácidos nucleicos” ou “de polinucleotídeo”, capacitam a produção de antígenos *in vivo*. Elas permitem a expressão de proteínas em células de mamíferos após a introdução das

construções de DNA codificando a proteína a ser testada. O DNA plasmidial é absorvido pela célula e translocado até o núcleo, onde é transcrito e posteriormente traduzido no citoplasma. A eficiência da captação e da expressão do DNA plasmidial é extremamente baixa, mas é suficiente para induzir uma resposta imune celular e humoral (GURUNATHAN *et al.*, 2000).

A possibilidade de manipular o DNA possibilita a criação de vacinas desenhadas para a geração de moléculas co-estimulatórias, citocinas ou de direcionar a produção de proteínas alvo em compartimentos celulares desejados. Estes fatores podem direcionar o tipo de resposta imune a ser desenvolvida. Adicionalmente, também é possível gerar vacinas de DNA multicompetentes, capazes de codificar diferentes antígenos e estimular a geração de imunidade contra uma variedade de patógenos ou fases do ciclo celular de um mesmo agressor, tornando a vacina de DNA uma estratégia atraente para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose. A velocidade com que a manipulação gênica pode ser conduzida pode oferecer uma produção rápida de diferentes tipos de vacinas. Outras vantagens oferecidas pelos plasmídeos de DNA em relação às formulações com proteínas são facilidades de estoque sem perda de potência e possibilidade de produção em larga escala com custo relativamente baixo (AZEVEDO *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 1999; GARMORY *et al.*, 2005).

Diferentes antígenos têm sido testados almejando uma proteção contra a LV (MORENO *et al.*, 2007). Dentre os antígenos de *Leishmania* que exibiram atividade protetora quando administrados como vacinas de DNA, destacam-se as proteínas de membrana e várias proteínas intracelulares, tais como as histonas nucleossomais, proteínas de choque térmico e diferentes proteínas ribossomais (DUMONTEIL, 2007; KHAMESIPOUR *et al.*, 2006).

O potencial protetor do antígeno LACK foi demonstrado contra a infecção por *L. major* (GURUNATHAN *et al.*, 1997). Utilizando modelo murino, este mesmo grupo demonstrou que, embora a vacina de DNA expressando LACK induzisse uma forte resposta imune do tipo Th1, ela não protegeu contra o desafio por *L. donovani* (MELBY *et al.*, 2001). Em contrapartida, Gomes e colaboradores, em 2007, demonstraram que a administração por via intranasal do DNA que codifica o LACK induziu proteção de camundongos contra a infecção por *L. chagasi*.

Da mesma forma, a proteína ácida ribossomal LiP0 quando administrada como vacina de DNA conferiu proteção em camundongos desafiados com *L. major*. Nesse estudo, apesar de não ter sido detectada a presença de anticorpos anti-LiP0, foi observado tanto em esplenócitos quanto em células do linfonodo um aumento na produção de IFN- γ (IBORRA *et al.*, 2003).

Apesar dos ensaios clínicos realizados até o momento terem apontado que as vacinas de DNA são bem toleradas e seguras, elas não foram capazes de demonstrar imunogenicidade suficiente em seres humanos (LU *et al.*, 2008). Assim, na tentativa de aperfeiçoamento da vacina de DNA, surgiu a metodologia denominada *prime-boost*. Nesta estratégia, há uma primeira exposição ao antígeno seguida de um reforço, que podem ou não ser diferentes entre si. No caso da imunização homóloga, a primeira exposição e o reforço são do mesmo componente por exemplo, DNA que codifica o antígeno ou a proteína recombinante. Na imunização heteróloga há uma combinação destes diferentes componentes, potencializando assim a resposta imune (RAMSHAW *et al.*, 2000).

A estratégia *prime-boost* tem se mostrado promissora no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose. De fato, quando a imunização com LACK foi feita de maneira heteróloga (DNA/proteína) em cães, estes apresentaram proteção contra a LV causada por *L. infantum*. Essa proteção foi correlacionada à ausência de sintomas, presença de anticorpos anti-*Leishmania* em baixa quantidade, maior grau de ativação de células T e maior produção de citocinas do tipo Th1 (RAMOS *et al.*, 2008).

Já, IBORRA e colaboradores (2005) empregaram esta estratégia utilizando plasmídeo de DNA (pcDNA3-LiP0) seguido de proteína recombinante (rLiP0). Esta estratégia levou a uma resposta imune humoral predominantemente do tipo Th2, com preponderância de Imunoglobulinas do tipo IgG2. No entanto, apesar de proteger camundongos C5BL/6 contra leishmaniose cutânea, não preveniu a progressão da doença em BALB/c após desafio com *L. major*.

2. JUSTIFICATIVA

As espécies de *Leishmania* que infectam o homem estão presentes em quase todos os continentes e são endêmicas em 88 países. A incidência anual estimada é de aproximadamente 1.5 milhões de casos de LT e 500.000 casos de LV (WHO, 2005) e a incidência da doença em pacientes imunocomprometidos vêm aumentando. As drogas utilizadas para o tratamento para leishmaniose além de possuírem alto custo e elevada toxicidade, têm gerado resistência em muitas cepas de *Leishmania*. A atual estratégia de controle da LV preconizada pela Organização Mundial de Saúde está baseada na detecção e eliminação de cães infectados, associado ao tratamento dos casos humanos e ao controle vetorial (TESH,1995). Como essas medidas de controle têm sido parcialmente efetivas, o desenvolvimento de vacinas tem sido considerado como prioritário pela Organização Mundial de Saúde. Esses fatores demonstram que a elaboração de uma vacina, tanto para humanos como para cães, seria a melhor estratégia para o controle da doença. A utilização de vacinas no mundo foi proposta como medida prática em Saúde Pública para o controle de várias doenças em distintas situações epidemiológicas. A viabilidade de uma vacina poderia causar um impacto no controle da doença diminuindo a frequência da infecção humana (MODABBER, 1990; HOMMEL *et al.*, 1995).

Duas formulações vacinais contra a leishmaniose visceral canina (LVC) foram lançadas, somente no Brasil, a primeira a partir do antígeno Fucose Manose Ligante, extraído de promastigotas de *L. donovani*, que demonstrou alguma eficácia contra a LVC (DA SILVA *et al.*, 2001; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). No entanto, o Ministério da Saúde determina que a esta vacina não seja utilizada como medida de controle da LV no Brasil, considerando que animais vacinados apresentam soroconversão, dificultando na diferenciação entre animais infectados e vacinados. (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE - NOTA TÉCNICA, 26 DE NOVEMBRO DE 2003). A segunda, composta do antígeno extraído de amastigotas de *Leishmania* (A2), apesar de não gerar soroconversão conferiu proteção parcial em cães imunizados e posteriormente infectados (FERNANDES *et al.*, 2008).

Com este propósito, neste trabalho, pretendemos avaliar se *Mycobacterium smegmatis* recombinante expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal

de *L.infantum* (LiP0), bem como a LiP0 como vacina de DNA utilizando tanto como estratégia homóloga como heteróloga, atuam na diminuição da carga parasitária em hamsters quando estes forem desafiados com *L. chagasi*.

3. HIPÓTESE

A imunização com *M. smegmatis* recombinante, expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal de *Leishmania infantum* (LiP0), bem como o plasmídeo e/ou proteína LiP0 utilizando estratégia homóloga (composta de plasmídeo de DNA) e heteróloga (composta de plasmídeo de DNA adicionado a proteína recombinante e CpG), confere proteção contra a LV em hamsters, reduzindo a carga parasitária contra infecção por *L. chagasi*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

4.1.1 Desenvolvimento de vacinas, utilizando r*Mycobacterium smegmatis*, expressando o gene que codifica a LiP0;

4.1.2 Imunização com vacinas de DNA que codificam a LiP0 utilizando-se duas estratégias: a homóloga e heteróloga.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Avaliação da infecção experimental de hamsters com *L. chagasi* por diferentes vias

4.2.2 Clonagem e expressão dos antígenos LiP0 de *Leishmania infantum* expresso em *Mycobacterium smegmatis* recombinante;

4.2.3 Avaliar a imunogenicidade de *Mycobacterium smegmatis* recombinante,

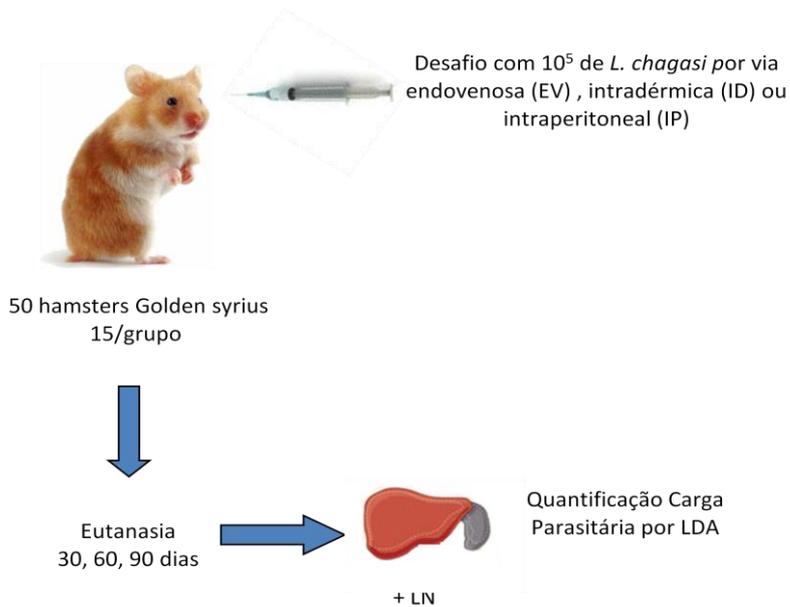
4.2.4 Avaliar a capacidade imunoprotetora das imunizações com *rMycobacterium smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 contra a infecção por *L. chagasi* em hamsters;

4.2.5 Avaliar a capacidade imunoprotetora das imunizações homóloga, utilizando-se plasmídeo de DNA que codifica a LiP0, e heteróloga, utilizando plasmídeo de DNA que codifica a LiP0, seguido de reforço com a proteína recombinante em combinação com imunomoduladores (CpG ODN), contra a infecção por *L. chagasi* em hamsters;

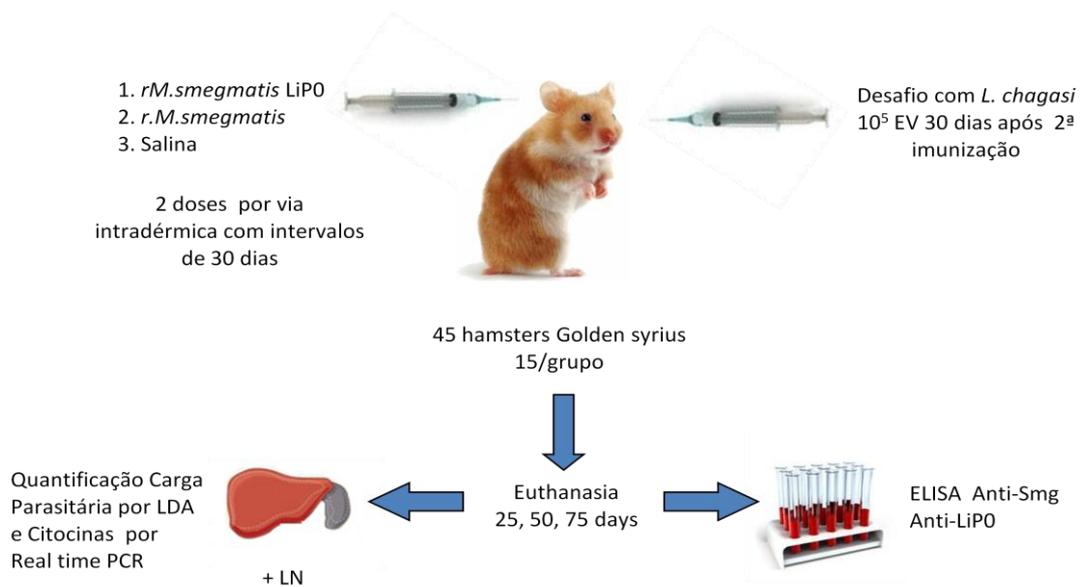
4.2.6 Avaliar o melhor candidato vacinal, considerando-se um bom candidato, aquele que reduz a carga parasitária em pelo menos 80%.

