



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi***

**CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO**

**Salvador – Brasil  
2011**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi***

**CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO**

**ORIENTADOR: DR. GERALDO GILENO DE SÁ OLIVEIRA**

Tese apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a  
obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Brasil  
2011**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi***

**Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro**

**Folha de Aprovação**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

### *Dedicatória*

*A minha família, que me mostra o caminho do amor e da felicidade todos os dias:*

*- Meus pais, Emílio e Elma, aos quais devo minha vida e atribuo todos os meus valores*

*- Minhas irmãs de sangue, Hashimi e Andréa, e minha irmã do coração, Paula, minhas eternas amigas*

*- Meu sogro Eliel e minha sogra Dalva, aos quais tenho muito carinho e amor*

*- Meus afilhados, Lucas, Francisco e Gabriel, filhos do coração*

*- Minha querida tia Glória, que sempre cuidou de mim como uma filha e com sua graça traz muita paz para o meu lar*

*- Minha querida e eterna avó Zizi, pelos inesquecíveis momentos que vivemos juntos. Vovô Eliel e Vovó Elza, exemplos de união e amor.*

*- Meu grande amor, Marcelo, companheiro há 15 anos, que sempre me apoiou e sempre acreditou em mim como mulher, mãe e profissional*

*- Minha princesinha Tainá, meu maior tesouro e presente de Deus, que me mostra que a vida é cada dia mais especial ao seu lado. O seu lindo sorriso me faz sentir a mãe mais feliz do mundo.*

## AGRADECIMENTOS

**AOS QUE CONTRIBUÍRAM PARA REALIZAÇÃO DESSE TRABALHO:**

**AO CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**, pela estrutura para realização dessa tese;

**AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA E AO CNPq** pela oportunidade de crescimento profissional e concessão da bolsa;

**AO MEU ORIENTADOR E AMIGO GERALDO**, pela confiança depositada em mim, pela paciência, compreensão nos momentos difíceis e pelos ensinamentos dados ao longo dos 7 anos de trabalho juntos;

**AOS PESQUISADORES DR. LAIN E DR. WASHINGTON**, sempre dispostos a ajudar e dar sugestões enriquecedoras ao trabalho;

**À NAIARA**, além de ter me ajudado bastante em todos os experimentos, agradeço pela amizade que me confortou nos momentos difíceis e pelas nossas conversas e momentos de alegria compartilhados;

**À LAIZ**, pela amizade e enorme contribuição ao trabalho, pela sua dedicação e zelo em realizar os experimentos.

**AOS COLABORADORES FABÍOLA HOLETZ, RAFAEL DHÁLIA E OSVALDO POMPÍLIO**, pela contribuição ao trabalho;

**AO PESQUISADOR ERNESTO MARQUES**, pelo plasmídeo cedido contendo sequência de LAMP;

**AOS AMIGOS BIANCA, FABIENNE E TIAGO**, pelos agradáveis momentos vividos como um grupo de trabalho;

**À LIVINHA**, mãe do laboratório, sempre disposta a ajudar em todos os momentos e por fazer tudo com muito capricho;

**AO TÉCNICO DO LABORATÓRIO SÉRGIO**, pela esterilização de todo material necessário para realização dos experimentos;

**AOS AMIGOS DO LPBI**, todos que tive o prazer em conviver, minha gratidão pelo excelente ambiente de trabalho e pelos momentos de descontração.

**À ADMINISTRADORA DO LABORATÓRIO FLÁVIA**, mesmo com inúmeras atribuições, sempre esteve pronta para ajudar nas compras de reagentes e equipamentos necessários para realização desse trabalho;

**NANASHARA, MATHEUS E JOSÉ FERNANDO (LETI)**, pela ajuda com leitura das placas de linfoproliferação;

**A MINHA FAMÍLIA**, pelo incentivo e apoio fundamentais para realização da pós-graduação;

**AO MEU GUIA, DEUS**, pela maravilhosa vida que me deu.

PINHEIRO, Cristiane Garboggini Melo de. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*. Tese – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária causada por *Leishmania chagasi*. Os cães são considerados como principais reservatórios do parasito. Uma vacina efetiva para o cão pode contribuir para o controle da LV tanto no homem como no cão. Em um estudo prévio, antígenos recombinantes, obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *Leishmania chagasi*, foram selecionados a fim de serem avaliados como candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. No presente trabalho, a resposta imune humoral e celular de camundongos foi avaliada após injeção de alguns desses antígenos recombinantes, em cinco diferentes protocolos de imunização. Grupos de camundongos BALB/c foram injetados com as proteínas rLci4A-NH6 ou rLci2B-NH6, isoladamente ou associadas aos adjuvantes saponina, ODN 1826 ou diferentes doses de um plasmídeo codificando IL-12 murina. Além disso, animais foram sensibilizados com plasmídeo codificando Lci2B e receberam reforço com a proteína rLci2B-NH6 associada à saponina. Por último, os animais foram injetados com plasmídeos codificando novos antígenos, Lci2-NT-5R-CT ou Lci2-NT-CT, e recebem reforço com as respectivas proteínas recombinantes rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6 associadas à saponina. Nesse último protocolo, os plasmídeos utilizados continham o gene para uma proteína transmembrana associada a lisossomos, LAMP, visando à produção *in vivo* de quimeras de dos antígenos de *Leishmania* com LAMP, a fim de direcionar a apresentação dos peptídeos para linfócitos T CD4+ via moléculas de MHC-II. Em um dos protocolos, os animais foram desafiados com  $1 \times 10^7$  *Leishmanias* para avaliação da carga parasitária no baço após imunização. Os resultados encontrados mostraram que animais que receberam rLci4A-NH6, isoladamente ou com diferentes doses de plasmídeo codificando IL-12, apresentaram níveis significantes de IgG e IgG1, ao passo que o uso do antígeno com os adjuvantes saponina ou ODN 1826 induziu a produção de IgG, IgG2a e IgG1, além de produção de IL-5 pelo grupo que recebeu saponina. Animais que receberam rLci2B-NH6, isoladamente ou associado aos plasmídeos contendo inserto de IL-12, produziram IgG e IgG1 antígeno específicos e falharam também na produção de citocinas e proliferação celular. A utilização de saponina com esse antígeno induziu produção de IgG, IgG2a e IgG1, assim como de IFN- $\gamma$ . Já o uso de ODN 1826, induziu a produção de IgG e IgG1, favoreceu a produção de IgG2a, mas falhou na indução de resposta imune celular significativa. Por outro lado, animais que receberam plasmídeo codificando Lci2B e reforço com a proteína associada à saponina apresentaram uma resposta imune com predominância de anticorpos IgG2a e produção de IFN- $\gamma$  □por alguns animais, a qual não conferiu proteção contra infecção pelo parasito. Por fim, a utilização de quimeras de LAMP/Lci2-NT-5R-CT ou LAMP/Lci2-5R-CT induziu uma fraca resposta imune humoral, com produção de IgG, IgG1 e IgG2a por alguns animais. No entanto, a utilização da quimera LAMP/Lci2-NT-CT induziu proliferação celular e tendência a produção de IFN- $\gamma$ . Em conclusão, nenhum dos cinco protocolos utilizados foi capaz de induzir uma resposta imune específica predominantemente celular do tipo Th1 ou capaz de conferir proteção contra infecção dos animais.

**Palavras-chave:** imunização, antígenos recombinantes, *Leishmania chagasi*, camundongos

PINHEIRO, Cristiane Garboggini Melo de. ASSESSMENT OF MURINE IMMUNE RESPONSE USING DIFFERENT IMMUNIZATION PROTOCOLS WITH *Leishmania chagasi* RECOMBINANT ANTIGENS. Tese – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a disease caused by *Leishmania chagasi*. Dogs are the main reservoir of the parasite. A canine vaccine may contribute to the disease control in humans and dogs. In a previous study, recombinant antigens were selected from a cDNA library of *Leishmania chagasi* amastigotes in order to be evaluated as components of a vaccine against canine visceral leishmaniasis. In this study, five immunization protocols were assessed in mice with some of these antigens. BALB/c mice were injected with either rLci4A-NH6 or rLci2B-NH6 proteins, associated or not with the adjuvants saponin, ODN 1826 and different doses of a plasmid encoding murine IL-12 (pIL-12). Moreover, animals were primed with a plasmid encoding Lci2B (pLci2B) and boosted with rLci2B combined with saponin. Finally, all mice were primed with new antigens, Lci2-NT-5R-CT or Lci2-NT-CT, and they were boosted with the following recombinant proteins rLci2-NT-5R-CT-NH6 or rLci2-NT-CT-NH6 associated with saponin. In this late experiment, the used plasmids had an insert of a lysosome associated membrane protein, LAMP, to produce *in vivo* chimeras composed of LAMP with the antigens and to direct the presentation of the peptides to CD4+ T cell through MHC-II molecules. The humoral immune response was assessed by antibodies production (IgG, IgG1 and IgG2a) in animal serum samples and the cellular immune response by cellular proliferation and cytokine production (IFN- $\gamma$  and IL-5). The results showed that animals that were injected with rLci4A-NH6 alone or combined with pIL-12 generated IgG and IgG1 specific antibodies, while others that received saponin and ODN 1826 as adjuvants produced IgG, IgG2a and IgG1. Furthermore, IL-5 was detected in rLci4A-NH6/saponin group, but only in one of two experiments. Animals that were injected with rLci2B-NH6, alone or associated with pIL-12, presented IgG and IgG1 antibodies but no cellular immune response. The saponin used as adjuvant induced IgG, IgG2a and IgG1 antibodies, as well as IFN- $\gamma$ . The use of ODN 1826 induced IgG and IgG1, and favored IgG2a production, but failed in inducing IFN- $\gamma$ . On the other hand, animals that were primed with pLci2B and boosted with the protein associated with saponin produced IgG IgG1 and more intensively IgG2a, and only some animals produced IFN- $\gamma$ . Nevertheless, such immune response did not protect the animals against the parasite infection. At last, LAMP/Lci2-NT-5R-CT or LAMP/Lci2-5R-CT chimeras induced a weak humoral immune response, in which IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were detected in only a few animals. However, mice that were injected with LAMP/Lci2-NT-CT presented cellular proliferation and some animals produced IFN- $\gamma$ . In conclusion, in spite of the fact that the antigens are immunogenic in a murine model, none of the used protocols elicited an intense Th1 cellular immune response or a protective one.

**Key words:** immunization, recombinant antigens, *Leishmania chagasi*, mice



## LISTA FIGURAS

Figura		Página
1	Desenho esquemático dos antígenos recombinantes de <i>Leishmania chagasi</i>	34
2	Desenho esquemático da construção de DNA <i>Lci2-NT-5R-CT</i> enviada para síntese química, contendo sítios específicos para enzimas de restrição	36
3	Desenho esquemático dos protocolos de imunização	48
4	Avaliação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade	55
5	Detecção por <i>western blot</i> das proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade.	56
6	Avaliação da integridade e pureza dos plasmídeos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio	58
7	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci4A-NH6	61
8	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci4A-NH6, lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A.	63
9	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5 após estimulação <i>in vitro</i> com rLci4A-NH6 ou Con A	65
10	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e Ig1 reativos a rLci4A-NH6	68
11	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci4A-NH6, lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A	70
12	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5 após estimulação <i>in vitro</i> com rLci4A-NH6 ou Con A	73
13	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6	75
14	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6, lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A	77
15	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5 após estimulação <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6 ou Con A	80