5. DESENHO EXPERIMENTAL

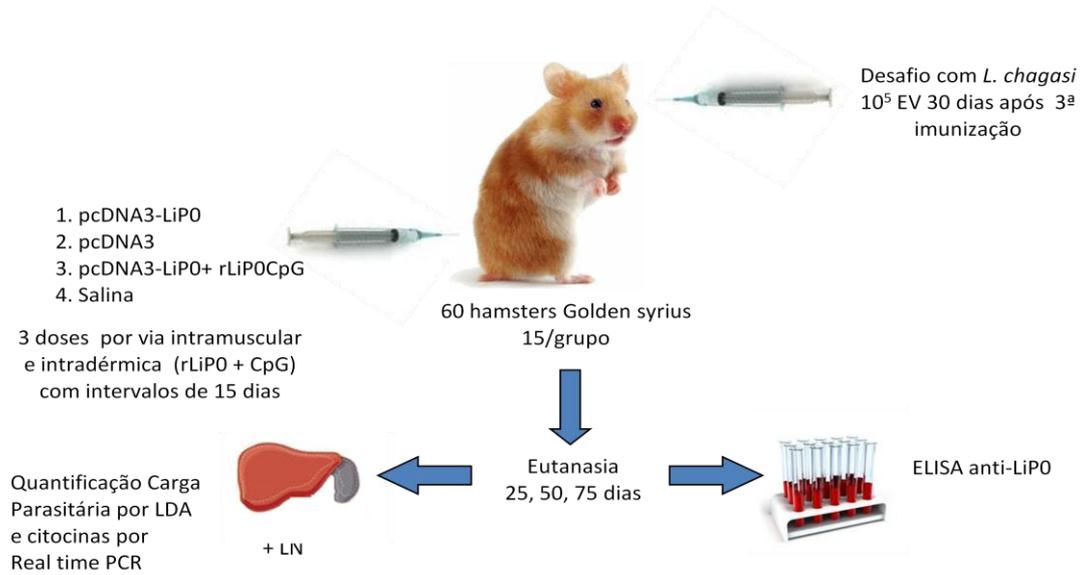
5.1 Avaliação da melhor via de infecção



5.2 Imunização com *rM.smegmatis*



5.3 Imunização pcDNA3LiP0



6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) da raça Golden Syrian, machos, com idade entre 2 e 4 meses foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqGM, protocolado com a numeração L-IGM-011/09.

6.2 Parasitas

Promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/00/BA262) foram cultivados em estufa BOD a 23°C em meio de cultura de insetos Schneider's (LGC, São Paulo, BRA) suplementados com soro bovino fetal a 10% (Crispion, Brasil), 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Sigma, EUA).

6.3 Expansão de r*M. smegmatis*

Os ensaios de clonagem e expressão de LiP0 em *Mycobacterium* recombinante foram realizados pelo Dr. Ivan P. Nascimento (Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação) – CPqGM. O genes do antígeno foi clonado em vetores de expressão para micobactéria dirigidos pelo promotor mutado da β -lactamase de *M. fortuitum*, pBlaF, e contendo o marcador de seleção para kanamicina. A expressão dos antígenos foi analisada por *Western blotting*, utilizando-se soro de coelho previamente imunizado com LiP0. Para a expansão de *M. smegmatis* sem inserto, foi utilizado 20 mL de meio líquido de meio Middlebrook 7H9 (Difco™) em um tubo Falcon de 50mL adicionou-se 50 μ L da colônia do *M. smegmatis*. Para o r*M. smegmatis* LiP0 foi utilizado 10 μ L do antibiótico Kanamicina 40% em 20 mL meio de Middlebrook 7H9. As bactérias foram levadas ao agitador 180 rpm/72h a 37°C. Posteriormente, as amostras foram sonicadas

por três minutos e mantidas a -20°C até serem utilizadas para as técnicas de ELISA e *Western Blotting*.

6.4 Western Blotting para detecção da expressão do gene da LiP0 expressa pelo r*M.smegmatis*

Foi realizada eletroforese em gel SDS-PAGE (acrilamida/bisacrilamida 29:1), com o gel de separação a 12%. Preparou-se um tampão contendo 1,5 M tris-HCl, com pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empilhamento (*stacking Gel*). A composição do tampão de eletroforese foi 25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 200 mM de glicina e 1% de SDS. A eletroforese das proteínas foi realizada a 70 Volts em gel 14cm X 16 cm com duração de 16 horas. As bandas protéicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se tampão com 25 mM de Tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba (Hoeffer-Scientific), por 2 horas, a 18 A. A membrana de nitrocelulose, foi bloqueada por 2 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS (10 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada 2 vezes em tampão TBS-Tween 0,2% por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o soro de coelho anti-LiP0, diluído 1/2000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS, por 16 horas à temperatura de 2 a 8°C. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes (15 minutos em cada lavagem), em tampão PBS-Tween 0,05%, sob agitação leve em temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário iGG anti-coelho conjugado a fosfatase alcalina, diluído 1/4.000 em leite em pó desnatado no tampão de incubação, por duas horas, à temperatura ambiente, sob agitação suave. A seguir, lavou-se a membrana seis vezes (15 minutos em cada lavagem) em PBS-Tween. Para revelação das bandas, utilizou-se 4 ml do revelador *Western Blue* (Promega) e a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

6.5 Proteína recombinante e pcDNA3-LiP0

A proteína recombinante de *Leishmania infantum* (LiP0), bem como o plasmídeo contendo inserto que codifica o gene da LiP0 de *Leishmania infantum* (pcDNA3-LiP0) e o plasmídeo vazio (pcDNA3) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Manoel Soto, da

Universidad Autonoma de Madrid, Espanha. Bactérias linhagem de *Escherichia coli* competentes foram transformadas com os plasmídeos e a purificação dos mesmos foi realizada utilizando-se um kit de isolamento de plasmídeo “Giga Prep Endofree” (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

6.6 Imunizações

6.6.1 Imunização com *rM.smegmatis*

Grupos de 15 hamsters Golden Syrius foram imunizados com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio ou expressando a proteína (LiP0), injetando-se por via intradérmica na orelha esquerda um volume de 20 μ L, utilizando-se agulha de 29G (BD Ultra-Fine, NJ, USA). O mesmo volume de solução salina foi inoculado nos animais controles. Cada grupo foi vacinado duas vezes com um intervalo de 30 dias entre as imunizações.

6.6.2 Imunização pcDNA3-LiP0

Nas imunizações com plasmídeos recombinantes (pcDNA3 ou pcDNA3-LiP0), os hamsters foram imunizados três vezes, pela via intramuscular, no membro posterior direito, com intervalos de 15 dias entre as imunizações. Cada animal recebeu 100 μ g de pcDNA3-LiP0 ou 100 μ g de pcDNA3, em um volume de 50 μ L (IBORRA et al., 2003).

Nas imunizações com plasmídeo recombinante (pcDNA3-LiP0) e proteína recombinante (rLiP0), os animais foram injetados com 100 μ g de plasmídeo recombinante (pcDNA3-LiP0), duas vezes, com intervalo de 15 dias, no membro posterior direito, pela via intramuscular. Quinze dias após a segunda imunização os animais receberam pela via intradérmica, na orelha direita, 10 μ g de proteína recombinante (rLiP0) (IBORRA et al., 2003) mais 1 nM de CpG ODN 1826 (18-24 pb - 5'TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' mol wt 6364,1G/mol) (SANE et al, 2010), em um volume de 20 μ L. O mesmo volume de solução salina foi inoculado nos animais controles. Para as imunizações, foram utilizadas seringas de insulina BD ULTRAFINE (BD Pharmingen, EUA) e agulha hipodérmica de 30G (271/2G). Quinze dias após a última imunização, amostras de sangue foram coletadas para a realização de análises de

ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*M. smegmatis* e IgG anti-LiP0. Cada grupo era composto de 15 animais.

6.7 ELISA para detecção de IgG anti-*M. smegmatis* e IgG anti-LiP0

Para os animais imunizados com *M. smegmatis* ou *rM. smegmatis* LiP0 os títulos de anticorpos foram mensurados antes da primeira imunização e 15 dias após a primeira e segunda imunizações. Para os animais imunizados com plasmídeo recombinante (pcDNA3 ou pcDNA3-LiP0), tanto na estratégia homóloga como heteróloga. Os títulos de anticorpos foram mensurados antes da primeira imunização e após a terceira imunização.

Para realização do ELISA anti-*M. smegmatis*, placas de 96 poços (Nunc, New York, USA) foram sensibilizadas com um 2 µg/ml de *M. smegmatis* sonificado três minutos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, 100µL/poço e incubadas durante à noite a 4 °C. Para realização do ELISA anti-LiP0 as placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µg/mL de LiP0 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, 100µL/poço incubadas durante à noite a 4 °C.

Foram realizadas três lavagens com 250µl/poço, de PBS Tween 20 0,05% e os sítios inespecíficos foram bloqueados, utilizando-se 200µl/poço de PBS Tween BSA 1% por 2h a 37°C. Foram realizadas mais quatro lavagens com PBS Tween 0,05% (250µl/poço) e adicionou-se 100µL/poço dos soros diluídos a 1/100 em PBS Tween 0,05% e incubou-se por 1h a 37°C. Após 3 lavagens com PBS Tween 0,05% (250µl/poço), adicionou-se 100µl/poço do anticorpo anti-imunoglobulina G (IgG) total de hamster diluído a 1/1.000 em PBS Tween 0,05% e as placas foram incubadas 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween 0,05% e incubadas com 100µl/poço do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração de 1mg/mL dissolvido em tampão carbonato-bicarbonato com 0.2 mM de cloreto de magnésio pH 9.6 por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi interrompida após adição de 50µl/poço de NaOH 3M. A leitura das placas foi realizada espectrofotometro SpectraMax 190 (Toronto, Canadá) (450nm) e analisado pelo software SoftMax Pro v5 (Toronto, Canadá). Os resultados foram expressos em densidade ótica (OD).

6.8 Infecção

Para a infecção experimental, utilizamos promastigotas estacionárias de *L. chagasi* (de 6 a 7 dias de cultura), a qual foi avaliada através de contagens diárias. Os parasitas foram lavados com salina à 1700g por 4 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi lavado com salina a 1700g por 10 minutos a 4°C por mais três vezes e re-suspensos na concentração de 1×10^7 /mL.

6.8.1 Avaliação da melhor via de Infecção

Sessenta hamsters foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi*, obtidas em fase estacionária da cultura, divididos em três grupos de 15 hamsters cada um, classificados segundo a via de infecção: infecção por via intradérmica, na face externa da orelha direita; infecção por via intraperitoneal e infecção por via endovenosa. Para este procedimento foram utilizadas seringas de insulina com agulha 29G de calibre (BD Ultra-Fine).

6.8.2 Infecção por via endovenosa

A via endovenosa foi escolhida por esta ter resultado em maior carga parasitária em menor intervalo de tempo, quando comparado às demais vias de infecção. Trinta dias após a última imunização, os hamsters foram desafiados por via endovenosa com 1×10^5 promastigotas de *L. chagasi* utilizando-se seringas com agulhas de 29G em volume de 20µL por animal.

6.9 Determinação da carga parasitária por diluição limitante

Todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, segundo protocolo do CEUA do CPqGM. Os hamsters do experimento avaliação da melhor via de infecção foram eutanasiados nos tempos 30, 60 e 90 dias após o desafio. Os animais imunizados com *Mycobacterium* ou plasmídeo de DNA foram eutanasiados nos intervalos de 25, 50

e 75 dias após o desafio. Durante a necropsia dos animais foram coletados baço, fígado e linfonodo submandibular. O baço e fígado foram pesados e retirou-se um fragmento de 0,035 a 0,045g. As amostras foram posteriormente maceradas com 1 mL meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA) em peneira ultrafina descartável e homogeneizadas, com 4 ml de meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA), suplementado com soro bovino fetal a 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Ao macerado do linfonodo foi adicionado 2mL de solução salina para lavagem das células (300g por 10 minutos a 4°C), que, em seguida, foram resuspensas em 1mL de meio completo para contagem de 10^7 células. Foi realizada diluição seriada dos homogeneizados com diluições seriadas de 1:5 à 1:1000 em placas de 96 poços contendo meio sólido NNN ágar sangue (Novy-MacNeall-Nicolle) (NICOLLE, 1909). Seis replicações foram feitas para cada diluição. As placas foram analisadas em microscópio invertido para verificação do aparecimento de formas promastigotas de *L.chagasi*, a partir do terceiro até o décimo dia de cultura. Neste período, as placas foram incubadas numa estufa BOD a 23 °C. A carga parasitária do baço, fígado e linfonodos foi analisada utilizando a técnica de diluição limitante descrita previamente por TITUS *et al.* (1991) e a determinação da carga parasitária baseada na diluição limitante foi estimada utilizando-se o programa ELIDA (LIMA *et al.*, 1997).

6.10 Extração de RNA e Preparo do cDNA para Detecção de Citocinas

As células do linfonodo dos hamsters foram utilizadas para obtenção de RNA para se verificar a produção de citocinas. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a contagem das células do linfonodo, uma alíquota dói separada para a determinação da carga parasitária e as demais foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram ressuspensas em 300µL de Trizol para liberação do RNA. O RNA foi isolado e precipitado na presença de clorofórmio e isopropanol. Após lavagem com etanol a 70% e a 100%, o RNA foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato. A concentração e purificação do RNA foram determinadas por leitura em espectrofotômetro utilizando-se comprimentos de ondas de A_{260} e A_{280} nm. Após a quantificação, o material foi mantido a -70°C. A síntese de cDNA foi realizada

acrescentando-se 2µg de RNA a 30µL de uma mistura contendo oligonucleotídeos (dt) 12-18, 2,5 µM, dNTPs, 1mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), tampão 1X (Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2mM), 20U de inibidor de ribonuclease e 50U da transcriptase reversa Superscript II (Gibco, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada no termociclador a uma temperatura de 42°C durante 50 minutos. Esta reação foi interrompida a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos. Em seguida as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

6.11 Quantificação da Produção de Citocinas por PCR em Tempo Real

Os *primers* (iniciadores) utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos *primers* variou de 18 a 23 bases, a temperatura de anelamento (T_m , do inglês “melting temperature”) de 59°-61°C e o conteúdo de GC de 40-60% e foram utilizados na concentração de 250nM. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 90 a 110pb e T_m 75°- 85°C. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔR_n ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$), onde R_n^+ = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e R_n^- = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔR_n permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔR_n ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔR_n , que é uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔR_n cruza o *Threshold* corresponde ao C_t (*cycle*

threshold) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência}$, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$.

A especificidade dos *primers* foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio que mantém as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*). A Tabela 1 mostra a sequência de e as características dos *primers* utilizados.

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão gênica assume que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência é igual a 2, ou seja, 100%. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, onde E corresponde à eficiência e *slope* corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada gene estudado foi realizada uma reação com diluições seriadas de amostra de cDNA (1/5 a 1/1250) e o *primer* de interesse.

Tabela 1 Descrição e identificação dos genes estudados, sequência dos *primers* utilizados e características do produto de amplificação.

| Primers | Identificação Gene Bank | Sequência | Tamanho Amplicon (° C) | Tamanho Amplicon (PB) |
|---------------|-------------------------|--|------------------------|-----------------------|
| GAPDH | X02231 | 5'CTGACATGCCGCCCTGGAG 3'TCAGTGTAGCCCAGGATGCC | 82 | 101 |
| IFN- γ | M28621 | 5'GAAGCTCACCAAGATTCCGGTAA 3'TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT | 78 | 91 |
| IL-10 | AF046210 | 5'AGACGCCTTTCTCTTGGAGCTTAT 3'GGCAACTGCAGCGCTGTC | 77 | 102 |
| TGF- β | | 5'GCTACCACGCCAACTTCTGTC 3'TGTTGGTAGAGGGCAAGG | 57.3 | 21 |

6.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Dados não paramétricos foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças observadas entre os grupos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis (one-way ANOVA), seguido pelo pós teste de Dunns. A carga parasitária foi avaliada pelo cálculo da área sob a curva resultante dos três tempos analisados dos animais imunizados e de animais controle, após o desafio. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0.05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação das vias de infecção

Inicialmente, realizamos experimentos de infecção de hamsters por diferentes vias (endovenosa, intradérmica e intraperitoneal), utilizando 10^5 *Leishmania* em fase estacionária de crescimento, para identificar em qual estratégia obteríamos uma infecção rápida e eficiente, com acometimento completo dos órgãos linfóides (linfonodo sub-mandibular, fígado e baço) simulando a patologia de uma infecção grave por *Leishmania chagasi*. A carga parasitária do linfonodo, fígado e baço foram avaliadas pelo método de diluição limitante, nos tempos 30, 60 e 90 dias após o desafio para os grupos infectados por via intraperitoneal, intradérmica e endovenosa.

7.1.1 Carga parasitária no linfonodo, fígado e baço

Conforme mostrado na Figura 2, não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa na carga parasitária do linfonodo de hamsters entre as diferentes vias utilizadas. Entretanto, é possível perceber um maior aumento da carga parasitária nos grupos intraperitoneal e endovenoso. No grupo intradérmico, por sua vez, observa-se um aumento progressivo da carga parasitária ao longo da infecção, durante os períodos avaliados (Fig.2 A, B e C).

A detecção da carga parasitária no fígado se mostrou mais elevada no grupo endovenoso, observando-se cerca de 10^{10} parasitas/fígado no período de 30 dias, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos intraperitoneal e intradérmico (Fig. 2 D). O grupo endovenoso manteve-se em torno de 10^8 no decorrer da infecção, sendo que a significância estatística foi observada nos tempos de 60 dias em relação aos grupos intraperitoneal e intradérmico (Fig. 2 E) e 90 dias quando comparado com o grupo intradérmico (Fig. 2 F).

A carga parasitária no baço para o grupo endovenoso nos dias 30 e 90 pós-infecção foi estatisticamente significante quando comparada aos grupos intradérmico e intraperitoneal, respectivamente, no mesmo período (Figs. 2 G e I). No grupo intradérmico, apesar dos animais apresentarem um aumento progressivo da carga parasitária no baço, no decorrer da infecção, não foram detectadas diferenças estatísticas. Por outro lado, o grupo intraperitoneal manteve-se em torno de 10^4 parasitas/baço no decorrer da infecção (Fig. 2 G, H, I).

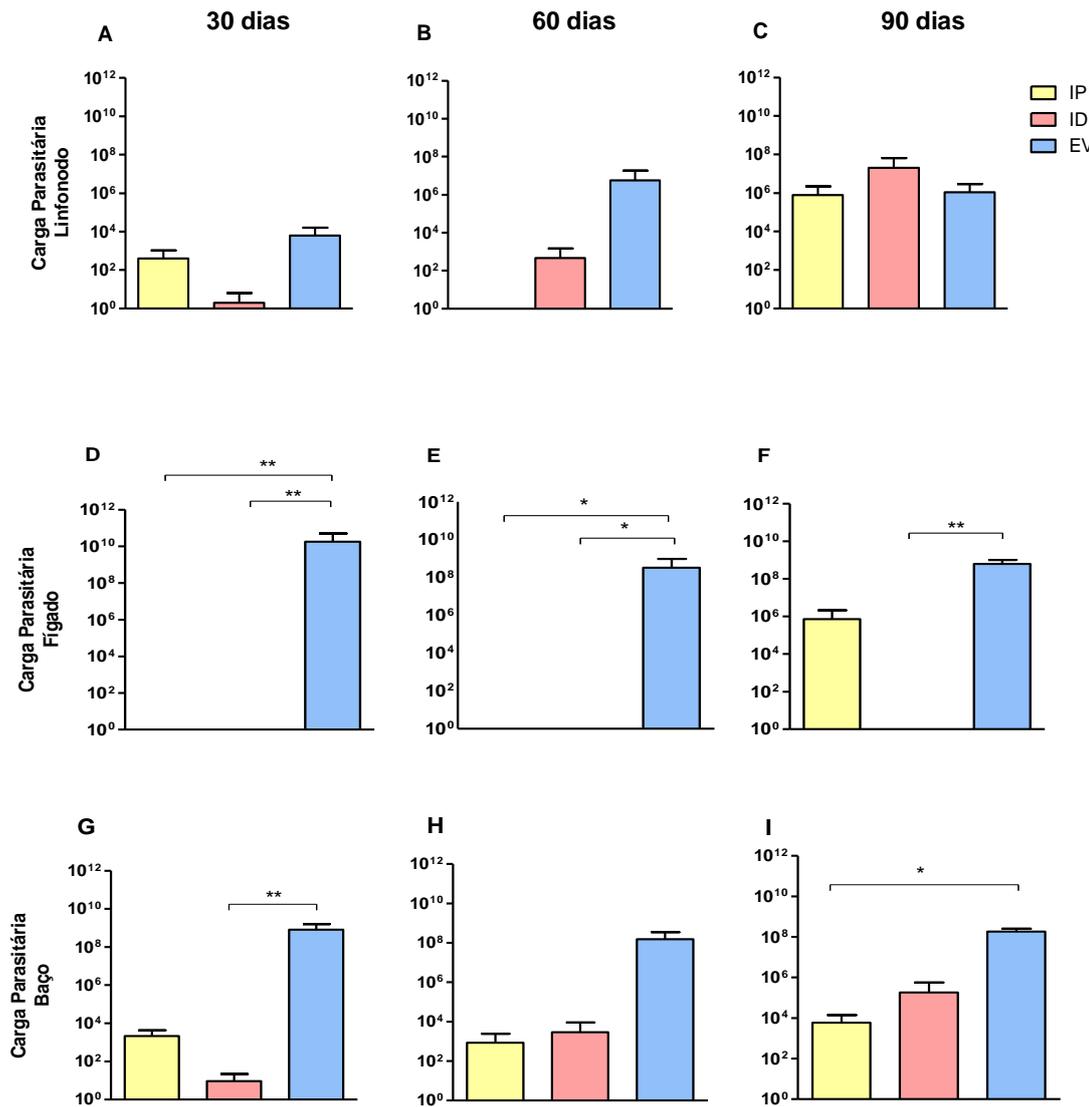


Figura 2. Carga parasitária no linfonodo, fígado e baço de hamsters desafiados com *L. chagasi*, analisando-se as vias de infecção: Hamsters Golden Syrius (15 animais/grupo) foram infectados com 10⁵ de *L. chagasi* pelas vias intraperitoneal (IP), intradérmica (ID) e endovenosa (EV), e avaliou-se a carga parasitária do linfonodo (A, B, C), baço (D, E, F) e fígado (G, H, I) nos tempos 30, 60 e 90 dias após a infecção. As colunas representam a média e o desvio padrão dos resultados obtidos de um único experimento. (*, p < 0,0284; **, p < 0,0036)

7.2 Imunização com *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0

7.2.1 Avaliação da expressão da LiP0 por *Western Blotting*

Com a finalidade de se observar a expressão da LiP0 em *rM. smegmatis*, realizou-se a técnica de *Western Blotting*, utilizando-se como anticorpo primário soro de coelho previamente imunizado com a proteína LiP0, e como anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugada a fosfatase alcalina. No *Western Blotting* observamos reconhecimento inespecífico de proteínas na amostra de *M. smegmatis* e provavelmente houve quebra da proteína LiP0 *rM. smegmatis* (Fig. 3 - coluna 3), uma vez que esta originalmente tem um peso molecular (PM) de 33kDa e nos nossos experimentos detectou-se uma banda com PM de 20kDa.

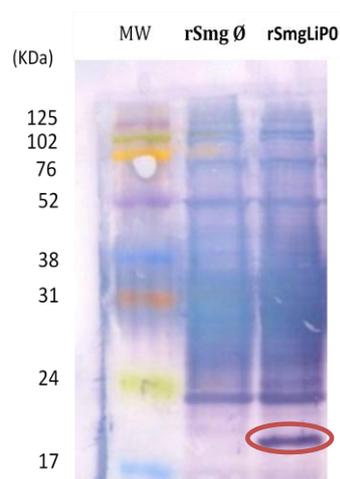


Figura 3. Avaliação da expressão do gene da proteína ácida ribossomal de *L.infantum* (Lip0) pela técnica de Western Blotting em amostras de *rM.smegmatis* (rSmg Ø), e *rM.smegmatis* expressando a proteína Lip0 (rSmgLiP0).

7.2.2 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-*M. smegmatis* em soros de hamsters pelo método de ELISA

Com a finalidade de avaliar a imunogenicidade do r*M. smegmatis*, coletou-se soros dos animais imunizados e controle (salina) nos tempos antes da imunização, após a primeira e a segunda imunização para a detecção de anticorpos específicos contra a micobactéria. Observou-se que nos grupos imunizados com *M. smegmatis* vazio e r*M. smegmatis* LiP0, houve a produção de anticorpos IgG anti-*M. smegmatis* logo após a primeira imunização, a qual foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina (fig. 6 B,C), demonstrando a capacidade antigênica deste veículo na indução da resposta imune.

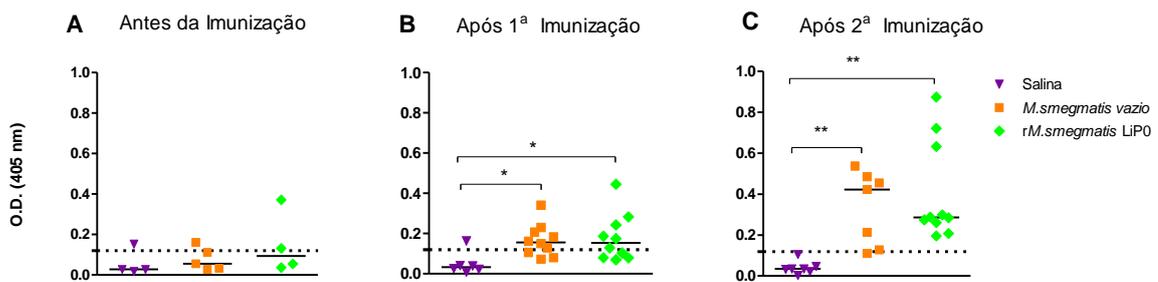


Figura 4. Avaliação da resposta imune humoral anti-r*M. smegmatis* em Hamsters Golden Syrian imunizados com *M. smegmatis* e r*M. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0. Hamsters Golden Syrian foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio e r*M. smegmatis* LiP0. Os soros dos animais imunizados e salina controle foram coletados nos tempos antes da imunização (A), após primeira (B) e segunda imunização (C) para a detecção de anticorpos específicos contra a micobactéria (*, $p < 0,0117$, **, $p < 0,0007$).

7.2.3 Detecções de anticorpos da classe IgG anti-LiP0 em soros de hamsters imunizados com *rM. smegmatis* LiP0 pelo método de ELISA

Avaliou-se o efeito das imunizações com *rM. smegmatis* expressando o gene da proteína LiP0 e grupos controles (*M. smegmatis* vazio e salina), nos tempos antes da imunização, após a primeira e a segunda imunização para a produção de anticorpos IgG totais contra proteína LiP0 (Fig 5 A, B e C). Entretanto, não foi observada significância estatística quanto à produção de anticorpos em nenhum dos grupos imunizados. Estes resultados mostram que a proteína LiP0 expressa em *rM.smegmatis* não induziu resposta imune humoral em hamsters (Fig. 5C).