16	Detecção de anticorpos IgG , IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6 (após imunização)	83
17	Detecção de anticorpos IgG , IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6 (após desafio)	84
18	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6, lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A (após imunização)	86
19	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6, lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A (após desafio)	87
20	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5 após estimulação <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6 ou Con A (após imunização)	90
21	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5 após estimulação <i>in vitro</i> com rLci2B-NH6 ou Con A (após desafio)	91
22	Avaliação da carga parasitária no baço	92
23	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2-NT-5R-CT-NH6 (A, B e C) ou rLci2-NT-CT-NH6 (D, E e F)	95
24	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6	97
25	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados <i>in vitro</i> com lisado de <i>L. chagasi</i> ou Con A	98
26	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5, por ELISA de captura, após estimulação <i>in vitro</i> de esplenócitos com rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6	101
27	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ e IL-5, por ELISA de captura, após estimulação <i>in vitro</i> de esplenócitos com Con A	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 2).	69
2	Concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 2).	72
3	Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 2)	72
4	Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 3)	76
5	Concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 3)	79
6	Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 3)	79
7	Valores de densidade óptica obtidos nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B (Protocolo 4)	82
8	Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 4).	85
9	Concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 4)	89
10	Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 4)	89
11	Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 5).	96
12	Concentração de IFN- $\gamma$ no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 5).	100
13	Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 5).	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5R	Motivos repetitivos de 39 aminoácidos
AA	Aminoácido
BCIP	fosfato de bromo cloro indolil
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
Con A	concanavalina A
CpG	Citosina-fosfato-guanosina
cpm	Contagem de partículas betas por minuto
CT	Região carboxi-terminal
D.O.	Densidade óptica
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano- sulfônico
His	Histidina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-thiogalactosídeo
LAMP	Proteína associada a membrana de lisossomos
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NBT	nitroazultetrazólio-dimetil formamida
NH6	Cauda de 6 histidinas
NK	Célula <i>natural killer</i>
NT	Região amino- terminal

PBS	Tampão fosfato tamponado com salina
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI 1640	Meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sódio
Th	Célula T auxiliadora
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TMB	Tetrametilbenzidina

## SUMARIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 No homem .....	20
2.2.2 No cão.....	21
<b>2.3 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 A LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE CELULAR Th1 .....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Uso de saponina.....	26
2.6.2 Uso de CpG-ODN.....	26
2.6.3 Uso de interleucina-12.....	28
2.6.4 Estratégia de sensibilização com DNA e reforço com a proteína – <i>prime-boost</i> .....	29
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>32</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 GERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 ESPECÍFICOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 SÍNTESE QUÍMICA DE <i>Lci2-NT-5R-CT</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NOS PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....</b>	<b>36</b>
<b>5.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR SDS-PAGE E/OU <i>Western Blot</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6 OBTENÇÃO DE LISADO DE PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>Leishmania chagasi</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>5.7 OBTENÇÃO DE OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS (ODN) 1826.....</b>	<b>42</b>

<b>5.8 ANIMAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.9 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.10 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....</b>	<b>48</b>
5.10.1 Avaliação da concentração anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	48
<b>5.11 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR.....</b>	<b>50</b>
5.11.1 Ensaio de linfoproliferação.....	51
5.11.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5) por esplenócitos através do método ELISA.....	51
<b>5.12 INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM <i>Leishmania chagasi</i> E DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA NO BAÇO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>53</b>
<b>6.0 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1 PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rLci4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 E DOS PLASMÍDEOS PARA IMUNIZAÇÃO E/OU AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS INJETADOS COM rLci4A-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA, ODN1826 OU pcDNA3.1-scmu-IL-12 (PROTOS 1 E 2).....</b>	<b>59</b>
6.2.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DOS ANIMAIS DO PROTOCOLO 1.....	59
6.2.1.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a reativos a rLci4A.....	59
6.2.1.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos .....	62
6.2.1.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-5) .....	64
6.2.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DOS ANIMAIS DO PROTOCOLO 2.....	66
6.2.2.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci4A.....	66
6.2.2.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos .....	69
6.2.2.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5).....	71
<b>6.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS INJETADOS COM rLci2B-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA, ODN1826 OU IL-12 – PROTOCOLO 3.....</b>	<b>73</b>
6.3.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6.....	74
6.3.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos .....	76

6.3.3	Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5) .....	78
<b>6.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM PLASMÍDEO CODIFICANDO rLci2B-NH6 E REFORÇO COM rLci2B-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA – PROTOCOLO 4.....</b>	<b>81</b>
6.4.1	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6.....	81
6.4.2	Avaliação da proliferação de esplenócitos .....	85
6.4.3	Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5).....	88
6.4.4	Determinação da carga parasitária no baço.....	92
<b>6.5</b>	<b>AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM AS QUIMERAS LAMP/Lci2-NT-5R-CT ou LAMP/Lci2-NT-CT E REFORÇO COM AS RESPECTIVAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À SAPONINA – PROTOCOLO 5.....</b>	<b>93</b>
6.5.1	Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos aos antígenos rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 .....	93
6.5.2	Avaliação da proliferação de esplenócitos.....	96
6.5.3	Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5).....	99
<b>7.0</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>8.0</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>
	<b>APENDICE A.....</b>	<b>127</b>



## 1.0 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A leishmaniose é uma enfermidade que está presente em 88 países, em todo o mundo, e cerca de 1,5 a 2,0 milhões de pessoas desenvolvem a leishmaniose clínica a cada ano, sendo que 75% dos casos clínicos afetam a pele (leishmaniose cutânea) e os 25% restantes representam a forma sistêmica e potencialmente fatal (leishmaniose visceral, LV). Segundo a Organização mundial de Saúde, a incidência anual de Leishmaniose visceral é de 500.000 casos e mais de 200 milhões de indivíduos estão sobre risco de infecção. Dentre os casos de LV, 90% ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, onde 70.000 ou mais mortes são reportadas anualmente (WHO, 2002).

A leishmaniose visceral é considerada um grave problema para a saúde pública, podendo ser fatal nos casos não tratados adequadamente. Trata-se de uma enfermidade que vem afetando um grande número de pessoas e levando a um aumento de áreas geográficas afetadas (DESJEUX, 2001). As medidas preconizadas para o controle dessa enfermidade pelo ministério da saúde não têm se mostradas efetivas, uma vez que são onerosas e laboriosas para serem aplicadas por um período prolongado.

No Brasil, a LV é considerada uma zoonose, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) o principal reservatório do parasito. Em alguns estudos, a utilização de métodos diagnósticos mais sensíveis mostrou que, em áreas endêmicas de LV, há uma percentagem elevada de cães que adquirem a infecção natural, podendo atingir cerca de 80 % da população desses animais (BERRAHAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALLEGO *et al.* 2001; COURTENAY *et al.*, 2002). Os animais infectados podem apresentar manifestações clínicas da doença ou permanecerem assintomáticos. Quando presentes, os sintomas podem ser curados com a instituição de tratamento farmacológico apropriado. Entretanto, apesar de haver uma redução da carga parasitária, não há esterilidade da infecção e os cães, habitualmente, apresentam recidiva da doença após interrupção do tratamento (SLAPPENDEL & TESKE, 1997; MORENO *et al.* 1999; RHALEM *et al.*, 1999; BANETH & SHAW, 2002). Como os quimioterápicos disponíveis para cão são os mesmos usados na terapêutica humana, após algumas administrações sucessivas de tratamento no cão, inóculos de *Leishmania* resistentes aos fármacos podem ser selecionados (GRAMICCIA, *et al.* 1992). Pelas razões apontadas acima, leishmaniose visceral canina além de ser um grande problema para saúde pública, representa também um grave problema em Medicina Veterinária.

A utilização de uma vacina contra LV canina pode ser uma alternativa para o controle de LV do tipo zoonótico, no homem e no cão (TESH, 1995; DYE, 1996). Idealmente, tal

vacina deveria ser capaz de impedir a aquisição da infecção pelos cães ou após a aquisição da infecção, prevenir ou reduzir substancialmente a transmissão do parasito de cães para o flebótomo e prevenir o desenvolvimento de doença nesses animais. Apesar da existência de duas vacinas que estão sendo comercializadas, Leishmune e Leishtec, infelizmente, até o momento, tais vacinas ainda não foram suficientemente avaliadas quanto às propriedades indicadas acima e, por isso, ainda não são recomendadas pelo Ministério da Saúde para o controle da doença em humanos.

As informações disponíveis na literatura sugerem que a resposta imune capaz de controlar a infecção por *Leishmania* no cão e no homem é uma resposta celular específica do tipo Th1 (PINELLI *et al.* 1994, RIBEIRO-DE-JESUS *et al.* 1998, LAGE *et al.*, 2007), na qual há produção principalmente de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e, conseqüentemente, ativação de macrófagos para destruição dos parasitos internalizados e produção de metabólitos do oxido nítrico ou oxigênio. Portanto, provavelmente, para que uma vacina seja capaz de induzir resistência contra a infecção, ela deve promover uma resposta imune eficiente e do tipo Th1 contra a *Leishmania*.

Visando identificar antígenos a serem candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, no presente trabalho, a resposta imune contra diferentes antígenos recombinantes, obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *Leishmania chagasi*, foi avaliada em diferentes protocolos de imunização em camundongos BALB/c. Para isso, os camundongos foram injetados com 4 antígenos distintos, isoladamente ou associados a adjuvantes capazes de induzir resposta imune celular Th1 (saponina, oligodeoxinucleotídeos e plasmídeo codificando interleucina-12). Além disso, os animais também foram sensibilizados com antígenos codificados por DNA plasmídeo e receberam reforço com as respectivas proteínas purificadas. Por fim, utilizou-se antígenos com códons otimizados para uma expressão mais eficiente das proteínas nas células dos animais, além de moléculas sem domínios repetitivos de aminoácidos fusionadas a uma proteína de membrana associada a lisossomos, a fim de favorecer a apresentação dos peptídeos para linfócitos T via MHC-II. O conhecimento de condições apropriadas para a indução de resposta imune celular Th1, através do uso de diferentes estratégias, provavelmente, será útil no planejamento de experimentos de imunização de cães com o objetivo de se desenvolver uma vacina contra leishmaniose visceral para essa espécie.

## 2.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é causada, principalmente, por protozoários pertencentes ao complexo donovani, o qual compreende as espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON *et al.*, 1987). Embora com menor frequência, a LV pode ser causada pela *Leishmania amazonensis* (BARRAL *et al.*, 1991) e *Leishmania tropica* (ALBORZI *et al.*, 2006).

Epidemiologicamente, a LV pode ser classificada em dois tipos que são denominados antroponótico e zoonótico. A LV do tipo zoonótico é endêmica em vários países da Bacia Mediterrânea, em países do Oriente Médio e no Brasil (DESJEUX, 2001) e o cão é considerado o principal reservatório no ciclo doméstico do parasito (DEANE; DEANE, 1954; LAINSON; SHAW, 1987; MORENO-ALVAR *et al.*, 2002). Historicamente, as espécies de *Leishmania* que causam a enfermidade nas áreas geográficas no Velho Mundo e do Novo Mundo foram denominadas, respectivamente, de *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (NICOLLE, 1908; CUNHA; CHAGAS, 1937). Alguns autores, no entanto, acreditam que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são geneticamente indistinguíveis uma da outra e, por isso, as consideram como uma única espécie (MAURÍCIO *et al.* 1999; MAURÍCIO *et al.*, 2000; LUKES *et al.*, 2007).

Protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo heteroxênico, necessitando de um animal invertebrado e outro vertebrado para completarem seu ciclo de vida. A *Leishmania* é transmitida ao homem pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, conhecidos comumente como flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie transmissora da *Leishmania chagasi* no Brasil (LAINSON *et al.*, 1977). No estado de Mato Grosso do Sul, outra espécie, *Lutzomyia cruzi*, vem sendo apontada como responsável pela transmissão do parasito (BRASIL, 2003).

O parasito pode ser adquirido pelo flebótomo durante o repasto sanguíneo em um hospederio vertebrado infectado, que na forma zoonótica da leishmaniose visceral pode ser o cão. No tubo digestivo do inseto, o protozoário se transforma e passa a exibir a forma flagelada denominada promastigota, a qual se adere às vilosidades das células intestinais e passa por um processo de multiplicação e mudanças bioquímicas, resultando em formas infectivas chamadas promastigotas metacíclicas (RITTIG; BOGDAN, 2000). Quando o inseto

vetor infectado faz um novo repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas podem ser depositadas na derme do hospedeiro vertebrado, que pode ser o homem ou o cão. Após serem fagocitados por macrófagos, essas formas se transformam em amastigotas dentro de fagolisosomas, onde ocorre a multiplicação. A partir daí, os parasitos podem disseminar-se para órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como por exemplo, baço, fígado, medula óssea e linfonodos (HANDMAN, 2001).