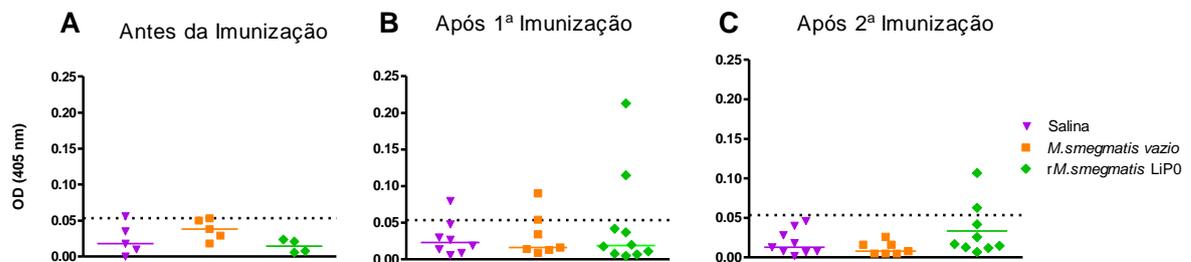


Figura 5. Avaliação da resposta imune humoral anti-LiP0 em Hamsters Golden Syrian imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0. Hamsters Golden Syrian foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0. Os soros dos animais imunizados e salina controle foram coletados nos tempos antes da imunização (A), após primeira (B) e segunda imunização (C) para a detecção de anticorpos específicos contra a LiP0.

7.2.4 Análise de citocinas por Real Time PCR

O perfil de citocinas (IFN- γ , TGF- β e IL-10) produzidas pelas células dos hamsters imunizados com *M. smegmatis* ou *rM.smegmatis* LiP0 foi avaliado por Real Time PCR. Assim, quinze dias após a segunda imunização os animais foram eutanasiados e o linfonodo drenante coletado para extração de RNA e posterior síntese do cDNA. A expressão de IFN- γ , TGF- β e IL-10 foi analisada por PCR em tempo real. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram normalizados em relação ao gene endógeno GAPDH e calibrados com os níveis de expressão observados em animais controle. Os resultados foram expressos no número de vezes em que os níveis de expressão gênica dos animais imunizados foram maiores em relação aos animais controle, conforme descrito em materiais e métodos.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de animais imunizados e o grupo controle. Entretanto, observa-se que os animais imunizados com *rM.smegmatis* LiP0 apresentaram maior concentração de IFN- γ (Fig. 6 A) e menor quantidade de TGF- β e IL-10 quando comparado aos grupos controle (Fig.6 B e C).

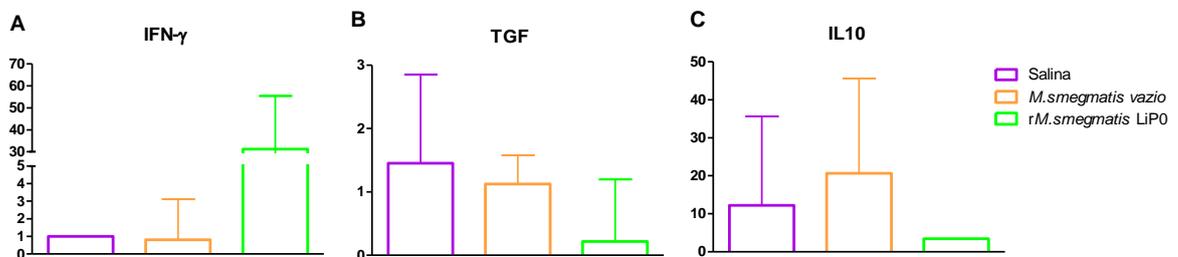


Figura 6. Avaliação da expressão de citocinas em linfonodos de hamsters Golden Syrian imunizados com *M. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0. Hamsters Golden Syrian (5 animais/grupo) foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0. Quinze dias após a segunda imunização os animais foram eutanasiados e o linfonodo drenante coletado para extração de RNA e posterior síntese do cDNA. A expressão de IFN- γ , TGF- β e IL-10 foi analisada por PCR em tempo real.

7.2.5 Análise da carga parasitária no linfonodo

Embora não tenhamos encontrado uma significativa resposta protetora nos animais, resolvemos desafiar os hamsters, para verificar o possível efeito desta vacina na infecção por *L. chagasi*. Como discutido anteriormente, optamos pela via endovenosa que resulta em uma maior carga parasitária no baço e fígado em um intervalo de tempo mais curto. Com o objetivo de se avaliar a carga parasitária após a imunização, foi retirado o linfonodo submandibular direito, visto que, a via de desafio determinada foi endovenosa e diante disso não é possível definir um linfonodo drenante.

A partir da análise dos resultados, foi possível observar que os grupos de animais imunizados com *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0 apresentaram um aumento progressivo do número de parasitas. Já os animais do grupo salina, apresentaram um decréscimo da carga parasitária aos 50 dias após a infecção, seguido de um aumento acentuado aos 75 dias após o desafio (Fig. 7 A). Quando avaliamos a carga parasitária calculado pela comparação da área sob a curva resultante, tampouco observamos uma diferença significativa (Fig. 7 B).

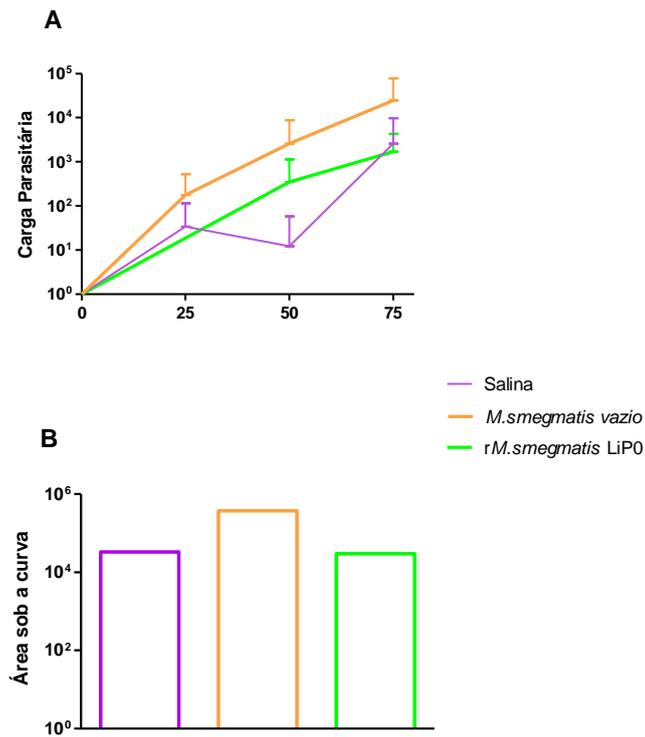


Figura 7. Carga parasitária no linfonodo de hamsters imunizados com *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrian (15 animais/grupo) foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10⁶ UFC de *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0 e infectados com 10⁵ de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a segunda imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias, os animais foram eutanasiados e o linfonodo esquerdo coletado para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. As linhas do gráfico A representam a média mais desvio padrão da carga parasitária. O gráfico B representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de três experimentos.

7.2.6 Análise do peso e carga parasitária no fígado

O peso dos fígados dos hamsters não diferiu no decorrer do tempo entre os animais imunizados e controles. Apenas aos 75 dias após a infecção o grupo imunizado com *M. smegmatis* vazio apresentou um pequeno aumento em relação aos demais grupos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (Fig. 8 A, B e C).

Analisando todos os grupos de hamsters, observou-se que o número de parasitas no fígado aumentou progressivamente nos tempos de 25 e 50 dias após a infecção. Surpreendentemente, aos 75 dias após a infecção, os hamsters imunizados com *rM. smegmatis* expressando a LiP0, apresentaram uma carga parasitária de 2 logarítimos maior que os grupos controles. No entanto, esta diferença não mostrou ser significativa (Fig. 8 A, B e C).

Quando relacionamos o peso com a carga parasitária dos os hamsters imunizados com *rM. smegmatis* expressando a LiP0, observa-se que, apesar do aumento na carga parasitária aos 75 dias após a infecção, o peso do órgão apresenta um pequeno decréscimo de 1,0 grama em relação ao período anterior, demonstrando neste caso não haver relação entre peso e carga parasitária (Fig. 8 C).

Quando avaliamos a carga parasitária, calculado pela comparação da área sob a curva resultante observamos que a imunização não resultou em diferenças significativas (Fig. 8 D). Com isso, constatamos não haver diferenças estatísticas entre o grupo imunizado e controles (Fig. 8 A, B e C).

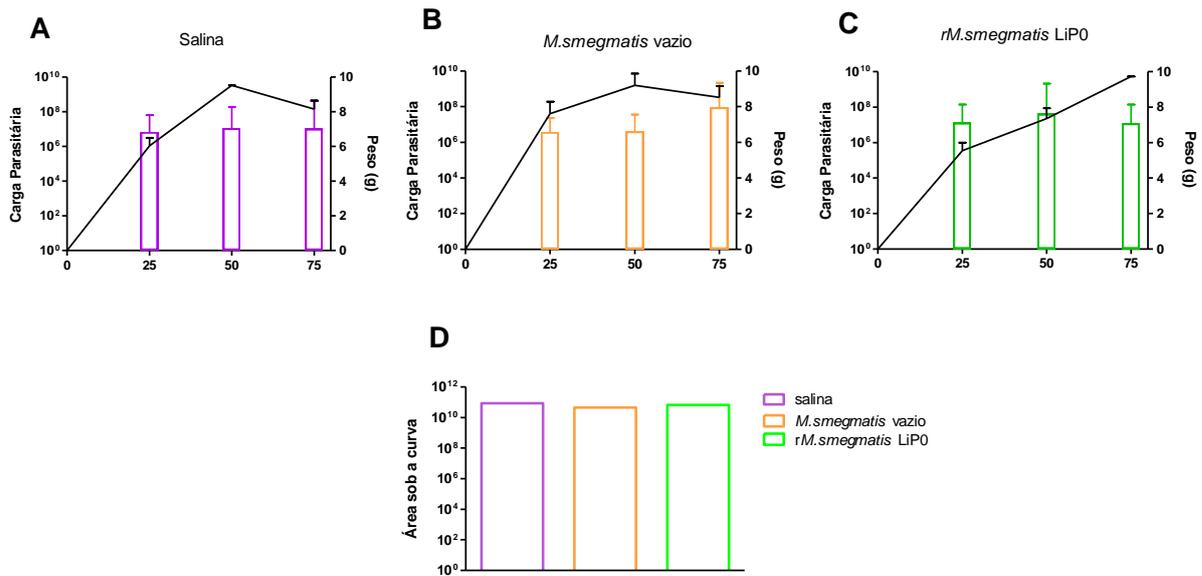


Figura 8. Peso e carga parasitária no fígado de hamsters imunizados com *rM. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrian (15 animais/grupo) foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0 e infectados com 10^5 de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a segunda imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias, os animais foram eutanasiados e o fígado coletado e pesado (g) e também utilizado para a quantificação da carga parasitária por diluição limitante. Nos gráficos A, B e C, as linhas representam a média mais desvio padrão da carga parasitária e as colunas representam a média mais desvio padrão do peso. O gráfico D representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de três experimentos.

7.2.7 Análise do peso e carga parasitária no baço

Na avaliação do peso do baço, observou-se que aos 25 dias após a infecção não houve diferença no peso do órgão entre os grupos analisados, entretanto aos 50 dias observa-se um aumento do peso do baço nos animais imunizados com r*M.smegmatis* LiP0 que se mantém aos 75 dias (Fig. 9 A, B e C). O *M.smegmatis* vazio, apesar de apresentar no tempo de 75 dias um peso maior, 0,2 gramas em comparação com o período anterior, esta diferença não mostrou ter diferença significativa (Fig. 9 C).

Na avaliação da carga parasitária no baço observa-se que todos os grupos analisados apresentam um aumento progressivo do número de parasitas aos 25 e 50 dias após a infecção. Aos 75 dias, é observado nos grupos controles, uma estabilização da carga parasitária no baço, enquanto que no grupo imunizado com r*M. smegmatis* LiP0, verifica-se um discreto decréscimo, sem no entanto, ser observada significância estatística (Fig. 9 A, B e C).

Quando avaliamos a carga parasitária, calculado pela comparação da área sob a curva resultante observamos que a imunização não resultou em diferenças (Fig. 9 C).

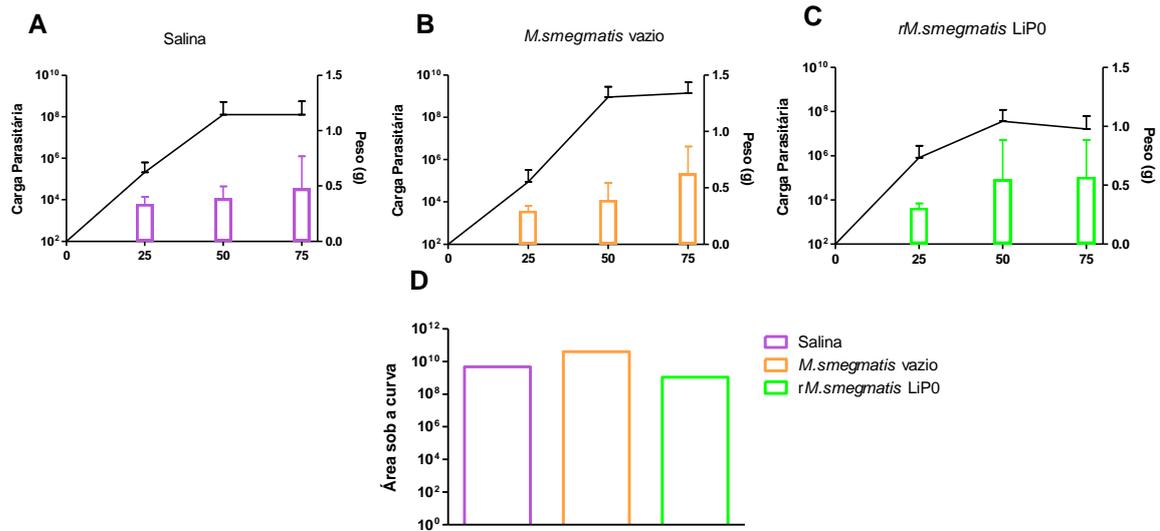


Figura 09. Peso e carga parasitária no baço de hamsters imunizados com *rM. smegmatis* e *rM. smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrius (15 animais/grupo) foram imunizados duas vezes com intervalo de trinta dias por via intradérmica com 10^6 UFC de *M. smegmatis* vazio e *rM. smegmatis* LiP0 e infectados com 10^5 de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a segunda imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias, os animais foram eutanasiados e o baço coletado e pesado e também utilizado para a quantificação da carga parasitária por diluição limitante. Nos gráficos A, B e C, as linhas representam a média mais desvio padrão da carga parasitária e as colunas representam a média mais desvio padrão do peso. O gráfico D representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de três experimentos.

7.3 Imunização com pcDNA3LiP0

A ausência de redução de carga parasitária entre os grupos imunizados com *rM.smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína LiP0 e seus controles nos induziu a hipotetizar se a proteína ácida ribossomal administrada como vacina de DNA utilizando estratégia homóloga, constituída de 3 imunizações com somente DNA, e heteróloga, composta de vacina de DNA e proteína recombinante mais adjuvante (CpG-ODN), seria capaz de induzir proteção e redução da carga parasitária em hamsters desafiados com *L.chagasi*.

7.3.1 Detecções de anticorpos da classe IgG anti-LiP0 em soros de hamsters pelo método de ELISA

Com a finalidade de avaliar a imunogenicidade de LiP0, coletou-se soros dos animais imunizados e controles, quinze dias após a terceira imunização para a detecção de anticorpos específicos contra a proteína. Observou-se que no grupo imunizado com a estratégia heteróloga composta de duas doses de pcDNA3-LiP0 (100ug cada) por via intramuscular seguida de uma dose reforço utilizando rLiP0 + CpG-ODN por via intradérmica, ocorreu produção de anticorpos IgG anti-LiP0, a qual foi estatisticamente significativa quando comparado aos grupos que receberam a estratégia homóloga composta apenas de pcDNA3LiP0 e plasmídeo vazio (pcDNA3) e salina (Figura 10).

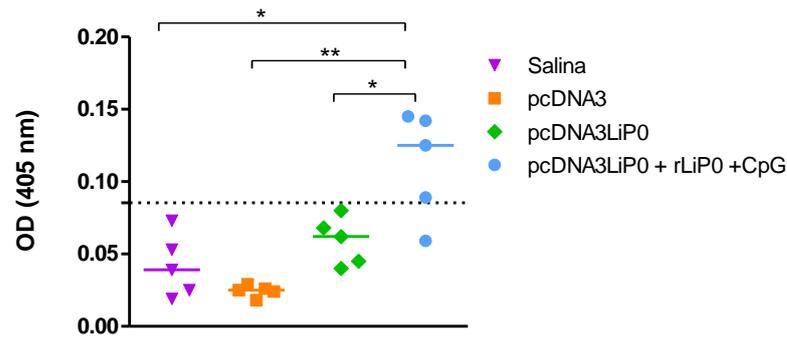


Figura 10. Avaliação da resposta imune humoral anti-LiP0 em hamsters imunizados com pcDNA3, pcDNA3 LiP0 e pcDNA3 LiP0 + rLiP0 e CpG. Hamsters Golden Syrian foram imunizados três vezes com intervalo de quinze dias por via intramuscular (pcDNA3 e pcDNA3LiP0) e intradérmica (rLiP0 +CpG) com 100µg de pcDNA3 ou pcDNA3LiP0 e 10µg de rLiP0 + 1nM CpG. Os soros dos animais imunizados e salina controle foram coletados quinze dias após a terceira imunização para a detecção de anticorpos específicos contra a LiP0 (*, $p < 0,0209$, **, $p = 0,0041$).

7.3.2 Análise da carga parasitária no linfonodo

Na análise da carga parasitária do linfonodo de hamsters é possível observar que aos 25 dias após o desafio, nos animais imunizados com o plasmídeo (DNA) que codifica a proteína LiP0, ocorreu um aumento na carga parasitária equivalente a quase cem vezes mais que os demais grupos. Entretanto, no decorrer da infecção, nos tempos avaliados, percebe-se que os o grupo pcDNA3LiP0 parece estabilizar em 10^2 parasitas aos 50 dias chegando a 10^3 aos 75 dias após a infecção, enquanto os demais grupos apresentam um aumento acelerado, destacando-se o grupo salina que alcança até 10^5 parasitas. Surpreendentemente, o grupo que recebeu o plasmídeo vazio (pcDNA3) foi o que apresentou a menor carga parasitária entre todos os grupos, mas esta diferença não mostrou ser significativa (Fig. 11 A).

Quando realizamos a Área sob a Curva, observa-se que o grupo Salina se destaca, apresentando uma carga parasitária de 10^6 parasitas, equivalente a uma diferença de dois logaritmos maior que os demais grupos, mas esta diferença não é estatisticamente significativa (Fig. 11 B).

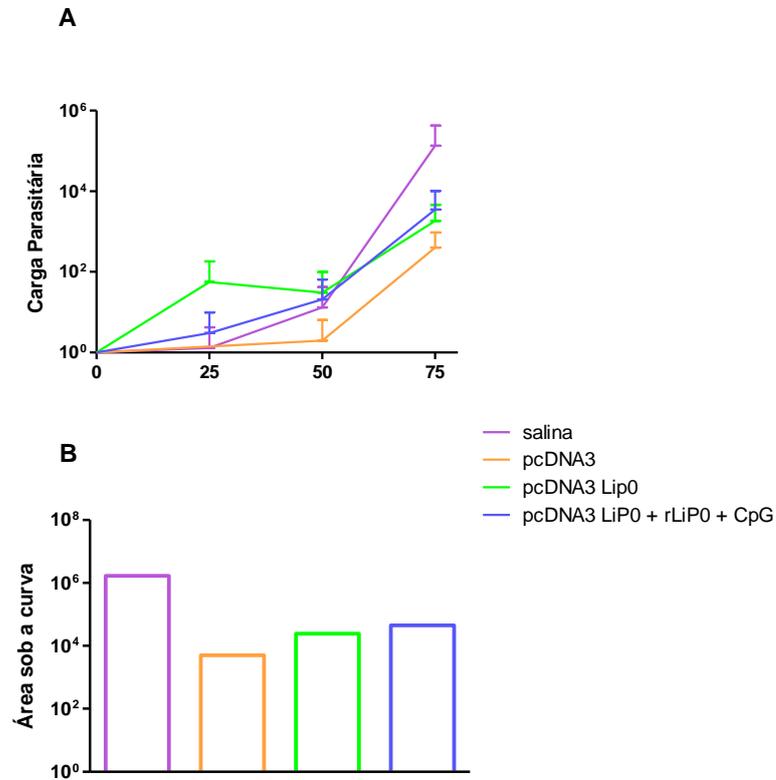


Figura 11. Carga parasitária no linfonodo de hamsters imunizados com pcDNA3, pcDNA3-LiP0 e pcDNA3LiP0 + rLiP0 e CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrian (15 animais/grupo) foram imunizados três vezes com intervalo de quinze dias por via intramuscular (pcDNA3 e pcDNA3LiP0) e intradérmica (rLiP0 +CpG) com 100ug de pcDNA3 ou pcDNA3-LIP0 e 10ug de rLiP0 + 1nM CpG e infectados com 10⁵ de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a terceira imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias após o desafio, os animais foram eutanasiados e o linfonodo coletado para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. As linhas do gráfico A representam a média mais desvio padrão da carga parasitária. O gráfico B representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de um único experimento.

7.3.3 Análise do peso e carga parasitária no fígado

Quando realizamos a análise do peso do fígado é possível observar um discreto aumento progressivo do tamanho do órgão ao decorrer da infecção em todos os grupos. No entanto, no grupo salina o peso do órgão não parece estar relacionado com a carga parasitária, visto que os animais apresentam aos 50 e 75 dias após a infecção um aumento de peso com decréscimo da carga parasitária (Fig. 12 A). Da mesma forma, o grupo imunizado com a estratégia homóloga, apresentou um aumento acentuado da carga parasitária sem alteração no peso do órgão (Fig.12 C). Inversamente, os animais imunizados tanto com o plasmídeo vazio e com a estratégia heteróloga apresentaram, neste mesmo período, um aumento discreto do peso do fígado, acompanhado de um aumento acentuado da carga parasitária (Fig 12. B, D). Entretanto, na análise da área sob a curva estas diferenças não mostraram significância estatística (Fig 12. E).

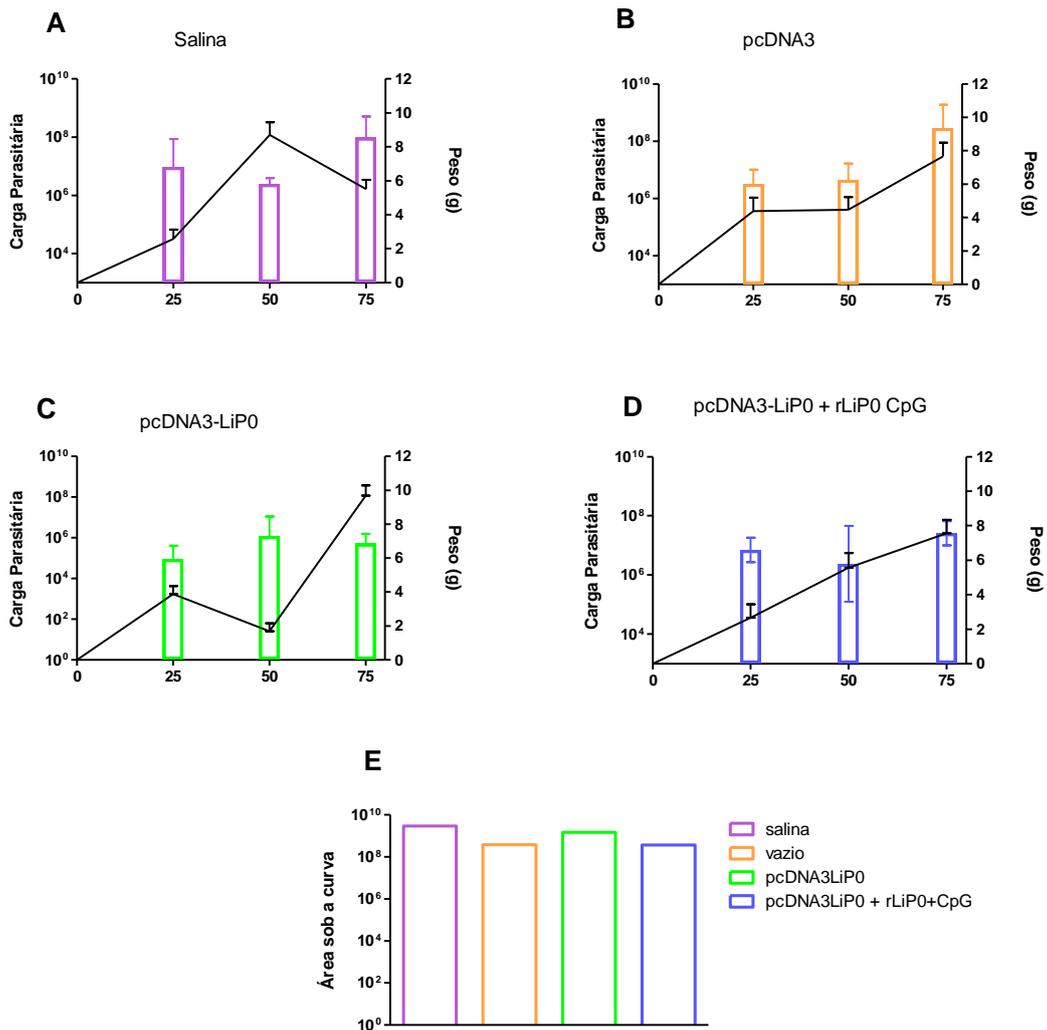


Figura 12. Carga parasitária no fígado de hamsters imunizados com pcDNA3, pcDNA3-LiP0 e pcDNA3LiP0 + rLiP0 e CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrian (15 animais/grupo) foram imunizados três vezes com intervalo de quinze dias por via intramuscular (pcDNA3 e pcDNA3LiP0) e intradérmica (rLiP0 +CpG) com 100 μ g de pcDNA3 ou pcDNA3-LiP0 e 10 μ g de rLiP0 + 1nM CpG e infectados com 10^5 de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a terceira imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias após o desafio, os animais foram eutanasiados e o fígado coletado, pesado e também utilizado para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. Nos gráficos A, B, C e D, as linhas representam a média mais desvio padrão da carga parasitária e as colunas representam a média mais desvio padrão do peso. O gráfico E representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de um único experimento.