Acredita-se que a *L. chagasi* é mantida nas áreas urbanas e periurbanas através de um ciclo cão inseto cão (WHO EXPERT COM, 1990; MORENO *et al.*, 2002). Em áreas endêmicas, a percentagem de cães naturalmente infectados pode ser muito elevada, podendo atingir 80 % dos animais (BEHARRAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALEGO *et al.*, 2001 e QUINNEL *et al.*, 2001). Em experimentos nos quais cães infectados foram expostos a flebótomos, observou-se transmissão do parasito para o inseto vetor do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* com grande frequência (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1994; MOLINA *et al.*, 1994; GUARGA *et al.*, 2000; TRAVI *et al.*, 2001; COURTENAY *et al.*, 2002; MICHALSKY *et al.*, 2007).

## **2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

### **2.2.1 No homem**

Fatores genéticos do parasito devem contribuir para o tipo de desfecho que a infecção pode ocasionar no hospedeiro. No homem, após a inoculação do parasito pelo flebótomo na derme, parâmetros com idade, estado nutricional, fatores genéticos, resposta imune inata e resposta imune adquirida podem influenciar no estabelecimento da forma de infecção assintomática, oligossintomática ou polissintomática, essa última referida como a forma clássica da LV (MURRAY *et al.*, 2005). Enquanto que a forma assintomática pode passar completamente despercebida e muitos casos da forma oligossintomática podem evoluir para cura espontânea (PAMPIGLIONE *et al.*, 1975, BADARÓ *et al.*, 1986), a forma clássica é habitualmente fatal, caso não seja aplicado o tratamento específico.

O desenvolvimento das manifestações clínicas na LV está relacionado à incapacidade do hospedeiro em controlar a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear e pela instalação de um processo inflamatório crônico ineficaz em vários órgãos (ASHFORD, 2000).

Indivíduos que desenvolvem a forma clássica da LV podem apresentar várias manifestações clínicas, incluindo febre prolongada, perda de peso, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia e sangramento espontâneo (EVANS *et al.*, 1985; PEARSON *et al.*, 2000).

Os achados laboratoriais que costumam ser encontrados em pacientes com a forma clássica da enfermidade são eritropenia, leucopenia e plaquetopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (HANDMAN, 2001; GUERIN *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2005). A hipergamaglobulinemia provavelmente decorre de ativação policlonal de linfócitos B que produz grandes quantidades de anticorpos (GALVÃO-CASTRO, 1984).

Casos graves que levam a óbitos, frequentemente encontrados em idosos e crianças menores de 5 anos, estão associados a uma elevada carga parasitária nesses indivíduos, emagrecimento acentuado, anemia profunda, distúrbios digestivos com episódios de vômitos durante o tratamento (SEAMAN *et al.*, 1996).

### 2.2.2 No cão

As manifestações clínicas no cão, quando este é naturalmente inoculado com o protozoário, podem exibir também uma das três formas clínicas da doença: assintomática, oligossintomática e polissintomática (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; ABRANCHES *et al.*, 1991; MORENO *et al.*, 1999). Fatores relacionados ao cão, como idade, estado nutricional, fatores genéticos e imunológicos influenciam na evolução da infecção nesse animal (MORENO; ALVAR, 2002, QUINNEL *et al.*, 2003). Os animais que desenvolvem a forma polissintomática, considerada como forma clássica da LV canina, apresentam principalmente lesões cutâneas, perda de peso, linfadenomegalia, lesões oculares, epistaxe, apatia, anemia, insuficiência renal, onicogrifose e diarreia (CIARAMELLA *et al.*, 1997, KOUTINAS *et al.*, 1999; FERRER, 1999). Dentre os achados clínico-patológicos mais freqüentemente observados estão a eritropenia, plaquetopenia, neutrofilia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e uremia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999).

No Brasil, não há recomendação para o tratamento de LV canina pelo fato de drogas utilizadas, as quais são as mesmas indicadas para os casos humanos, não promoverem cura parasitológica nos animais. Apesar de haver remissão dos sintomas e redução do parasitismo, há recidiva da doença após interrupção do tratamento (MORENO *et al.* 1999; BANETH & SHAW, 2002). Além disso, existe a possibilidade de haver seleção de cepas resistentes do parasito a drogas utilizadas na terapêutica humana (GRAMICCIA *et al.*, 1992).

### 2.3 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil para o controle da LV são: identificação e tratamento precoce de pacientes humanos, eliminação de cães naturalmente infectados, o combate ao inseto vetor e o desenvolvimento de atividades educativas (BRASIL, 2003). No entanto, essas medidas são onerosas, laboriosas e não são realizadas de forma sistemática e por um tempo suficientemente longo para serem eficazes no controle da doença.

Uma alternativa para o controle de LV do tipo zoonótico, que afetaria positivamente o homem e o cão, seria o uso de uma vacina contra LV canina (TESH, 1995; DYE, 1996). O desenvolvimento de uma vacina para o cão, ao invés de uma para o homem, poderia ter êxito mais rapidamente, pois os testes de validação, segurança e aprovação seriam mais simples.

### 2.4 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA *Leishmania*

Mosmann *et al.* (1986), ao avaliarem a produção de citocinas de clones de células T CD4 + (células T auxiliaadoras) estimulados por antígenos ou por concanavalina A (Con A), descobriram que essas células poderiam ser classificadas em dois tipos que denominaram Th1 e Th2. Os linfócitos do tipo Th1 produzem IFN- $\gamma$ , interleucina (IL)-2, IL-3, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), e fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e são responsáveis pela imunidade celular, por reações inflamatórias, e também, pela produção de anticorpos da classe IgG2a. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e são responsáveis pela imunidade humoral e reações alérgicas (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Após inoculação do protozoário do complexo *Leishmania donovani*, provavelmente, na dependência da resposta imune inata e do tipo de resposta imune adquirida (CARVALHO *et al.*, 1992), o ser humano ou o cão pode desenvolver desde uma forma inaparente da infecção até uma enfermidade sistêmica grave.

A resposta imune tipo Th1, ou a predominância dos efeitos das citocinas produzidas por células T auxiliaadoras Th1, é exibida por seres humanos e cães que desenvolvem a forma assintomática da leishmaniose visceral (PINELLI *et al.* 1994, RIBEIRO-de-JESUS *et al.* 1998). Se, após a infecção pela *Leishmania*, linfócitos TCD4+ do tipo Th1 são estimulados, ocorre a produção predominante de IFN- $\gamma$ , com conseqüente ativação do macrófago e

destruição do parasito (MURRAY; NATHAN, 1999). Além disso, hipersensibilidade cutânea tardia e resposta linfoproliferativa, frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* foram observadas em seres humanos (DE ANDRADE *et al.*, 1982; CARVALHO *et al.*, 1992, D'OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 1997).

O controle da infecção depende, geralmente, da produção de IFN- $\gamma$  e expansão de linfócitos TCD4<sup>+</sup> Th1 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos (MURRAY *et al.*, 1983). Assim, a incapacidade dessas células proliferarem e produzirem IFN- $\gamma$  implica no aumento da carga parasitária. A produção de IFN- $\gamma$  é regulada por diversos fatores na leishmaniose visceral, dentre eles a IL-2 e IL-10 apresentam um papel fundamental na estimulação ou supressão dessa citocina (BACELLAR *et al.*, 2000).

Já os indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por células T CD4<sup>+</sup> Th2 (CARVALHO *et al.*, 1985; GHALIB *et al.*, 1993; SUNDAR *et al.*, 1997). Neste tipo de resposta, ocorre uma predominância da produção endógena de IL-10 e IL-4 sobre o IFN- $\gamma$ , além de uma ativação policlonal das células B, o que leva a uma hipergamaglobulinemia (KHARAZMI *et al.*, 1999). A presença de anticorpos está relacionada a alta parasitemia (MILES *et al.*, 2005).

O perfil de resposta imune em cães doentes ou resistentes à infecção por *Leishmania* ainda não é muito claro, uma vez que poucos estudos na literatura avaliaram sistematicamente esses animais. Entretanto, os dados publicados sugerem que a resposta protetora está relacionada à presença de resposta linfoproliferativa e hipersensibilidade celular tardia a antígenos de *Leishmania*, falta de sinais clínicos, baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e baixa carga parasitária. Estudos têm demonstrado o desenvolvimento de resposta imune celular em cães infectados e assintomáticos, associada à ativação de células Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (PINELLI *et al.*, 1994; RHALEM *et al.*, 1999). Por outro lado, cães com doença ativa apresentaram uma imunossupressão da resposta imune celular contra o parasito, além de amplo espectro de sintomas e elevada carga parasitária em diversos tecidos e órgãos (REIS *et al.*, 2006).

## 2.5 A LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

A resposta imune contra protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* tem sido estudada em seres humanos e cães. Entretanto, devido às limitações éticas e complexidade para se realizar experimentos no homem e no cão vários pesquisadores

procuraram identificar um modelo animal apropriado a fim de compreender melhor a interação entre sistema imune do hospedeiro vertebrado e o parasito. Nesse contexto, o camundongo parece ser o animal mais estudado para a obtenção de informações sobre as interações mencionadas e da imunopatogênese da LV.

Estudos genéticos sobre mecanismos de defesa envolvidos durante o curso da infecção contribuíram para a identificação de linhagens de camundongos que podem ser classificadas como susceptíveis (BALB/c e C57BL/6) ou resistentes (CBA, C3H/HeJ) à infecção por protozoário do complexo *L. donovani* (KAYE *et al.*, 2004).

Em uma fase inicial da infecção, a multiplicação parasitária no interior de células fagocíticas pode ser, em parte, controlada geneticamente contando com a participação de um gene (*Sc11A1*, antigo *Nramps1*) envolvido no controle da infecção parasitária (VIDAL *et al.*, 1995). Esse gene codifica uma proteína transportadora de íons, expressa na membrana de fagolisossoma de macrófagos infectados, a qual remove  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  de compartimentos intra-fagossomais, restringindo assim a multiplicação do parasito dentro nesse ambiente (HUYNH; ANDREWS, 2008). Embora as linhagens de camundongo susceptíveis não cheguem a apresentar uma forma grave da doença, tal como pode ocorrer em casos humanos ou caninos, o estudo da resposta imune nesse modelo animal pode contribuir na elucidação da participação de fatores e mecanismos imunológicos que participam e influenciam os desfechos clínicos conseqüentes à infecção.

No camundongo, a resposta imune inata pode ter importante papel no controle da infecção por parasitos do complexo *L. donovani*, (KAYE *et al.*, 2004). Participam desse tipo de resposta células como neutrófilos, células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas (NATHAN *et al.*, 1983). A atividade leishmanicida é dependente da capacidade dos macrófagos em produzir radicais de oxigênio e nitrogênio tóxicos em resposta ao IFN- $\gamma$  produzido principalmente por células NK e, mais tarde, por células TCD4+ Th1, (BARRAL-NETTO *et al.*, 1998; GRADONI, 2001).

Linhagens de camundongos susceptíveis à infecção experimental com *L. chagasi* desenvolvem parasitismo no fígado e no baço de forma diferente. Durante a infecção, formas amastigotas do parasito se multiplicam rapidamente no fígado nas quatro primeiras semanas, quando então caem substancialmente na oitava semana. Entretanto, a multiplicação dessas formas no baço ocorre mais tardiamente e se mantém por um longo período de tempo (WILSON *et al.*, 1996, 2005; NIETO, 2011).

Estudos realizados em células isoladas em granulomas presentes no fígado de camundongos, no estágio inicial da infecção por *L. chagasi*, têm demonstrado um defeito



local na produção de IFN- $\gamma$  devido a fatores solúveis liberados no sobrenadante da cultura de esplenócitos. No entanto, existe uma ampla produção de IFN- $\gamma$  antígeno específico por esplenócitos dos mesmos animais (WILSON *et al.*, 1996). Fatores imunossupressores, como, por exemplo, TGF- $\beta$ , têm sido associados a essa inibição, uma vez que a utilização de anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$  revertem a inibição da produção de IFN- $\gamma$  (WILSON *et al.*, 1998). No baço, a persistência do parasitismo está associada à desagregação de arquitetura e à falta de formação de granulomas, provavelmente, conseqüentes à produção exagerada de TNF, além da síntese de IL-10 e TGF- $\beta$  nesse órgão (WILSON *et al.*, 1998; KAYE *et al.*, 2004).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado uma associação entre produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a e o padrão de resposta imune encontrada em camundongos. A produção de anticorpos da subclasse IgG2a está associada a uma resposta Th1, enquanto que a de IgG1 a uma resposta Th2 (GURUNATHAN *et al.*, 1997; SJÖLANDER *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 2002).