7.3.4 Análise do peso e carga parasitária no baço

Na análise do peso do baço dos animais imunizados e posteriormente infectados observa-se um aumento nos grupos controles (Salina e pcDNA3) principalmente o grupo salina, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Nos animais imunizados observa-se uma estabilização do peso entre os dias 25 e 50 após a infecção. Aos 75 dias pós-infecção ocorre um pequeno aumento do baço nestes grupos (Fig 13. C e D).

Quando avaliamos a carga parasitária no baço observa-se que os grupos controles (Salina e pcDNA3) apresentam uma carga parasitária menor e de crescimento mais lento (Fig.13 A, B). Surpreendentemente, os grupos imunizados (pcDNA3LiP0 ou pcDNA3LiP0 + rLiP0 + CpG) apresentam um aumento progressivo da carga parasitária, destacando-se o grupo imunizado com a estratégia homóloga (Fig. 13 C, D). Esta diferença pode ser observada na área sob a curva apesar desta não ser estatisticamente significativa (Fig. 13 E).

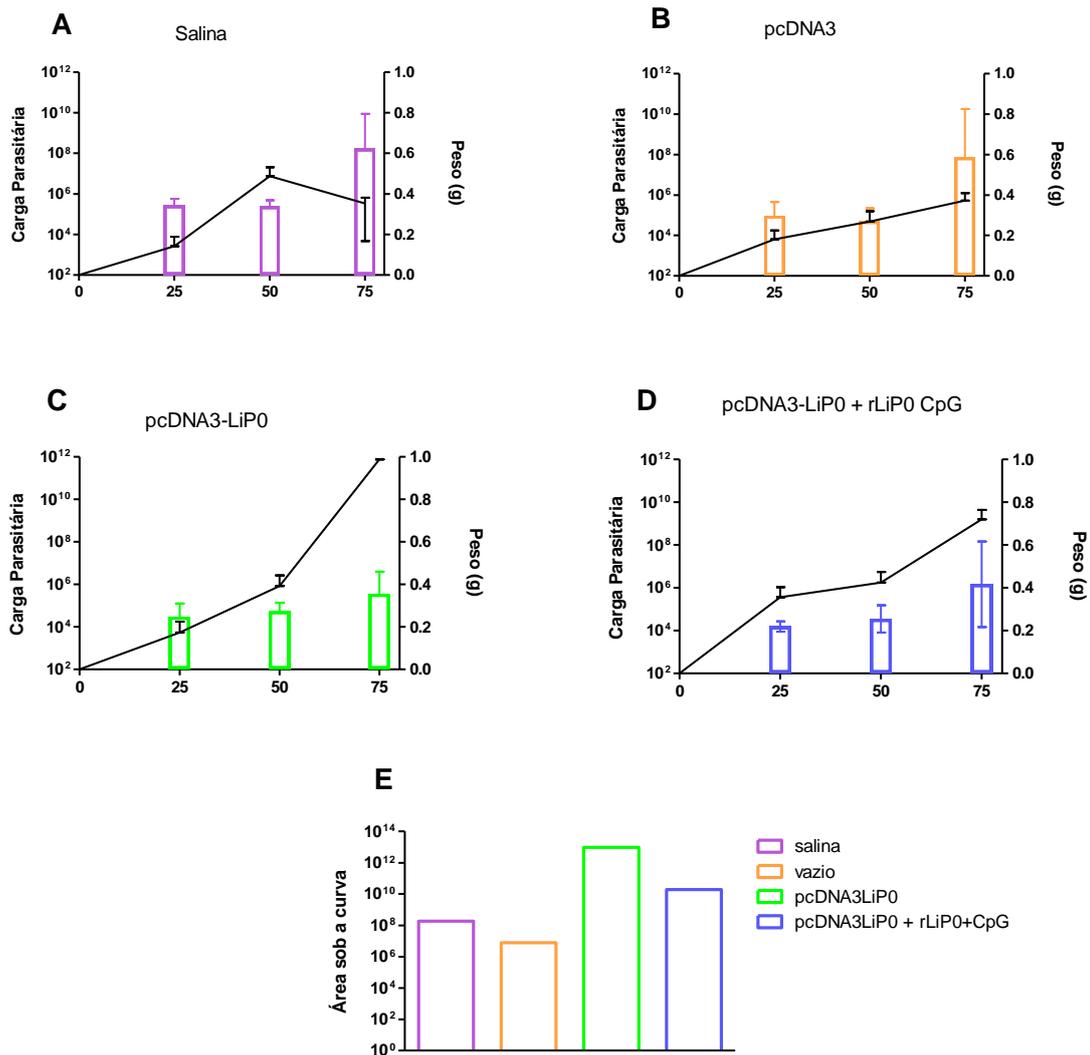


Figura 13. Carga parasitária no baço de hamsters imunizados com pcDNA3, pcDNA3-LiP0 e pcDNA3LiP0 + rLiP0 e CpG e posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Hamsters Golden Syrian (15 animais/grupo) foram imunizados três vezes com intervalo de quinze dias por via intramuscular (pcDNA3 e pcDNA3LiP0) e intradérmica (rLiP0 +CpG) com 100 µg de pcDNA3 ou pcDNA3-LiP0 e 10 µg de rLiP0 + 1nM CpG e infectados com 10^5 de *L. chagasi* pela via endovenosa, trinta dias após a terceira imunização. Nos tempos de 25, 50 e 75 dias após o desafio, os animais foram eutanasiados e o baço coletado, pesado e também utilizado para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. Nos gráficos A, B, C e D, as linhas representam a média mais desvio padrão da carga parasitária e as colunas representam a média mais desvio padrão do peso. O gráfico E representa a área sob a curva da carga parasitária. Os resultados foram obtidos de um único experimento.

8 DISCUSSÃO

A atual estratégia de controle da LV preconizada pela Organização Mundial de Saúde está baseada na detecção, eliminação de cães infectados, associado ao tratamento dos casos humanos e ao controle vetorial (TESH,1995). Como essas medidas de controle têm sido parcialmente efetivas, o desenvolvimento de vacinas tem sido considerado como prioritário pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

A utilização de vacinas no mundo foi proposta como medida prática em Saúde Pública para o controle de várias doenças em variadas situações epidemiológicas (MODABBER, 1990). A viabilidade de uma vacina contra a LV poderia causar um impacto no controle da doença, diminuindo a frequência da infecção humana (MODABBER, 1990; HOMMEL *et al.*, 1995).

Desta forma, tem existido um grande esforço da comunidade científica no sentido de se desenvolver e se testar estratégias que levem à obtenção de uma vacina eficaz contra a leishmaniose, exemplificadas pela imunização com proteínas recombinantes pertencentes ao parasita ou ao vetor (revisado em LAUNOIS *et al.*, 2008) adicionados a sistemas adjuvantes de apresentação (revisado em SINGH *et al.*, 2007).

A proteína ácida ribossomal é formada por uma família de inúmeras proteínas encontradas principalmente dentro das subunidades ribossomais 60S (TOWBIN *et al.*, 1982). Apesar de estudos sugerirem que as proteínas ácidas participam nas sínteses de outras proteínas (STACEY *et al.*, 1988), a LiPO é capaz de induzir a produção de anticorpos que não reagem cruzadamente com proteínas próprias ou de outros eucariotos (SHIMMIN *et al.*, 1989). Adicionalmente, já foi demonstrado que pacientes resistentes a malária, possuem elevadas concentrações de anticorpos contra fosfoproteína P0 de *Plasmodium falciparum*. Entretanto, não foi detectado anticorpos contra P0 em pacientes que desenvolveram a doença (CHATTERJEE *et al.*, 2000). Foi demonstrado também que camundongos resistentes à infecção por *Plasmodium yoelii*, possuíam anticorpos contra P0 ribossomal. (CHATTERJE *et al.*, 2000).

Apesar de nunca ter sido testado como vetor de expressão de proteínas na profilaxia da leishmaniose, o *rM.smegmatis* já foi testado com sucesso expressando

proteínas de outros microorganismos, se tornando um bom candidato para substituição do BCG na profilaxia da tuberculose. Como é rapidamente destruído pelas proteases dos fagossomos de células infectadas, os antígenos expressos são rapidamente absorvidos e apresentados (LÜ *et al.*, 2009), levando a produção de citocinas em macrófagos de forma mais eficiente que outras espécies micobacterianas (YADAV *et al.*, 2004). O *M. smegmatis* pode, ainda, ativar e induzir a maturação das células dendríticas e acessar a via MHC classe I para apresentação de antígenos micobacterianos (CHEADLE *et al.*, 2005).

Sendo assim, avaliamos a capacidade protetora do *rM.smegmatis* expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal de *L. infantum* (LiP0), bem como vacinas de DNA de LiP0, utilizando estratégia homóloga (composta de plasmídeo de DNA) e heteróloga (composta de plasmídeo de DNA mais proteína recombinante e CpG-ODN), contra a infecção por *L. chagasi* em hamsters.

Inicialmente, investigamos se o *rM.smegmatis* e a LiP0 apresentavam propriedades imunogênicas. Os animais imunizados com *rM.smegmatis* LiP0 apesar de apresentarem resposta imune humoral anti- *rM.smegmatis*, não produziram anticorpo contra a LiP0. No entanto, a ausência de produção de anticorpos anti-LiP0 nos animais imunizados não foi surpreendente, pois já foi demonstrado que as imunizações com DNA favorecem mais o desenvolvimento de uma resposta celular do que humoral (AGUILAR-BE *et al.*, 2005; revisado em LADDY & WEINER, 2006; revisado em LU *et al.*, 2008). De fato, IBORRA e colaboradores (2003) observaram a presença de anticorpos anti-LiP0 apenas em camundongos imunizados com estratégia heteróloga composta de DNA e proteína. Alguns trabalhos demonstraram a produção de anticorpos em hamsters e camundongos imunizados com plasmídeo de DNA que codifica a KMP-11 (BASU *et al.*, 2005; BHAUMIK *et al.*, 2009), no entanto, a detecção da resposta humoral foi realizada algumas semanas após o desafio, o que pode ter levado a participação do antígeno parasitário na indução de resposta humoral (JARDIM *et al.*, 1995). Mais recentemente, MAZUMDER e colaboradores (2011) detectaram em soros de camundongos imunizados com gp63, utilizando a estratégia heteróloga composta de DNA e proteína recombinante mais adjuvante, um aumento significativo de IgG2a comparado aos animais que receberam a estratégia homóloga composta de apenas DNA ou proteína. O mesmo resultado também foi observado em nosso estudo quando apenas os animais imunizados com a estratégia heteróloga,

apresentaram maior produção de IgG anti-LiP0 quando comparados aos seus respectivos controles.

Com relação às citocinas, sabe-se que na leishmaniose experimental murina duas respostas bem distintas determinam o curso da infecção. Uma resposta mediada por células Th1 que levam à destruição do parasita (MURRAY, 1981; MURRAY *et al.*, 1983; CHANNON *et al.*, 1984; PASSWELL *et al.*, 1994; LIEW *et al.*, 1990) e outra resposta induzida por células Th2, as quais estimulam respostas humorais e que, juntamente com a citocina regulatória IL-10, inibem respostas celulares do tipo Th1 promovendo dessa forma a sobrevivência do parasita e o progresso da doença (REED & SCOTT, 1993; REINER *et al.*, 1993; BOGDAN *et al.*, 2000; SACKS *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado a habilidade da micobactéria como componente vacinal em estimular a secreção de IL-12 e IFN- γ , aumentando assim o desenvolvimento de uma resposta especificamente Th1 (FLESCH *et al.*, 1995, LAGRANDERIE *et al.*, 1996). STOVER e colaboradores (1991) demonstraram que o BCG recombinante expressando proteínas heterólogas induzia a produção de anticorpos IgG e proliferação de linfócitos T com produção de linfocinas. Em outro estudo, desta vez utilizando o *rM.smegmatis* (pPL73-Omp26) como imunoterápico, houve redução significativa no número de bactérias *Helicobacter pilory* no estômago de camundongos infectados, sendo a proteção associada a uma resposta Th1 e Th2 (LU *et al.*, 2009).

Da mesma forma, FUMAGALLI e colaboradores (2010) demonstraram a proteção de camundongos imunizados com a proteína ribossomal de *Leishmania* (LRP) e saponina contra um desafio posterior composto por *L. chagasi* ou *L. amazonensis*. Neste trabalho, camundongos vacinados apresentaram produção de IFN- γ e IL-12 associado a presença de anticorpos IgG2a anti-LRP além de baixos níveis de IL-4 e IL-10. Adicionalmente IBORRA e colaboradores (2005) mostraram que a imunização com vacinas de DNA com o gene da LiP0 induzem uma resposta do tipo Th1 consistindo na produção de IFN- γ antígeno específica sem indução de anticorpos. Por outro lado, a imunização com LiP0-DNA seguido por um reforço com rLiP0 induziu uma resposta mista Th1-Th2, com níveis semelhantes de IgG1 e IgG2a anti-LiP0. Finalmente, a imunização somente com proteína recombinante induziu uma resposta exclusivamente Th2, com produção de IgG1 anti-LiP0 (IBORRA *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, os animais imunizados com *rM.smegmatis* LiP0, apresentaram maior concentração, embora não significativa, de IFN- γ e menor quantidade de TGF- β e IL-10 em relação aos grupos controle, sem no entanto, apresentarem produção de anticorpos anti-LiP0, caracterizando uma resposta do tipo Th1. Estes resultados poderiam induzir proteção em hamsters infectados por *L. chagasi*.