## **2.6 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE CELULAR Th1**

A resposta imune induzida por protocolos de imunização pode variar na dependência do local e via de administração do antígeno e do estado imunológico do indivíduo. Muitos antígenos são pouco imunogênicos e requerem co-administração de adjuvantes para induzirem uma resposta imune ótima. Além disso, novas abordagens no desenvolvimento de vacinas vêm sendo estudadas como, por exemplo, a utilização de proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e candidatos a vacinas de DNA (LECLERC, 2003).

Adjuvantes imunológicos foram primeiramente descritos por Ramon, em 1924, como substâncias utilizadas em combinação com um antígeno específico para produzir maior imunidade do que o antígeno sozinho (revisto por SUN *et al.*, 2009). Essas substâncias são utilizadas em formulações vacinais com a função de potencializar a resposta às imunizações, reduzir a quantidade de antígeno utilizada e direcionar o tipo de resposta imune a ser desenvolvida, além de sustentá-la por um período de tempo maior. Dentre os adjuvantes capazes de induzir resposta imune Th1 utilizados em associação com antígenos de *Leishmania*, destacam-se a saponina, oligodeoxinucleotídeos e IL-12.

### 2.6.1 Uso de saponina

Saponinas são glicosídeos naturais de esteróides ou triterpenos encontrados em muitas plantas que exibem diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Pelo fato de possuírem a propriedade de ativar o sistema imunológico de mamíferos, com capacidade de estimular tanto resposta imune Th1 quanto a indução de células T citotóxicas contra antígenos exógenos, grande interesse tem sido despertado a cerca do uso dessa substância como adjuvante vacinal (SUN *et al.*, 2009).

Em 1974, Dalsgaard obteve uma mistura enriquecida de saponina, oriunda do extrato da casca de *Quillaja saponaria* Molina, conhecida como Quil A, e observou que essa mistura era capaz de estimular uma resposta imune humoral e celular em ensaios vacinais contra doenças virais (revisto por SUN *et al.*, 2009). Alguns anos depois, frações contidas na Quil A foram purificadas e caracterizadas quanto à atividade adjuvante e toxicidade. Nesse trabalho, as quatro frações obtidas, QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21, induziram elevados níveis de anticorpos antígeno específicos da classe IgG, assim como as subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b quando co-administradas com albumina sérica bovina (BSA). Além disso, as frações QS-17, QS-18 e QS-21 induziram níveis mais elevados de IgG2a em relação a IgG1 e, dessas três frações, apenas a QS-21 mostrou apresentar efeitos tóxicos mínimos ou ausentes (KENSIL *et al.* 1991).

Santos e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da combinação de uma proteína de *L. donovani* (Fucose Manose Ligante, FML) com três frações de saponina, dentre eles a Quil A ou QS21, em um protocolo de imunização contra leishmaniose visceral murina. Os resultados desse experimento mostraram que a fração QS21 associada à FML induziu uma produção mais intensa de IFN- $\gamma$  e anticorpos antígeno específicos IgG2a e provavelmente essa resposta levou a uma redução de carga parasitária no fígado em 79,2%. Além disso, a utilização dessa fração também não causou efeitos tóxicos, não sendo observado dor local, feridas, perda de pêlos ou letalidade nos animais.

### 2.6.2 Uso de CpG-ODN

Na década de 90, o DNA bacteriano foi reconhecido como uma molécula com efeitos estimulatórios em uma variedade de células do sistema imune (KRIEG, *et al.* 1995). Essa propriedade foi atribuída à presença de oligodeoxinucleotídeos, os quais correspondem a sequências de dinucleotídeos (citosina, C e guanidina, G) não metiladas, denominadas de

CpG-ODN. Por outro lado, além do DNA de eucariotos possuírem apenas um quarto de sequências ricas em C e G quando comparado com DNA bacteriano, essa molécula é seletivamente metilada na citosina dos dinuclotídeos CpG (LIPFORD *et al.*, 1998). Assim, o descobrimento de que o sistema imune de vertebrados reconhece essas diferenças estruturais presentes no DNA bacteriano têm despertado interesse por muitos pesquisadores sobre a possibilidade em utilizar CpG-ODN como adjuvantes em vacinas.

Sequências de CpG-ODN induzem a proliferação de células B e produção de imunoglobulina G, secreção de citocinas por monócitos, aumento da atividade citotóxica de células *natural killer* (NK) e liberação de IFN- $\gamma$  (KRIEG *et al.*, 2000). Essas moléculas têm sido testadas como adjuvantes em formulações candidatas a vacinas, induzindo uma resposta imune Th1 a proteínas co-administradas, enquanto que a imunização convencional apenas com proteínas tipicamente resulta em uma resposta imune do tipo Th2. A resposta contra CpG-ODN parece ser mediada pela ligação deste com receptores de reconhecimento padrão, nesse caso TLR9, presentes em células de mamíferos e conhecidos como *toll like receptors* (HEMMI *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos na literatura têm utilizado diferentes sequências de CpG-ODN co-administradas com antígenos visando à indução de uma resposta imune celular Th1.

Camundongos BALB/c que receberam antígeno solúvel de *L. major* associado à CpG-ODN e, posteriormente, desafiados com promastigotas metacíclicas do parasito, mostraram uma redução significativa no tamanho da lesão quando comparados com camundongos que receberam apenas o antígeno solúvel (WALKER *et al.*, 1999). Nesse trabalho, os autores demonstraram que os efeitos imunoestimulatórios induzidos pelo CpG-ODN, especificamente a sequência denominada de ODN 1826, foram através de mecanismos dependentes de IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Tewary e colaboradores (2004), também utilizando ODN 1826, administraram em camundongos BALB/c uma proteína recombinante de *Leishmania donovani* “recombinant open reading frame F” (rORFF) isoladamente ou em associação com essa sequência de CpG-ODN e infectados 2 semanas após com promastigotas de *Leishmania donovani*, por via intravenosa. A combinação rORFF/ODN 1826 induziu uma resposta imune celular específica Th1, com aumento de proliferação celular, IL-12 e IFN- $\gamma$ , além de redução parcial de carga parasitária no baço e fígado.

### 2.6.3 Uso de interleucina-12

A IL-12 é uma proteína heterodimérica, com mobilidade relativa correspondente a 70-75 kDa (p70), composta pelas subunidades p35 e p40. Essas subunidades são codificadas por dois genes, distintos entre si, e localizados em cromossomos diferentes. O heterodímero p70 estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células “natural killer” (NK), promove diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , além de aumentar a atividade citolítica de células NK ativadas e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (KOBAYASHI *et al.*, 1989). A IL-12 é produzida, principalmente, por células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e por neutrófilos (TRINCHIERI, 2003).

A identificação de IL-12 como elemento chave no desenvolvimento de resposta imune celular do tipo Th1 levou ao uso desta citocina como agente imunomodulador da resposta imune e como adjuvante em formulações candidatas a vacina (HEINZEL *et al.*, 1993; AFONSO *et al.*, 1994; YAMAKAMI *et al.*, 2001; SALDARRIAGA *et al.*, 2006; TEWARY, *et al.*, 2006).

A resposta imune gerada em camundongos BALB/c injetados com extrato de antígenos solúveis de *L. major* e a IL-12 na forma de proteína foi caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  e ausência de síntese de IL-4 em células do linfonodo drenante. Os níveis de IFN- $\gamma$  encontrados nas culturas de células desses animais foram até maiores do que os observados em animais pertencentes à linhagem C3H/HeN, resistente a *L. major*, injetados com extrato de antígenos solúveis de *Leishmania*. Por outro lado, os grupos de camundongos BALB/c controles negativos, que receberam apenas IL-12 ou somente extrato de antígenos, produziram pequenas quantidades das citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-4) e uma resposta do tipo Th2, respectivamente (AFONSO *et al.*, 1994).

Yamakami *et al.* (2001) induziram uma resposta imune protetora em camundongos BALB/c contra leishmaniose ao administrarem, uma semana antes da inoculação dos animais com os parasitos vivos, extrato de antígenos solúveis de *L. major* e 10  $\mu$ g de plasmídeo codificando IL-12 murina. Os animais injetados com o extrato de antígenos combinados com plasmídeo contendo inserto de IL-12 desenvolveram uma resposta tipo Th1, demonstrada pela produção de IFN- $\gamma$  e produção predominante de IgG2a quando comparados com animais que receberam plasmídeo vazio e extrato de antígenos ou apenas plasmídeo codificando IL-12.

Em outro estudo, Tewary e colaboradores (2006) observaram que a administração de um antígeno recombinante de *L. donovani* (rORFF) e um plasmídeo codificando IL-12 murina promoveu uma resposta imune protetora contra leishmaniose visceral experimental mais

intensa que a obtida com a imunização usando-se somente rORFF. Essa resposta foi caracterizada por um aumento da resposta linfoproliferativa, além da produção de IFN- $\gamma$ , anticorpos da subclasse IgG2a e baixos níveis de IL-4. Como a administração de apenas rORFF resultou em uma resposta mista Th1/Th2, a associação de rORFF a VR-IL-12 resultou em um desvio na direção de uma resposta imune do tipo Th1

Nosso grupo demonstrou que células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* aumentam a expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  quando cultivadas na presença de IL-12 canina recombinante de cadeia única, mesmo na ausência de estímulo antigênico adicional (DOS SANTOS *et al.*, 2004). Além disso, Strauss-Ayali *et al.* (2005), observaram que a estimulação de CMSP de cães, naturalmente ou experimentalmente infectados por *Leishmania infantum* com IL-12 canina recombinante restaurou ou promoveu aumento da resposta proliferativa específica e da produção de IFN- $\gamma$ . Da mesma forma, Saldarriaga e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de um plasmídeo codificando IL-12 em cães induziu o aumento da expressão de IFN- $\gamma$  em CMSP no plasma.

#### **2.6.4 Estratégia de sensibilização com DNA e reforço com a proteína – *prime-boost***

Em 1990, Wolff e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a injeção intramuscular, em camundongos, de plasmídeos codificando genes de interesse poderia resultar na expressão *in vivo* da proteína codificada. Posteriormente, em outro estudo, a injeção de um plasmídeo codificante de uma proteína viral conferiu imunidade protetora contra o desafio viral em um ensaio pré-clínico de influenza (ULMER *et al.*, 1993). A partir daí, devido à facilidade em se obter construções plasmídeais codificando antígenos de patógenos, antígenos tumorais ou moléculas moduladoras da resposta imune, houve um grande interesse por parte da comunidade científica em produzir rapidamente tais produtos visando utilização tanto em vacinas profiláticas como em imunoterapia (LIU *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que a resposta imune induzida após a administração de DNA plasmídeo é preferencialmente celular, com perfil Th1, apresentando produção de IFN- $\gamma$  e aumento na produção de anticorpos IgG2a (RAZ, *et al.*, 1996).

Uma estratégia que vem sendo utilizada visando aumentar a intensidade da resposta imune induzida por candidados a vacinas de DNA é a administração de plasmídeos contendo insertos de interesse para sensibilização dos animais e o reforço com a respectiva proteína

purificada (TEWARY *et al.*, 2005; RAFATI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008; MAZUNDER *et al.*, 2011).

Tewary e colaboradores (2005) avaliaram a capacidade de uma proteína de *L. donovani* (open-reading frame, ORFF) em induzir proteção contra infecção pelo parasito em camundongos. Nesse estudo, camundongos receberam duas doses de rORFF (proteína/proteína) ou duas doses de um plasmídeo codificando a proteína (DNA/DNA), ou ainda, uma dose do mesmo plasmídeo anterior seguido de um reforço com a proteína (DNA/proteína). Os resultados observados mostraram que a sensibilização dos animais com DNA e reforço com a proteína induziu uma resposta imune celular Th1 mais intensa, com produção significativamente maior de IL-12, IFN- $\gamma$ , aumento de proliferação celular e dos níveis de anticorpos IgG2a e diminuição da carga parasitária no baço e fígado dos animais mais efetivamente do que nos outros dois grupos (proteína/proteína e DNA/DNA).

Em outro estudo, a eficácia de dois protocolos de imunização em camundongos utilizando uma cisteína protease de *L. chagasi* (Ldccys 1) foi avaliada. Os animais receberam três doses de rLdccys 1 associada à *Propionibacterium acnes* ou Bacille Calmette Guerin (BCG) como adjuvantes, ou ainda, três doses de um plasmídeo contendo inserto de Ldccys 1 e CpG-ODN 1826 e reforço com a proteína associada à CpG-ODN 1826. Os resultados desse trabalho mostraram que ambos os protocolos induziram uma resposta imune celular Th1 protetora contra infecção com *L. chagasi*, com produção de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico. No entanto, a utilização de DNA/proteína foi mais eficaz na proteção dos animais contra a infecção do que o uso de apenas proteína. Observou-se a redução de carga parasitária no baço dos animais de 100 ou 1000 vezes quando os animais foram imunizados com a proteína ou DNA/proteína, respectivamente, em relação ao grupo controle (FERREIRA *et al.*, 2008).

Mazunder e colaboradores (2011) avaliaram a potência, eficácia e durabilidade de protocolos de imunização utilizando a proteína recombinante gp63, também comparando a utilização de DNA/DNA, DNA/proteína ou proteína/proteína, em camundongos BALB/c. Nesse trabalho, os autores observaram que a sensibilização dos animais com plasmídeo codificando o antígeno e reforço com a proteína recombinante (DNA/proteína) associada à CpG-ODN induziu uma resposta imune celular e humoral intensa capaz de controlar a infecção por *L. donovani*, com maior produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e proporção IgG2a/IgG1 do que nos dois outros sistemas (DNA/DNA e proteína/proteína).

Os dados mencionados anteriormente sugerem que o uso de adjuvantes, como saponina, CpG-ODN e IL-12, assim como o sistema de sensibilização com DNA e reforço

com proteína podem promover a geração de resposta imune celular Th1 e, portanto, serem utilizados em estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral.

### 3.0 HIPÓTESE

Antígenos recombinantes da forma amastigota de *Leishmania chagasi*, reconhecidos por anticorpos de cães com resposta imune humoral e celular específica, são úteis para o desenvolvimento de vacina contra leishmaniose visceral canina.

### 4.0 OBJETIVOS

#### 4.1 GERAL

Testar protocolos de imunização em camundongos, visando definir condições para indução de resposta imune do tipo Th1 contra antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*, a fim de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

#### 4.2 ESPECÍFICOS

- Produzir os antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* rL4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6, rLci2-NT-CT-NH6;
- Produzir plasmídeos contendo inserto de IL-12 murina, Lci2B, Lci2-NT-5R-CT ou Lci2-NT-CT;
- Avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c injetados com os antígenos recombinantes rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6 em combinação com adjuvantes (saponina, plasmídeo codificando IL-12 murina ou sequências de oligodeoxinucleotídeos-ODN);
- Avaliar a capacidade de camundongos BALB/c imunizados com rLci2B-NH6, usando-se um protocolo de sensibilização com DNA e reforço com proteína associada a saponina, de resistir à infecção experimental por *L. chagasi*;
- Avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c imunizados pela sensibilização com plasmídeos contendo as quimeras LAMP/Lci2-NT-5R-CT ou LAMP/Lci2-NT-CT e reforço com as proteínas recombinantes rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6 associadas a saponina.

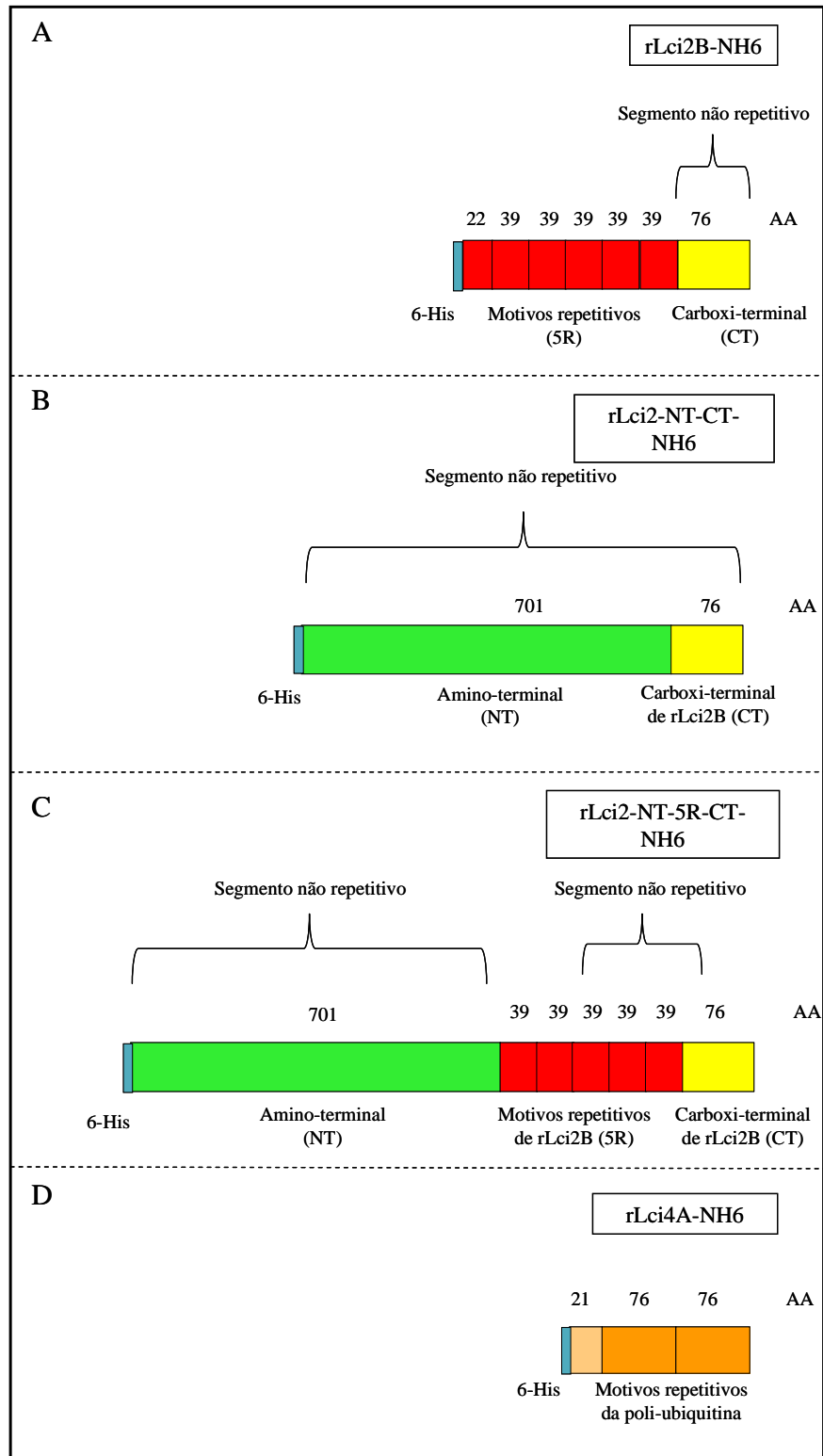


## 5.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

O antígeno recombinante rLci2B-NH6 possui o segmento com 293 aminoácidos (AA) da extremidade carboxila (CT) de uma cinesina codificado pelo gene *LinJ14\_V3.1180* (BURNS, *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007) e é caracterizado por possuir, a partir da extremidade amina (NT), 31 AA codificados pelo plasmídeo *pRSET-B*, incluindo uma cauda de seis histidinas (NH6), seguidos de um segmento com 5,5 motivos repetitivos de 39 AA (5R) e um segmento não repetitivo de 76 AA (Figura 1A). Em relação a rLci4A-NH6, esse antígeno possui o segmento com 173 AA da CT da poliubiquitina codificado pelo gene *LinJ36\_V3.3690* (OLIVEIRA *et al.*, 2011, submetido à publicação) e é caracterizado por possuir, a partir da extremidade amina (NT), 35 AA codificados pelo plasmídeo *pRSET-A*, incluindo uma cauda NH6, seguidos ~2,3 segmentos repetitivos de 76 aminoácidos (Figura 1D).

Adicionalmente, para avaliar a influência de domínios repetitivos sobre a qualidade da resposta imune, foi concebida uma construção de DNA (*Lci2-NT-CT*) codificando a seqüência não repetitiva de 701 AA da NT codificada pelo gene da cinesina (BURNS *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007) e seqüência não repetitiva de 76 AA da CT de rLci2B-NH6 (*LinJ14\_V3.1180*; GERALD *et al.*, 2007), apropriada para produzir a proteína recombinante rLci2-NT-CT-NH6, usando-se plasmídeo *pRSET* (Figura 1B). Além disso, outra construção de DNA foi concebida (*Lci2-NT-5R-CT*), adequada para produzir uma proteína recombinante contendo 5R entre os domínios das NT e CT, denominada rLci2-NT-CT-NH6, usando-se plasmídeo *pRSET* (Figura 1C).



**FIGURA 1. Desenho esquemático dos antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*** (6-His corresponde a uma região contendo 6 moléculas do aminoácido histidina na região amino-terminal, aa refere-se ao número de aminoácidos).

## 5.2 SÍNTESE QUÍMICA DE *Lci2-NT-5R-CT*

Para a geração das construções plasmideais *pRSET-Lci2-NT-CT*, *pRSET-Lci2-NT-5R-CT*, *p43.2-Lci2-NT-CT*, *p43.2-Lci2-NT-5R-CT*, *p43.2-LAMP-Lci2-NT-CT*, *p43.2-LAMP-Lci2-NT-5R-CT*, inicialmente, o DNA codificando *Lci2-NT-5R-CT* foi sintetizado quimicamente por uma empresa biotecnológica (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha) e clonado em plasmídeo *pMK*, dando origem à construção *pMK-Lci2-NT-5R-CT*.

Visando à produção eficiente das proteínas recombinantes em células de camundongos e cães, antes da síntese química do DNA *Lci2-NT-5R-CT*, foi realizada a otimização de códons usando-se o programa de computador Leto 1.0. A otimização resulta na remoção de sítios crípticos de *splicing* e motivos desestabilizadores do RNA mensageiro. Além disso, sítios específicos para enzimas de restrição foram introduzidos na construção *Lci2-NT-5R-CT* (Figura 2) com o propósito facilitar a subclonagem de regiões de interesse através de cortes na molécula por digestão enzimática, como por exemplo, a obtenção da construção sem 5R, *Lci2-NT-CT*. O desenho de *Lci2-NT-5R-CT* e o processo de otimização de códons foram realizados por Dr. Rafael Dhalia, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). A partir da construção plasmideal *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, foram feitas subclonagens para os plasmídeo *pRSET-A* e *p43.2* com ou sem LAMP (gene que codifica uma proteína associada à membrana de lisossomos). As subclonagens foram realizadas por Dra Fabíola Holetz, Laboratório de Microbiologia, CPqAM. O plasmídeo *p43.2* contendo ou não LAMP foi cedido por Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do CPqAM. Em protocolos de imunização em camundongos, proteínas recombinantes fusionadas a LAMP são direcionadas para o compartimento de montagem de moléculas do MHC classe II e, provavelmente por isso, induzem intensa resposta imune celular, principalmente, mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (MARQUES *et al.*, 2003; ARRUDA *et al.*, 2004, 2006).



**FIGURA 2. Desenho esquemático da construção de DNA *Lci2-NT-5R-CT* enviada para síntese química, contendo sítios específicos para enzimas de restrição (NT- segmento não repetitivo amino-terminal com 701 aminoácidos; R – motivo repetitivo de 39 aminoácidos de rLci2B-NH6; CT – segmento não repetitivo carboxi-terminal de rLci2B-NH6 com 76 aminoácidos.**

### 5.3 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NOS PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO

*E. coli* da linhagem TOP10 (Invitrogen) transformada com *pBK-CMV-Lci2B*, *pcDNA3.1-scmu-IL-12* (que codifica IL-12 murina como uma proteína de fusão de cadeia única, construção doada pela Dra. Emanuela Handman, Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália), *p43.2-Lci2-NT-CT*, *p43.2-Lci2-NT-5R-CT*, *p43.2-LAMP-Lci2-NT-CT* e *p43.2-LAMP-Lci2-NT-5R-CT* do banco de bactéria do nosso Laboratório, mantido a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram usadas para a produção das respectivas construções plasmídeais.