Muitos estudos mostram que a patogenia envolvendo *Leishmania* está diretamente relacionada à virulência da cepa, a espécie de parasita utilizada, a natureza do inóculo e a rota de inoculação do patógeno. A influência da via do inóculo no desencadeamento da doença é uma consideração importante. As vias intradérmica, subcutânea, endovenosa, intraperitoneal e a intracardíaca são freqüentemente utilizadas como vias de inoculações para desafios com *Leishmania* (BELKAID *et al.*, 1998; AFRIN *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 2004). AFRIN e colaboradores (1997) avaliaram a imunidade protetora induzida pela imunização com lipossomos positivamente carregados com antígenos de *L. donovani* e infectaram camundongos e hamsters com *L. donovani* pelas vias endovenosa e intracardíaca, respectivamente. Os hamsters apresentaram 97% de redução da carga parasitária no baço e os camundongos 87% e 81,3% de proteção em baço e fígado, respectivamente. Posteriormente, BOWMIC e colaboradores (2008) avaliaram a proteção conferida pelo gp63 encapsulado em lipossomos em camundongos imunizados, infectando-os com $2,5 \times 10^7$ promastigotas de *L. donovani* por via endovenosa. Os animais imunizados apresentaram acentuada resistência e controlaram a infecção por 3 meses. Mais recentemente, MAZUMBER e colaboradores (2011) também avaliaram a proteção do gp63 utilizando diferentes estratégias de imunização em camundongos BALB/C posteriormente infectados por via endovenosa. Neste estudo, foram detectados parasitas no baço e fígado 3 meses após a infecção. Em nosso estudo, quando analisamos as vias de infecção, foi possível detectar parasitos em linfonodo e baço 30 dias após o desafio pelas vias intradérmica, intraperitoneal e endovenosa. Outros estudos com espécies diferentes de animais, como cães e macacos também foram desafiados por esta via, detectando-se parasitas principalmente no fígado e baço (FERNANDES *et al.*, 2008, DENNIS *et al.*, 1986). Sendo assim, baseado em nossas observações e nos estudos de literatura, verificamos que a infecção com *L. chagasi* pela via endovenosa é viável, pois é capaz de mimetizar o processo infeccioso provocado pela leishmaniose visceral, tornando-se, sobretudo,

uma alternativa de infecção para realização de experimentos de avaliação de candidatos vacinais contra a leishmaniose visceral.

Sabe-se que a presença de seqüências de CpG nos plasmídeos de DNA pode facilitar o desenvolvimento de respostas imunes com a produção de citocinas pró-inflamatórias (MUTWIRI *et al.*, 2004; ZIMMERMANN *et al.*, 2008). MAZUMDER e colaboradores (2011) demonstraram recentemente a capacidade do adjuvante CpG-ODN em elicitar uma resposta tanto celular como humoral de longa duração quando adicionados a vacina de DNA ou a uma estratégia *prime-boost* composta de DNA e proteína. De fato, uma vez que seqüências de DNA podem ser reconhecidas por receptores Toll, elas possuem um papel importante na ativação de células da imunidade inata (BABIUK *et al.*, 2004). Além disso, podem ativar a apresentação de células apresentadoras de antígenos estimulando assim a produção de IL-12, uma citocina fundamental na ligação da imunidade inata com a adaptativa (BASTOS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005). A IL-12 pode estimular a produção de IFN- γ por células NK. Esse mecanismo mostrou ser de grande importância para a geração de respostas protetoras contra parasitas intracelulares (VIVIER *et al.*, 2005). O aumento da capacidade de indução de citocinas Th1, óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio também foram obtidas em um estudo de SANE e colaboradores (2010) que avaliaram a combinação de miltefosina e CpG-ODN em diferentes doses, no tratamento contra leishmaniose visceral experimental. Neste estudo, hamsters e camundongos infectados com *L. chagasi* e posteriormente tratados com miltefosina e CpG ODN (1nM) em combinação apresentaram atividade leishmanicida promissora em relação ao seu uso isolado, demonstrando a capacidade imunomoduladora do CpG.

No entanto, em nosso estudo, nenhuma das estratégias de imunização utilizadas foram capazes de evitar a progressão da doença. Nossos resultados diferem, contudo, dos encontrados por IBORRA e colaboradores (2003) onde a proteção foi obtida quando a LiP0 foi aplicada na formulação de DNA. Entretanto, a imunização composta de pcDNA3 LiP0 e rLiP0 não resultou em proteção após desafio com *L. major* por via intradérmica. Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou que a LiP0 tanto na forma de vacina de DNA como na de proteína recombinante mais CpG ODN conferiu proteção substancial contra lesão dérmica decorrente da infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6. No entanto, é importante considerar que estes ensaios foram realizados em modelos murinos, desafiados com *L. major* por via intradérmica, e é

possível que esta discrepância seja fruto de diferenças biológicas entre as espécies de parasitas *L. major* e *L. chagasi*, que podem ter contribuído para diferenças na infectividade e no padrão de progressão da doença (SMITH *et al.*, 2007). Dessa forma, também é provável que o desafio utilizando a via endovenosa induza uma infecção tão agressiva que torna-se difícil concluir se a ausência de proteção está relacionada com a LiPO, seja associada ao micobacterium ou nas estratégias homóloga ou heteróloga, ou com o tipo de infecção realizada.

GOMES e colaboradores (2008) desenvolveram um modelo de LV em hamsters, injetando *L. chagasi* (10^5) juntamente com a saliva do vetor, *Lutzomyia longipalpis* por via intradérmica. Os animais apresentaram aumento da carga parasitária no baço e fígado no decorrer da infecção e muitos dos sintomas observados em pacientes com leishmaniose visceral, como anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia. Utilizando este mesmo modelo, foi observado que a imunização de hamsters com o plasmídeo de DNA LJM19, responsável pela codificação da proteína salivar de *L. longipalpis*, conferiu proteção contra um desafio posterior constituído de parasita mais saliva. Este plasmídeo induziu uma forte reação de hipersensibilidade tardia, sugerindo que o mecanismo de proteção está relacionado ao desenvolvimento de uma resposta imune celular. Assim, animais imunizados com o plasmídeo LJM19, posteriormente desafiados com picada de flebótomos não infectados desenvolveram reação de DTH e por meio de PCR em tempo real, observou-se uma produção de IFN- γ e IL-10 no sítio da picada. Estes dados sugerem que a proteção contra o desafio constituído de parasitas mais saliva induz uma produção de citocinas que destroem o parasita (IFN- γ), ao mesmo tempo em que impedem uma reação inflamatória exacerbada local (IL-10). Assim, com uma carga parasitária bastante reduzida, os animais controlam a infecção, não desenvolvendo a doença.

Com base nos resultados obtidos, se faz necessário avaliar se a LiPO, utilizando tanto a estratégia homóloga como a heteróloga ou mesmo associada ao *M. smegmatis*, é capaz de proteger hamsters infectados com *L. chagasi*, desta vez por via intradérmica mais saliva, visto que esta estratégia mimetiza a infecção natural, aproximando-se mais da patogênese real causada pela infecção por *L. chagasi*, além de proporcionar a possibilidade de se repetir os experimentos realizados em outros estudos, que obtiveram sucesso anteriormente, modificando apenas o modelo experimental e o parasita.

9 CONCLUSÃO

As imunizações com *rM.smegmatis* expressando o gene da proteína ácida ribossomal de *L. infantum* (LiP0), bem como a LiP0 tanto na estratégia homóloga, composta de DNA, quanto na heteróloga, composta de DNA e proteína mais CpG, não foram capazes de prevenir o desenvolvimento da doença em hamsters infectados com *L. chagasi* por via endovenosa.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAK, S.; LOUZIR, H.; TIMM, J.; BLEL, L.; BENLASFAR, Z.; LAGRANDERIE, M.; GHEORGHIU, M.; DELLAGI, K.; GICQUEL, B. Recombinant BCG expressing the *Leishmania* surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALBk mice. *Microbiology*, v.141, p.1585-1592, 1995.

AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *Journal parasitol*, v. 86, n. 4, p. 730-735, 2000.

AGUILAR-BE, I.; DA SILVA ZARDO, R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G. P.; ROSADO-VALLADO, M.; MUT-MARTIN, M.; GARCIA-MISS MDEL, R.; PALATNIK DE SOUSA, C. B.; DUMONTEIL, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine *Leishmaniasis*. *Infect Immun*, v. 73, n. 2, p. 812-819. 2005.

AHUJA, S.S.; REDDICK, R.L., SATO, N.; MONTALBO, E.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; DOLAN, M.J.; MELBY, P.C.; AHUJA, S.K. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol*. 1;163(7):3890-7. 1999

ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R. RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, v.112 Pt 18, Sep, p.2993-3002. 1999.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*. V.14, no.5, p. 523-532, 1996.

AZEVEDO, V., LEVITUS, G., MIYOSHI, A., CANDIDO, A.L., GOES, A.M., OLIVEIRA, S.C. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.2, Feb, p. 147-53. 1999.

BABUIK, S.; MOOKHERJEE, N.; PONTAROLLO, R.; GRIEBEL, P.; VANDRUNEM LITTEL-VAN DEN HURK, S.; HECKER, R.; BABIUK, L. TLR9^{-/-} and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology*. n.113, p.114-20, 2004.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A. JR.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*. v. 12(8): p.1228-31,2000.

BARBOSA, J.; ANDRADE, Z.A; REED, S.G. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Braz J Med Biol Res*.v.20, p. 63-72, 1987.

BASTOS, K.; MARINHO C.R.; BARBOZA R.; RUSSO M.; ALVAREZ J.M.; D'IMPERIO-LIMA M.R. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect.* n. 6, p. 630-36, 2004.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J. M.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* v. 174, n. 11, p. 7160-7171. 2005.

BELKAID, B. Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; TRAUTH, N. N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 88, n. 10, p.1941-1953, 1998.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. 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 Immunology*, v.165, n. 2, p.969-977, 2000.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.*, v.194, n.10, Nov, p. 1497-506. 2001.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V.NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol*, v.143, n.1, Jul 1, p.266-74. 1989.

BITTENCOURT, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. *Tropical Pathology*, v. 8, n. 6, p. 597-644. 1995.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Reviews Immunology*, v. 173, p.17-26, 2000.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.*, v.174, n.6, Dec, p. 1549-55, 1991.

BRANDT, E.; WOERLY, G.; YOUNES, A.B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 68(1):125-30, 2000.

CHANNON, J.Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J.M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, v.53, n.2, Oct, p.345-55, 1984.

CHATTERJEE, S.; SINGH, S.; SOHONI, R.; KATTIGE, V.; DESHPANDE, C.; CHIPLUNKAR, S.; KUMAR, N.; SHARMA, S. Characterization of domains of the phosphoriboprotein P0 of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107:143–154, 2000

CHATTERJEE, S., SINGH, S.; SOHONI, R.; SINGH, N. J.; VAIDYA, A.C.; LONG, A.; SHARMA, S. Antibodies against ribosomal phosphoprotein P0 of *Plasmodium falciparum* protect mice against challenge with *Plasmodium yoelii*. *Infect.Immun.* 68:4312–4318, 2000.

CHEADLE, J.C.; DONNELL, O.D.; SELBY, P.J.; JACKSON, A.M. Closely related mycobacterial strains demonstrate contrasting levels of efficacy as antitumor vaccines and are processed for major histocompatibility complex class I presentation by multiple routes in dendritic cells. *Infection and Immunity*, p.784-794, 2005.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 78, n. 1, p. 25-34. 1984.

COLER, R. N.; SKEIKY, Y. A.; BERNARDS, K.; GREESON, K.; CARTER, D.; CORNELLISON, C. D.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S. G. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun*, v. 70, n. 8, p. 4215-4225. 2002.

COLER, R.N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S.G. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun.* v.75, p.4648-54, 2007.

COLLIN, S. M.; COLEMAN, P. G.; RITMEIJER, K. & DAVIDSON, R. N. Unseen Kala-azar deaths in south Sudan (1999–2002). *Trop. Med. Int. Health* v.11,p.509–512,2006.

CONNELL, N.D. Effective immunization against cutaneous Leishmaniasis with recombinant bacilli Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p.11473-11477, 1993

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*, v.72, n.2, Apr, p.132-41. 2002.

DENNIS, V.A.; LUJAN, R.; CHAPMAN, W.L.R.; HANSON, W.L. *Leishmania donovani*: cellular and humoral immune responses after primary and challenge infections in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. *Expert Parasitol*, v. 6, n. 3, p.319-334, 1986.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 27, 305–18.

DUMONTEIL, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol*, v. 2007, n. 6, p. 90520. 2007.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A.; MICHALICK, M.S.; DE FREITAS, E; MELO, M.N.; TAFURI, W.; RESENDE, D.D.E .M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.E.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v.46, n.26, p.5888-5895, 2008.

FLESCH, I.E.; KAUFMANN, S.H. Differential induction of IL12 synthesis by Mycobacterium bovis BCG and Listeria monocytogenes. *Res Immunol*. v.146, p.520-6, 1995.

FUNASA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. 6 ed. Brasília, 2002.

FUNASA, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian Journal Medicine*,v.123, p. 439-454, 2006.