A purificação dos plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina seguido de cromatografia de troca iônica usando-se um conjunto de reagentes da Qiagen (*Plasmid Mega Kit* ou *Endofree Mega Kit*, Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, uma colônia de TOP10 transformada com cada uma das construções ou plasmídeo sem inserto (controle negativo), obtida de uma placa de petri com meio de cultura Luria Bertrani (LB) agar e antibiótico apropriado para cada construção, foi usada para inocular 5 mL caldo de cultura LB com antibiótico em tubos de vidro. Os tubos foram incubados por 8 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante de 250 rpm,. Em seguida, 3 mL de cada suspensão bacteriana resultante foram usados para inocular um volume de 1,5 L de meio LB com antibiótico (diluição 1:500) em frascos Erlenmeyer. Os frascos foram incubados por 16 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm. Após centrifugação, cada sedimento bacteriano contendo DNA plasmídeo foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Cada sedimento bacteriano foi ressuspensão com tampão composto por Tris-Cl a 50 mM, pH 8,0, EDTA a 10 mM e RNase A a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e submetido à lise pela adição do tampão contendo NaOH a 200 mM e SDS a 1% (m/v). Em seguida, a suspensão foi neutralizada pelo acréscimo do tampão com acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{COOK}$  a 1M, pH 5,0) e

centrifugada a 20.000 x g, por 30 minutos, a 4° C, para obtenção do sobrenadante contendo DNA plasmideal. Esse sobrenadante foi filtrado e aplicado a uma coluna cromatográfica de troca iônica previamente equilibrada com tampão contendo NaCl a 750 mM, 3-(N-morfolino) ácido propano sulfônico (MOPS) 50 mM, pH 7,0; isopropanol a 15% (v/v) e Triton X-100 a 0.15% (v/v). As colunas foram lavadas com tampão contendo NaCl a 1 M, MOPS a 50 mM, pH 7,0 e isopropanol a 15% (v/v) e, depois, eluídas com tampão MOPS a 50 mM, pH 7.0 e 15% isopropanol (v/v). DNA de cada construção plasmideal foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol. Tubos contendo DNA plasmideal foram deixados abertos para a evaporação de vestígios de etanol. Em seguida, DNA plasmideal foi ressuspensão em salina (NaCl a 0,9 %, m/v) estéril, livre de endotoxinas, e armazenados a -20 °C, até o momento do uso. Alíquotas de cada preparação plasmideal foram usadas para determinação da concentração de DNA e grau de pureza. Para isso, foi realizada leitura da densidade óptica a 260 e 280 nm (Nanodrop, ND-1000, Thermo Scientific, EUA), análise em gel de agarose a 1% com brometo de etídio (SAMBROOK *et al.*, 2001) e determinação da concentração de endotoxinas, usando-se o conjunto Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000® (Lonza, Walkersville, EUA) seguindo-se recomendações do fabricante.

#### 5.4 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A produção das proteínas recombinantes rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci4A-NH6 foi realizada a partir do cultivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET* com as respectivas construções de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (Invitrogen Corporation). Resumidamente, uma colônia BL21(DE3)pLysS transformada, separadamente, com cada construção plasmideal foi utilizada para preparo de um pré-inóculo em 30 a 50 mL de meio de cultura [caldo Luria-Bertani (LB): bacto-triptona a 1 % (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5 % (m/v, Isofar, Duque de Caxias – RJ), cloreto de sódio a 1 % (m/v, Isofar), pH 7.0, suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich)], por 16 horas sob agitação constante e a 37° C. A partir desses pré-inóculos, diluições foram feitas em um volume maior de meio LB (10 a 15 litros) de forma que o cultivo fosse iniciado com um valor de densidade óptica, a 600 nm de comprimento de onda (D.O. 600 nm), de 0,1. Cada suspensão bacteriana gerada foi incubada a 37°C, sob agitação de 250 rpm até atingir uma D.O. 600 nm de 0,4 - 0,6. Em seguida, para indução da produção da proteína recombinante, Isopropil-β-D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA

ou Sigma-Aldrich) foi adicionado ao cultivo para alcançar uma concentração final de 0,1 mM (para rLci2B-NH6 e rLci4A-NH6) e 0,2 mM (para rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6). Após 3 horas a indução com IPTG, cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 x g, 4 °C, por 15 minutos. Os sedimentos bacterianos foram armazenados a -20 °C até o momento do uso. Amostras foram coletadas em diferentes etapas de cultivo para avaliação em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970).

Para a purificação das proteínas recombinantes, cada 1 g de sedimento bacteriano foi ressuspenso com 3 mL de tampão de lise (20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 10-20 mM Imidazol, pH 7.5-8.0), com auxílio de um agitador vórtex. Em seguida, lizozima (Sigma-Aldrich) foi adicionada para atingir uma concentração final de 1 mg para cada mililitro de tampão de lise. Cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, para cada 3 mL, foram acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA) e cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por mais 30 minutos. Com o objetivo de fragmentar o DNA genômico da bactéria, cada suspensão foi submetida a sonicação, com aplicação de seis pulsos de 200 Watts, com 20 segundos de duração de cada por pulso e com intervalos de 1 minuto entre cada dois pulsos consecutivos, sob o gelo. Para a obtenção de proteínas da fração solúvel ou dos corpúsculos de inclusão, cada suspensão foi centrifugada a 17.000 x g, a 4°, por 15 minutos.

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por fracionamento cromatográfico, usando-se sefarose (Sephacrose Chelating Fast Flow; Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia) imobilizada com níquel, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, um volume adequado da resina (3 a 5 mL) foi colocado em tubos de 50 mL (Corning) e, após lavagem com água destilada, NiSO<sub>4</sub> (MERCK, Frankfurt, Alemanha) a 0,1 M foi adicionado ao tubo, permanecendo sob agitação, a temperatura ambiente, por 15 minutos. Uma nova lavagem com água destilada foi realizada e, então, a resina carregada com níquel foi equilibrada com tampão de lise com (para rLci4A-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6) ou sem uréia (para rLci2B-NH6). Para purificação de rLci2B-NH6 ou de rLci4A-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6, sobrenadante sem uréia ou cada sedimento ressuspenso com tampão de lise com 8 M de uréia, obtidos após lise bacteriana e centrifugação foi misturado com a resina e incubado por 30 minutos, sob agitação constante, a temperatura ambiente. O procedimento de lavagem da resina para remoção das proteínas que não se ligaram ao níquel consistiu na utilização de dois tampões, sendo o tampão de lavagem I composto por 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 31,25 mM Imidazol, 0,1% triton X-114 (v/v), pH 7.5 a 8.0 e o tampão de lavagem II composto pelos mesmos reagentes, porém sem o

triton X-114 (REICHEL T *et al.*, 2006). Cada alíquota de resina foi consecutivamente lavada com um volume 50 vezes do tampão I e 20 vezes do tampão II, para remover lipopolissacarídeos e Triton X-114, respectivamente. As proteínas ligadas à resina foram eluídas pela adição do tampão contendo 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 500 mM Imidazol, contendo ou não 8 M de uréia, pH 7.5 a 8.0. Os eluatos obtidos, contendo as proteínas purificadas, foram submetidos a diálise contra tampão fosfato tamponado com salina (PBS, NaCl a 137 mM, KCl a 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 9,58 mM e Na<sub>2</sub>K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,47 mM, pH 7.2), 4°C. O grau de pureza das proteínas foi determinado em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio e coloração com azul de comassie. A concentração de cada proteína purificada foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) modificado. Tal modificação consistiu em solubilizar as amostras de proteína utilizando hidróxido de sódio a 2 N e aquecer a 100° C, por 10 minutos, conforme método descrito por Waterborg, 2002. A avaliação da presença de endotoxinas nas amostras protéicas purificadas foi realizada utilizando o kit *Limulus Amebocyte Lysate*, QCL-1000 (Lonza), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para uso em imunização e em ensaio envolvendo cultivo celular, as suspensões de rLci2B-NH6 e rLci4A-NH6 purificadas foram esterilizadas por irradiação gama (60.000 rads sob o gelo, usando-se irradiador IBL 437C, CIS Bio International) e as suspensões de rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 purificadas foram esterilizadas por irradiação ultravioleta por um período de 30 minutos sob gelo, em uma cabine de fluxo laminar.

## **5.5 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR SDS-PAGE E/OU *Western Blot***

Para análise das amostras de proteína recombinante produzidas em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e/ou purificadas por cromatografia de afinidade por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western blot* foram o sistema de gradiente descontínuo com gel de separação a 10 ou 12 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970). Foram aplicadas e analisadas em gel de poliacrilamida lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com: a) *pRSET* sem inserto, b) *pRSET-Lci2B*, c) *pRSET-Lci2-NT-CT*, d) *pRSET-Lci2-NT-5R-CT*, e) *pRSET-Lci4A*, além das proteínas purificadas, f) rLci2B-NH6, g) rLci2-NT-CT-NH6, h) rLci2-NT-5R-CT-NH6, e i) rLci4A-NH6. Foram aplicadas em gel para análise por *Western blot*: a) lisado *E. coli*

BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET* sem inserto e, as proteínas purificadas, b) rLci2B-NH6, c) rLci2-NT-CT-NH6, d) rLci2-NT-5R-CT-NH6, e e) rLci4A-NH6.

Para a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana nitrocelulose para a realização do *Western blot* foi usado o método de transferência semi-seco em um aparelho *transblotter* da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A transferência foi realizada usando-se o tampão Tris a 24 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20 % (v/v), pH 8.3). Depois disso, a membrana foi lavada com água destilada e, para a visualização das proteínas e registro de pontos geográficos, foi feita a coloração com vermelho de Ponceau [Ponceau S a 0,1 % (m/v) e ácido acético a 5 % (m/v)]. Em seguida, o corante foi removido pela lavagem da membrana com água destilada. Os sítios de ligação de proteína na membrana foram bloqueados pela incubação a temperatura ambiente por 16 horas, a 4 °C, com solução contendo leite desnatado Itambé ou Molico a 5 % (m/v) em salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e Tween 20 a 0,05 % (v/v, TBS-T). A membrana foi então lavada 3 vezes com TBS-T e posicionada em um aparelho *blotter*, Immunitics, Modelo MN25 (Immunitics, Boston, USA). Cada uma das três raias da membrana de nitrocelulose impregnadas com uma das amostras protéicas foi incubada com 350 µL de: a) leite desnatado a 5% em TBS-T (TBS-T-L), b) soro de camundongo normal diluído de 1:500 em TBS-T-L ou c) anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina (Invitrogen) diluído 1:1.000 em TBS-T-L. A membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação suave. Após lavagem da membrana de 3 a 6 vezes com TBS-T, cada uma das raias foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação suave, com 350 µL de anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:500 em TBS-T-L. A membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS. Um volume de 10 mL de substrato para fosfatase alcalina [33 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma) a 50 mg/mL e 330 µL de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT, Sigma) a 10 mg/mL em 10 mL do tampão Tris a 100 mM, NaCl a 100 mM e MgCl<sub>2</sub> a 5 mM, pH 9,5) foi usado para a revelação de bandas de proteína detectadas pelos anticorpos por cerca de 5 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de água destilada.



## 5.6 OBTENÇÃO DE LISADO DE PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *Leishmania chagasi*

Para realização da estimulação de esplenócitos *in vitro* nos ensaios de linfoproliferação e indução da produção de citocinas, antígenos de *Leishmania chagasi* da cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 (BALEEIRO *et al.*, 2006) foram produzidos sob forma de lisado de promastigotas ou fração solúvel de amastigotas axênicas.