GENARO, O.; SILVA, A. L. F.; MICHALICK, M.S.M.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; DIAS, M. Leishmaniose Tegumentar Americana. IN: NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p .36-53.

GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, v.20, p. 59-66, 2001.

GONZALO, R. M.; DEL REAL, G.; RODRIGUEZ, J. R.; RODRIGUEZ, D.; HELJASVAARA, R.; LUCAS, P.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous *Leishmaniasis*. *Vaccine*, v.20, n.7, p. 1226-31. 2002

GRADONI, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; PIANTEDOSI, D.; DE LUNA, R.; GRAMICCIA, M.; SCALONE, A.; DI MUCCIO, T.; OLIVA, G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*. v.23, p.5245-51,2005.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol*, v.34, n.4, Mar 29, p.433-44. 2004.

GURUNATHAN, S.; SACKS, D. L.; BROWN, D. R.; REINER, S. L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R. A. Vaccination with DNA encoding the

immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*, v. 186, n. 7, p. 1137-1147. 1997.

GURUNATHAN, S.; STOBIE, L.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; IWASAKI, A.; FOWELL, D. J.; LOCKSLEY, R. M.; CHANG, J. T.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol*, v. 165, n. 2, p. 915-924. 2000.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, v.14, n. 2, p. 229-243. 2001.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, v.169, n.1, Jan 1, p.59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; AHMED, F.; PEARLMAN, E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol*, v.155, n.2, Jul 15, p.730-9. 1995.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 2 p. 1191-9, 1999.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B. & MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccine. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86(S1):55-73, 1995.

IBORRA, S.; SOTO, M.; CARRION, J.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 22, n. 29-30, p. 3865-3876. 2004.

IBORRA, S.; CARRION, J.; ANDERSON, C.; ALONSO, C.; SACKS, D.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun*, v. 73, n. 9, p. 5842- 5852. 2005.

IBORRA, S.; ABANADES, D. R.; PARODY, N.; CARRION, J.; RISUENO, R. M.; PINEDA, M. A.; BONAY, P.; ALONSO, C.; SOTO, M. The immunodominant T helper 2 (Th2) response elicited in BALB/c mice by the *Leishmania* LiP2a and LiP2b acidic ribosomal proteins cannot be reverted by strong Th1 inducers. *Clin Exp Immunol*, v. 150, n. 2, p. 375-385. 2007.

IBORRA, S.; PARODY, N.; ABÁNADES, D.R.; BONAY, P.; PRATES, D.; NOVAIS, F.O.; BARRAL-NETTO M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces

protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect.* v.10, p. 1133-41, 2008.

KHAMESIPOUR, A.; RAFATI, S.; DAVOUDI, N.; MABOUDI, F.; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J. Med. Res.*, v.123, n.3, Mar, p.423-38. 2006.

LADDY, D. J.; WEINER, D. B. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. *Int Rev Immunol*, v. 25, n. 3-4, p. 99-123. 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F. T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.81, n.4, p.702-3. 1987.

LAGRANDERIE, M.R.; BALAZUC, A.M.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.D.; GHEORGHIU, M. Comparison of immune responses of mice immunized with five different Mycobacterium bovis BCG vaccine strains. *Infect Immun.* v.64, p.1-9,1996.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; KIENY, M. P. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Rev Vaccines*, v. 7, n. 8, p. 1277-1287. 2008.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol*, v.145, n.12, Dec 15, p.4306-10, 1990.

LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p.615-623, 2004.

LU, S.; WANG, S.; GRIMES-SERRANO, J. M. Current progress of DNA vaccine studies in humans. *Expert Rev Vaccines*, v. 7, n. 2, p. 175-191. 2008.

MAROVICH, M. A.; MCDOWELL, M. A.; THOMAS, E. K.; NUTMAN, T. B. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol*, v.164, n.11, Jun 1, p.5858-65. 2000.

MARZOCHI, M.C.A. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80:349-357, 1985.

MATHIAS, R.; COSTA, F.A.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz j Med Biol Res.* v. 34, p. 539-43, 2001.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today.* v. 16, p. 188-189, 2000.

MCMAHON-PRATT, D.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ZHANG, Y.; MANSON, K.; BERGMAN, C.; RIVAS, L.; RODRIGUEZ, J.F.; LOHMAN, K.L.; RUDDLE, N.H. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun.* v. 61, p. 3351-9, 1993.

MELBY, P. C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L. E.; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v. 69, n. 8, p. 4719-4725. 2001.

MILON, G.; DEL GIUDICE, G.; LOUIS, J.A. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today*, v.11, n.7, Jul, p. 244-7. 1993.

MODABBER F. Development of vaccines against leishmaniasis. *Scand J Infect Dis* 1990; 76: 72-78.

MOLANO, I.; GARCIA ALONSO, M.; MIRON, C.; REDONDO, E.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; GOMEZ NIETO, C. & ALONSO, C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L.infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92:1-13, 2003.

MONJOUR, L; OGUNKOLADE, B.W.; POINTET, P. ; VOULDOUKIS, I. Efficacité de la vaccination de la souris C57BI/6 contre l'infection par différences espèces de *Leishmania*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 301:803-806, 1985.

MORENO, J.; NIETO, J.; MASINA, S.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; CARRILLO, E.; NAPP, S.; REYMOND, C.; KAYE, P.M.; SMITH, D.F.; FASEL, N.; ALVAR, J. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*. v.29, p. 5290-300, 2007.

MURRAY, H. W. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *J Exp Med*, v. 153, n. 6, p. 1690-1695. 1981.

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest*, v. 72, n. 1, p. 32-44. 1983.

NEVES D.P. *Parasitologia Humana*, 11^a edição, Livraria Atheneu Editora, 28-72, 2005.

NOBEN-TRAUTH, N.; HU-LI, J.; PAUL, W. E. Conventional, naive CD4⁺ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol*, v.165, n.7, Oct 1, p.3620-5. 2000.

OHARA N, YAMADA T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*. v.30, p. 4089-98, 2001.

OLIVEIRA, M.A.; TADAKORO, C.E.; LIMA, G.M.; MOSCA, T.; VIEIRA, L.Q.; LEENEN, P.J.; ABRAHAMSOHN, I.A. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. *Microbes Infect*. v. 7, p. 213-23, 2005.

OLIVEIRA, SC.; ROSINHA, G.M.; DE-BRITO, C.F.; FONSECA, C.T.; AFONSO, R.R.; COSTA, M.C.; GOES, A.M.; RECH, E.L.; AZEVEDO, V. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.2, Feb, p. 207-14. 1999.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for Leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, v. 26, n. 14, p. 1709-1724. 2008.

PASSWELL, J.H.; SHOR, R.; SMOLEN, J.; JAFFE, C.L. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.75, n.4, Aug, p.277-84. 1994.

PEARSON R.D.; ROBERTS, D. Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. *Am Journal Tropical Medicine*, v.4, n. 3, p.263-265, 1990.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 1996.

PEREZ, L. E.; CHANDRASEKAR, B.; SALDARRIAGA, O. A.; ZHAO, W.; ARTEAGA, L. T.; TRAVI. B. T.; MELBY, P.C. Reduced Nitric Oxide Synthase 2(NOS2) Promoter Activity in the Syrian Hamster Renders the Animal Functionally Deficient in NOS2 Activity and Unable to Control an Intracellular Pathogen. *The Journal of immunology*, v.176, p.5519-5528, 2006.

PIMENTA, P.F.; MODI, G.B.; PEREIRA, S.T.; SHAHABUDDIN, M, SACKS DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 1997; 115: 359-69.

RAMIREZ, J. R.; GILCHRIST, K.; ROBLEDO, S.; SEPULVEDA, J. C.; MOLL, H.; SOLDATI, D.; BERBERICH, C. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine*, v. 20, n. 3-4, p. 455-461. 2002.

RAMIRO; M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*. v.21,p.2474-84,2003.

REED, S.G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.*, v.5, n.4, p. 524-31, 1993.

RAMÍREZ, L.; IBORRA, S.; CORTÉS, J.; BONAY, P.; ALONSO, C.; BARRAL-NETTO, M.; SOTO, M. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite. *J Biomed Biotechnol*. v.2010, p.1-9, 2010.

RAMOS, I; ALONSO, A.; MARCEN, J. M.; PERIS, A.; CASTILLO, J. A.; COLMENARES, M.; LARRAGA, V. Heterologous prime-boost vaccination with a

non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, v. 26, n. 3, p. 333-344. 2008.

RAMSHAW, I.A.; RAMSAY, A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today*. v. 21, p. 163- 165, 2000.

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. *J. Cell. Biochem.*, v.53, n.4, Dec, p.323-8, 1993.

REINER, S.L.; SEDER, R.A.T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol.* ;7(3):360-6,1995.

REY, L. Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais, 4ª edição, Editora Guanabara Koogan, 2008.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILESPIE D.; BRODSKYN, C.I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett*. v.209, p. 1-7, 2002.

SACKS, D; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance of *L.major* in mice. *Nat Rev Immunol*. v. 11. p. 845-58, 2002.

SANE, S.A.; SHAKYA, N.; HAQ, H.; GUPTA, S. CpG oligodeoxynucleotide augments the antileishmanial activity of miltefosine against experimental visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. v.65, p.1448-54, 2010.

SANTOS, W.R.; DE LIMA, V.M.; DE SOUZA, E.P.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.21, n.1-2, Nov, p. 30-43. 2002.

SARTORI, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar II: Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Clinical & Experimental Immunology*, v.87, p.386-392, 1991.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, v.147, n.9, Nov 1, p.3149-55. 1991.

SCOTT, P. Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with *Leishmania major*. *Immunol Res*, v.17, n.1-2, p.229-38. 1998.

SHARMA, P.; SINGH, N.; GARG, R.; HAQ, W.; DUBE, A. Efficacy of human beta-casein fragment (54-59) and its synthetic analogue compound 89/215 against *Leishmania donovani* in hamsters. *Peptides*, v. 25, n. 11, p.1873-1881, 2004.

SHIMMIN, L. C.; RAMIREZ, C.; MATHESON, A.T.; DENNIS, P. P. Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent

ribosomal proteins from archaeobacteria, eubacteria, and eucaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, v. 29, n. 5, p. 448-462, 1989.

SINGH, S. P.; REDDY, D. C.; RAI, M.; SUNDAR, S. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. *Trop. Med. Int.Health*. v.11, p. 899–905, 2006.

SKEIKY, Y.A.W.; COLER, R.N.; BRANNON, M.; STROMBERG, E.; GREESON, K.; CRANE, T.; CAMPOS NETO, A.; REED, S. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL[®] adjuvant. *Vaccine*, 20:3292-3303, 2002.

STACEY, D. W.; SKELLY, S.; WATSON, T.; ELKON, K.; WEISSBACH, H.; BROT, N. Systemic lupus erythematosus antiribosome P autoantibodies inhibit protein synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 267, p. 398-403, 1988.

STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*. v.165, p. 7064-71, 2000.

STOVER, C. K.; DE LA CRUZ, V. F. ; FUERST, T. R. ; BURLEIN, J. E.; BENSON, L. A. ; BENNETT, L. T. ; BANSAL, G. P. ; YOUNG, J. F. ; LEE, M. H. ; HATFULL, G. F. ; SNAPPER, S. B. ; BARLETTA, R. G. ; JACOBS JR, W. R. ; BLOOM, B. R. . New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*. V. 351, p.456-60, 1991.

STREIT, J.A.; RECKER, T.J.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. BCG Expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* Induces Protective Immunity in Susceptible Mice. *Experimental Parasitology*, v.94, p. 33–41, 2000.

SUTTERWALA, F. S.; MOSSER, D. M. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*, v.65, n.5, May, p.543-51. 1999.

SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*, v.9, n.7, Jul, p.255-8. 1993.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: its time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 52(3):287-292, 1995.

TOWBIN, H.; RAMJOUE, H. P.; LIVERANI, D.; GORDON, J. Monoclonal antibodies against eukaryotic ribosomes: use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *Journal of Biological Biochemistry*, v. 257, p. 12709-12715, 1982.

UCHIMI, T.; TRAUT, R.; KOMINAMI, R. Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1 and P2 eukaryotic ribosomes as functional probes. *Journal of Biological Biochemistry*, v. 265, p. 89-95, 1990.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996,1803p.

VIVIER, E.; MALISSEN B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol.*v.7, p.17-21, 2005

VON DER WEID, T.; BEEBE, A.M.; ROOPENIAN, D.C.; COFFMAN, R.L. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J Immunol.* 15;157(10):4421-7, 1996.

WHO, The World Health Report, Geneva. 2002. p. 192–7.

XU, D.; LIEW, F. Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, v. 84, n. 2, p. 173-176. 1995.

YADAV M, S. R.; JEFFREY, S. Increased Mitogen-Activated Protein Kinase Activity and TNF- α Production Associated with *Mycobacterium smegmatis*- but Not *Mycobacterium avium*-Infected Macrophages Requires Prolonged Stimulation of the calmodulin/Calmodulin Kinase and Cyclic AMP/Protein Kinase A Pathways, *Journal Immunology*, v.172, p.5588-5597, 2004.

ZHANG, H.; PENG, P.; MIAO, S.; ZHAO, Y.; MAO, F.; WANG, L.; BAI, Y.; XU, Z.; WEI, S.; SHI, C. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. *Scand J Immunol.* v.4, p.349-57, 2010.