A cepa de *L. chagasi* MHOM/BR2000/Merivaldo2 vem sendo mantida no nosso Laboratório através de passagens sucessivas em hamsters ou em meio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Para a obtenção das formas promastigotas, um fragmento de baço de hamster infectado foi macerado e, em seguida, incubado em meio de cultura Schneider, pH 7.2, suplementado com 20 % de soro bovino fetal inativado (SBF, Gibco BRL Life Technologies, EUA). A suspensão contendo os parasitos foi incubada a 24° C até o início da fase de crescimento estacionária. Após cerca de 4 passagens, as formas promastigotas foram lavadas três vezes com cloreto de sódio a 0,9 % e centrifugadas a 1.200 x g, a 4 °C, por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em cloreto de sódio a 0,9 % e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

Para a obtenção das formas amastigotas, 5 X 10<sup>6</sup> promastigotas/mL foram colocados em um frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em um volume final de 50 mL de meio Schneider, pH 7,2; suplementado com 20 % SBF. Em seguida, as formas promastigotas foram incubadas a 35° C, por 13 dias para a transformação em amastigotas, conforme método descrito previamente (TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Para a obtenção de antígenos do lisado das formas promastigotas e fração solúvel das formas amastigotas axênicas, as respectivas suspensões de parasito em salina foram submetidas à lise por 5 ciclos descongelamento a 4 °C e congelamento em nitrogênio líquido a - 196 °C. A lise parasitária foi confirmada pela visualização em microscópio. O lisado de formas amastigotas axênicas foi submetido à centrifugação a 1.2000 x g, por 10 minutos, a 4° C e, depois disso, o sobrenadante foi coletado. A concentração protéica do lisado total das promastigotas e da fração solúvel das amastigotas axênicas foi determinada pelo método de LOWRY modificado. Para a esterilização, alíquotas do lisado ou fração solúvel foram submetidas à irradiação gama, conforme descrito previamente.

## **5.7 OBTENÇÃO DE OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS (ODN) 1826**

Para uso como adjuvante em imunização, oligonucleotídeos ricos em seqüências CpG (ODN 1826, 5'-CCATGACGTTTCCTGACGTT-3'), apropriadas para estimulação da resposta imune celular de camundongos, foram obtidas da Coley Pharmaceutical (Massachusetts, Estados Unidos) ou da Invitrogen. Uma alíquota do ODN 1826 foi usada para a determinação da concentração de LPS, conforme descrito anteriormente.

## **5.8 ANIMAIS**

Duzentos e dez camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ-Salvador-Bahia). Os animais foram alojados em caixas microisoladoras sob condições apropriadas de temperatura e umidade e receberam água e comida *ad libitum*. Os experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (protocolo CEUA L-IGM-008/09) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

## **5.9 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS**

Para imunização dos animais, cinco diferentes protocolos foram utilizados conforme esquematizado a seguir. Os camundongos foram divididos em grupos experimentais contendo 6 animais em cada um (protocolos 1, 2, 3 e 5) ou 12 animais em cada grupo (protocolo 4). Os grupos de camundongos foram imunizados ou imunizados e infectados conforme descrição esquemática a seguir.

**QUADRO 1 - Imunização de camundongos com rLci4A-NH6 isoladamente ou associada aos adjuvantes saponina ou ODN 1826 (n=6) – PROTOCOLO 1.**

<b>Grupos</b>	<b>1ª dose</b>	<b>2ª dose</b>	<b>3ª dose</b>
<b>G1</b>	PBS	PBS	PBS
<b>G2</b>	rLci4A-NH6	rLci4A-NH6	rLci4A-NH6
<b>G3</b>	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ saponina
<b>G4</b>	rLci4A-NH6/ ODN 1826	rLci4A-NH6/ ODN 1826	rLci4A-NH6/ ODN 1826

Doses e volumes de administração:

- PBS em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) / Saponina (100 µg) em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) / ODN1826 (10 µg) em 200 µL

**QUADRO 2 - Imunização de camundongos com rLci4A-NH6 isoladamente ou associada aos adjuvantes saponina, ODN 1826 ou plasmídeo codificando IL-12 murina (n=6) – PROCOLO 2.**

<b>Grupos</b>	<b>1ª dose</b>	<b>2ª dose</b>	<b>3ª dose</b>
<b>G1</b>	PBS	PBS	PBS
<b>G2</b>	rLci4A-NH6	rLci4A-NH6	rLci4A-NH6
<b>G3</b>	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ saponina
<b>G4</b>	rLci4A-NH6/ ODN 1826	rLci4A-NH6/ ODN 1826	rLci4A-NH6/ ODN 1826
<b>G5</b>	rLci4A-NH6 50 µg pIL-12	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ Saponina
<b>G6</b>	rLci4A-NH6 10 µg pIL-12	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ Saponina
<b>G7</b>	rLci4A-NH6 2 µg pIL-12	rLci4A-NH6/ Saponina	rLci4A-NH6/ Saponina

- PBS em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) / Saponina (100 µg) em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) / ODN1826 (10 µg) em 200 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (50 µg) em 50 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (10 µg) em 50 µL
- rLci4A-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (2 µg) em 50 µL

**QUADRO 3 - Imunização de camundongos com rLci2B-NH6 isoladamente ou associada aos adjuvantes saponina, ODN 1826 ou plasmídeo codificando IL-12 murina (n=6) - PROTOCOLO 3.**

<b>Grupos</b>	<b>1ª dose</b>	<b>2ª dose</b>	<b>3ª dose</b>
<b>G1</b>	PBS	PBS	PBS
<b>G2</b>	rLci2B-NH6	rLci2B-NH6	rLci2B-NH6
<b>G3</b>	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ saponina
<b>G4</b>	rLci2B-NH6/ ODN 1826	rLci2B-NH6/ ODN 1826	rLci2B-NH6/ ODN 1826
<b>G5</b>	rLci2B-NH6 50 µg pIL-12	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ Saponina
<b>G6</b>	rLci2B-NH6 10 µg pIL-12	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ Saponina
<b>G7</b>	rLci2B-NH6 2 µg pIL-12	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ Saponina

- PBS – 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) em 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) / Saponina (100 µg) em 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) / ODN1826 (10 µg) em 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (50 µg) em 50 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (10 µg) em 50 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) em 200 µL / pIL-12 (2 µg) em 50 µL

**QUADRO 4 – Imunização de camundongos com esquema de sensibilização com plasmídeo codificando rLci2B-NH6 e reforço com a proteína associada à saponina (n=12) - PROTOCOLO 4.**

<b>Grupos</b>	<b>1ª dose</b>	<b>2ª dose</b>	<b>3ª dose</b>
<b>G1</b>	PBS	PBS	PBS
<b>G2</b>	pBK-CMV vazio	pBK-CMV vazio	PBS
<b>G3</b>	rLci2B-NH6	rLci2B-NH6	rLci2B-NH6
<b>G4</b>	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ Saponina	rLci2B-NH6/ saponina
<b>G5</b>	pBK-CMV-Lci2B	pBK-CMV-Lci2B	pLci2B-NH6/ saponina

Quatro semanas após a terceira dose de imunização, os animais foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi*, por via intraperitoneal.

- PBS – 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) em 200 µL
- rLci2B-NH6 (100 µg) / Saponina (100 µg) em 200 µL
- pBK-CMV vazio (50 µg) em 70 µL
- pBK-CMV-Lci2B-NH6 (50 µg) em 70 µL

**QUADRO 5 - Imunização de camundongos com esquema de sensibilização com plasmídeo codificando as quimeras LAMP/Lci2-NT-5R-CT ou LAMP/Lci2-NT-CT e reforço com as respectivas proteínas associadas à saponina (n=6) - PROTOCOLO 5.**

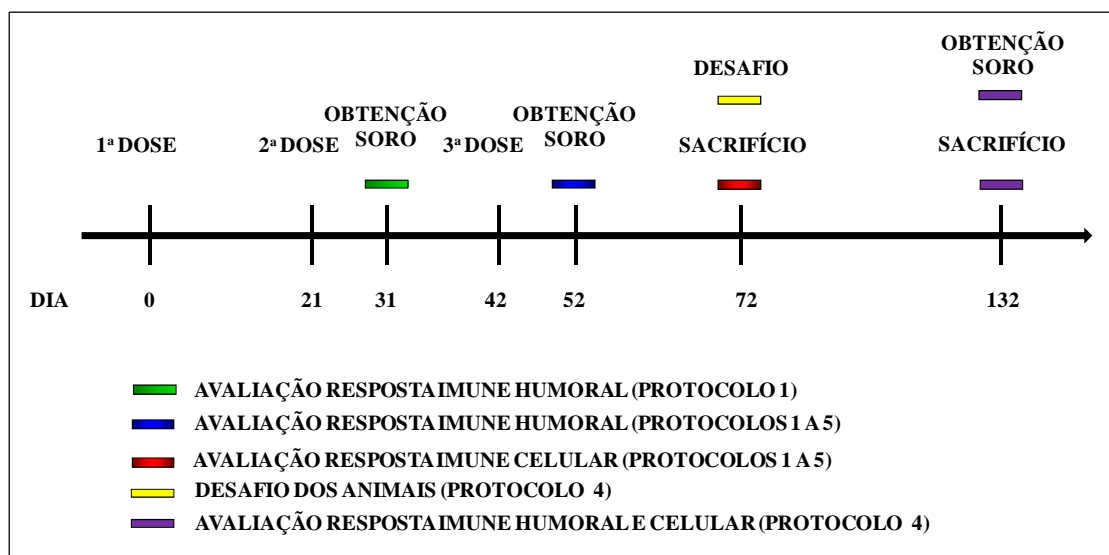
<b>Grupos</b>	<b>1ª dose</b>	<b>2ª dose</b>	<b>3ª dose</b>
<b>G1</b>	p43.2	p43.2	saponina
<b>G2</b>	p43.2-LAMP	p43.2-LAMP	saponina
<b>G3</b>	p43.2-Lci2-NT-5R-CT	p43.2-Lci2-NT-5R-CT	rLci2B-NT-5R-CT-NH6/ saponina
<b>G4</b>	p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP	p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP	rLci2B-NT-5R-CT-NH6/ saponina
<b>G5</b>	p43.2-Lci2-NT-CT	p43.2-Lci2-NT-CT	rLci2B-NT-CT-NH6/ saponina
<b>G6</b>	p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP	p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP	rLci2B-NT-CT-NH6/ saponina

- p43.2 vazio (50 µg) em 100 µL
- p43.2-LAMP vazio (50 µg) em 100 µL
- p43.2-Lci2-NT-5R-CT (50 µg) em 100 µL
- p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP (50 µg) em 100 µL
- p43.2-Lci2-NT-CT (50 µg) em 100 µL
- p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP (50 µg) em 100 µL
- rLci2-NT-5R-CT-NH6 (100 µg) /Saponina (100 µg) em 200 µL
- rLci2-NT-CT-NH6 (100 µg) / Saponina (100 µg) em 200 µL

Os camundongos usados nos 5 protocolos, foram injetados com proteína recombinante, associada ou não a adjuvantes, assim como PBS, por via subcutânea, na região dorsal. Os camundongos utilizados nos protocolos 2, 3 e 4 foram injetados com plasmídeo por via intramuscular, na região do quadríceps, seguido de eletroporação. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com 100 mg/kg de quetamina (Virbac do Brasil) e 15 mg/kg de xilazina (Bayer S.A.) por via intraperitoneal. Imediatamente após a injeção, foram aplicados cinco pulsos elétricos de 100 V/cm, com duração de 20 milissegundos por pulso e intervalo de um segundo entre cada dois pulsos consecutivos. O aparelho eletroporador foi confeccionado pelo Dr. Yuri Pepe do Departamento de Física da Universidade Federal da

Bahia. Camundongos usados no protocolo 5 foram injetados com plasmídeo por via subcutânea na região do dorso.

Os animais receberam 3 doses de injeções em cada um dos protocolos, sendo 21 dias o intervalo entre cada duas doses consecutivas. O cronograma da avaliação da resposta imune humoral e celular e/ou infecção dos animais foi mostrado esquematicamente na Figura 3.



**FIGURA 3. Desenho esquemático dos protocolos de imunização**

## 5.10 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Para a avaliação da concentração de anticorpos específicos, amostras de sangue foram coletadas 10 dias a terceira dose de imunização (protocolos 1 a 5) ou ainda 60 dias após a infecção dos animais (protocolo 4). As coletas foram realizadas pelo plexo orbital, mediante anestesia local prévia no olho com uma gota de cloridrato de proximetacaína a 0,5 % (Anestalcon, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, SP). Após a coagulação do sangue, alíquotas de soro foram obtidas pela centrifugação a 300 x g, por 5 minutos, e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

### 5.10.1 Avaliação da concentração anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A avaliação da concentração de anticorpos da classe IgG reativos a rLci4-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6, por ELISA, foi realizada



essencialmente conforme método descrito previamente (PINHEIRO, 2007). Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg/mL de rLci4-NH6 (protocolos 1 e 2), 2 µg/mL de rLci2B-NH6 (protocolos 3 e 4) ou 1 µg/mL de rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 (protocolo 5) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> a 15 mM e NaHCO<sub>3</sub> a 28 mM, pH 9.6), 100 µL/poço, por 16 horas, a 4°C. Após duas lavagens com PBS, os poços receberam 200 µL/poço de PBS-T (v/v, PBS-T, Sigma-Aldrich) contendo 10 % de leite desnatado (m/v, PBS-LT, Itambé). As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Uma amostra de soro de cada camundongo diluída em PBS-LT foi adicionada, 100 µL/poço. Para avaliação de anticorpos anti-rLci2B-NH6 foram usadas diluições seriadas quádruplas de 1:400 a 1:1.250.000 e anti-rLci4-NH6, anti-rLci2-NT-5R-CT-NH6 e anti-rLci2-NT-CT-NH6 foram usadas diluições seriadas quádruplas de 1:200 a 1: 204.800. Amostras de soros de camundongos submetidos à imunização em um experimento prévio foram usadas como controle positivo em cada placa. Após a incubação das placas por 1 hora das placas à temperatura ambiente, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T e anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos a 1:400 em PBS-LT, foram adicionados em um volume de 100 µL/poço. As placas foram incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T. O substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) em tampão acetato/citrato foi adicionado a 100 µL/poço [150 µL de TMB a 10mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma)], 2,91 mL de acetato de sódio 0,5 M (Sigma), 90 µL de ácido cítrico 0,5 M (Sigma), 12 mL de água destilada e 15 µL de peróxido de hidrogênio 30% P.A (Isifar, Duque de Caxias, Brasil). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 4 M (Quimex, São Paulo, Brasil). A leitura da densidade óptica foi realizada a 450 nm em um espectrofotômetro (Emax Precison Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

Para avaliação da concentração de IgG2a e IgG1 reativos aos antígenos recombinantes, inicialmente, uma mistura de quantidades iguais de soro de cada animal do mesmo grupo foi usada para uma titulação. Depois disso, foi escolhida uma diluição de soro a ser avaliada. Os ensaios foram realizados, essencialmente, conforme descrição acima. Depois da sensibilização com os antígenos recombinantes, o bloqueio dos sítios de ligação de proteína foi feito pela adição de 200 µL/poço de PBS-T com 10% (v/v) de soro bovino fetal (PBS-TS, CULTILAB). Após incubação por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, os poços foram lavados 4 vezes. As amostras de soro foram diluídas em PBS-TS e aplicadas em duplicata, em um volume de 100 µL/poço nas seguintes diluições: 1:50.000 (animais injetados

com rLci4A-NH6, protocolo 1), 1:102.400 (animais injetados com rLci4A-NH6, protocolo 2), 1:50.000 (animais injetados com rLci2B-NH6, protocolo 3), 1:10.000 (animais injetados com rLci2B DNA/proteína, protocolo 4), 1:51.200 ou 1:3.200 (animais injetados com Lci2-NT-5R-CT/LAMP ou Lci2-NT-CT/LAMP DNA/proteína, respectivamente, protocolo 5). Os poços foram novamente lavados 4 vezes com PBS-T e anticorpos de rato anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugados a biotina (Sigma-Aldrich), diluídos a 1:500 em PBS-TS, foram adicionados, 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente. Avidina conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluída 1:400 em PBS-TS, foi acrescentada, em um volume de 100 µL/poço, após lavagem dos poços 6 vezes com PBS-T. As placas foram incubadas por 45 minutos, à temperatura ambiente e, aos poços lavados 8 vezes com PBS-T foram acrescentados 100 µL de substrato de peroxidase. O substrato foi preparado pela mistura de 1 mL de TMB a 1 mg/mL em DMSO, 9 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5.0 [Fosfato de sódio dibásico 0,2 M (Isofar), ácido cítrico 0,1 M (Sigma-Aldrich)] e 2 µL de peróxido de hidrogênio 30% P.A (Isofar). As placas foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido fosfórico (Quimex, São Paulo, Brasil), diluído a 1:20 (v/v). A leitura da densidade óptica foi realizada conforme descrição acima.

### **5.11 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR**

Para avaliação da proliferação celular e produção de citocinas, os camundongos foram sacrificados 4 semanas após a última dose de imunização (protocolos 1 a 5) ou 8 semanas após infecção com *L. chagasi* (protocolo 4). Após o sacrifício dos camundongos, o baço de cada animal foi removido assepticamente e colocado em placa de petri de 35 mm. Com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 3 mL, cada baço foi macerado, separadamente, em meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640; Sigma-Aldrich). Em seguida, as células esplênicas foram transferidas para um tubo não aderente de 15 mL e meio RPMI foi adicionado para formar um volume final de 10 mL. Os tubos foram centrifugados a 100 g, por 1 minuto, para remoção de debris de tecido esplênico e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Os tubos foram centrifugados a 500 g, por 10 minutos, a 4 °C. Cada sedimento obtido foi ressuspensão com 2 mL meio RPMI suplementado com 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen Corporation), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Nova Farma Ltda., Anápolis, GO, Brasil), aqui denominado meio RPMI

completo. A concentração celular foi determinada, através de contagem em câmara de Neubauer, fazendo-se uma diluição das células 1:10 em meio RPMI e, a partir dessa diluição, 1:2 em corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich). A concentração celular obtida do baço de cada animal foi ajustada para  $3 \times 10^6$  células/mL.

### 5.11.1 Ensaio de linfoproliferação

Após a obtenção de suspensão de células isoladas de esplenócitos, um volume de em 100  $\mu$ L contendo  $3 \times 10^5$  células por poço foram colocados em cada poço de de placas de microtitulação de 96 poços (Corning Incorporated). Em triplicatas foram acionados 100  $\mu$ L/poço de meio RMPI completo ou 100  $\mu$ L/poço de concanavalina A (Con A; Sigma-Aldrich) a 0,8 ou 2,5  $\mu$ g/mL, lisado protéico de promastigotas de *L. chagasi* a 10  $\mu$ g/mL (protocolos 1 a 4) ou antígeno solúvel de amastigotas axênicas a 10  $\mu$ g/mL (protocolo 5), ou ainda, rLci4-NH6 (protocolos 1 e 2), rLci2B-NH6 (protocolos 3 e 4) ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 (protocolo 5), a 10  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Placas com células cultivadas apenas com meio RMPI 1640 completo e Con A ou cultivadas com meio RPMI 1640 completo, lisado de promastigota, fração solúvel de amastigota axênicas, rLci4-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6, foram incubadas por 3 e 5 dias, respectivamente. Dezoito horas antes da interrupção da incubação, um volume de 30  $\mu$ L de RPMI completo contendo 1  $\mu$ Ci de timidina[H]<sup>3+</sup> (Amersham Biosciences) foi acrescentado em poço. As placas foram congeladas a -20 °C até o momento da coleta das células em membrana de vidro. A contagem de partículas betas por minuto (cpm) de cada replica foi realizada em um aparelho *Plate Chamaleon*, HIDEX, (Turku, Finlândia).

### 5.11.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5) por esplenócitos através do método ELISA

A mensuração da concentração de citocinas (IFN-gama e IL-5) em sobrenadantes de esplenócitos estimulados *in vitro* com Con A, antígenos do lisado de promastigotas ou fração solúvel de amastigotas axênicas ou antígenos recombinantes foi realizada por ELISA de captura usando-se reagentes da Pharmingen (BD Pharmingen, San Jose, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante.

Um volume de 300  $\mu\text{L}$ , contendo  $9 \times 10^5$  esplenócitos em suspensão de cada camundongo, foi colocado por poço de uma placa de microtitulação de 24 poços (Costar Corning Inc.). Em seguida, foram acrescentados aos poços apropriados, um volume de 300  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 completo ou contendo Con A (a 1,6 ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), antígenos do lisado de promastigotas (a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , protocolos 1 a 4), antígenos da fração solúvel de amastigotas axênicas (a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , protocolo 5), ou ainda, antígenos recombinantes rLci4-NH6 (protocolos 1 e 2), rLci2B-NH6 (protocolos 3 e 4), rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 (protocolo 5) a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas foram incubadas por 48 h em atmosfera úmida de  $\text{CO}_2$  a 5 % e, em seguida, cada sobrenadante de cultivo foi coletado, centrifugado a 300 x g, por 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ , até o momento do uso.

Para a determinação da concentração das citocinas (IL-5 e IFN- $\gamma$ ) placas de microtitulação de 96 poços (“High Binding”; Corning Incorporated Life Sciences) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de rato (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) anti-IFN- $\gamma$  ou anti-IL-5 murino, em um volume de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ , e foram incubadas durante 16 h, em câmara úmida, a  $4^\circ\text{C}$ . Os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados com 200  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de PBS contendo 10% de soro bovino fetal (CULTILAB) e as placas foram incubadas por 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Para a elaboração de uma curva de calibração, diluições seriadas duplas de IFN- $\gamma$  murino [sobrenadante de células COS-7 (American Type Culture Collection – ATCC; Manassas, VA, EUA) transfectadas com pRSV2-IFN- $\gamma$  com concentração conhecida de IFN- $\gamma$  murino] ou IL-5 recombinante (BD Pharmigen)] foram usadas em duplicatas de poços, 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As amostras de sobrenadante do cultivo celular foram diluídas quando necessário e testadas em duplicata de poços, 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As placas foram incubadas por 4 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente e, após isso, os poços foram lavados 4 vezes com PBS-T. Anticorpos de rato conjugados com biotina específicos para cada uma das citocinas foram utilizados na concentração de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em um volume de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As placas foram incubadas por 45 minutos, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Após 6 vezes lavagens dos poços com PBS-T, avidina conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluída 1:400, foi adicionada em um volume de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As placas foram incubadas por mais 30 minutos. Os poços foram lavados 8 vezes com PBS-T e a reação foi revelada pela adição de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  do substrato de peroxidase (TMB em de tampão citrato-fosfato) conforme previamente descrito. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 4 M. A leitura da densidade óptica a 450 nm foi feita conforme descrito anteriormente.

## 5.12 INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM *Leishmania chagasi* E DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA NO BAÇO

Previamente em nosso Laboratório, camundongos imunizados usando-se o protocolo 4 (injetados duas vezes com *pBK-CMV-Lci2B-NH6* e receberam reforço com rLci2B-NH6 associada à saponina) apresentaram resposta imune predominantemente do tipo Th1 (PINHEIRO, C.G.M *et al.* manuscrito em preparação). Para avaliar se esse protocolo promovia proteção contra a infecção por *L. chagasi*, no presente trabalho, seis dos dozes animais de cada grupo experimental do protocolo 4 foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas/300  $\mu$ L, por via intraperitoneal, 30 dias após a última dose de imunização.

A carga parasitária do baço de cada animal foi determinada pelo método da diluição limitante descrito previamente (BUFFET *et al.*, 1995). Resumidamente, o baço de cada animal foi removido assepticamente, como descrito no item 4.11 e um fragmento do baço foi removido e pesado. O fragmento foi macerado em meio de cultura Schneider suplementado com 20% de SBF (Schneider suplementado) a concentração foi ajustada para gerar uma suspensão de tecido esplênico a 1 mg/mL. Em placas de microtitulação de 96 poços, 12 diluições seriadas triplas foram feitas com a suspensão celular do baço de cada animal. As placas foram incubadas a 24°C, por 14 dias. A leitura das placas quanto a presença ou ausência de *Leishmania* foi avaliada a partir de observações realizadas 7 e 14 dias após o início da incubação. Para cada um de três poços da triplicata de cada animal, foi determinada a última diluição onde foi possível visualizar pelo menos uma *Leishmania* e, em seguida, calculou-se a média geométrica dos três títulos obtidos, assim como o número de parasitos por miligrama de baço. Para o cálculo da carga parasitária total, o título obtido foi multiplicado pelo peso do baço de cada animal.

## 5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita através do teste paramétrico de análise de variância ANOVA. Quando houve diferença nesse teste, comparações adicionais entre cada dois grupos foram realizadas pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. O valor fixado para significância estatística para todos os testes utilizados foi de  $p < 0,05$ .

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rLci4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 E DOS PLASMÍDEOS PARA IMUNIZAÇÃO E/OU AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

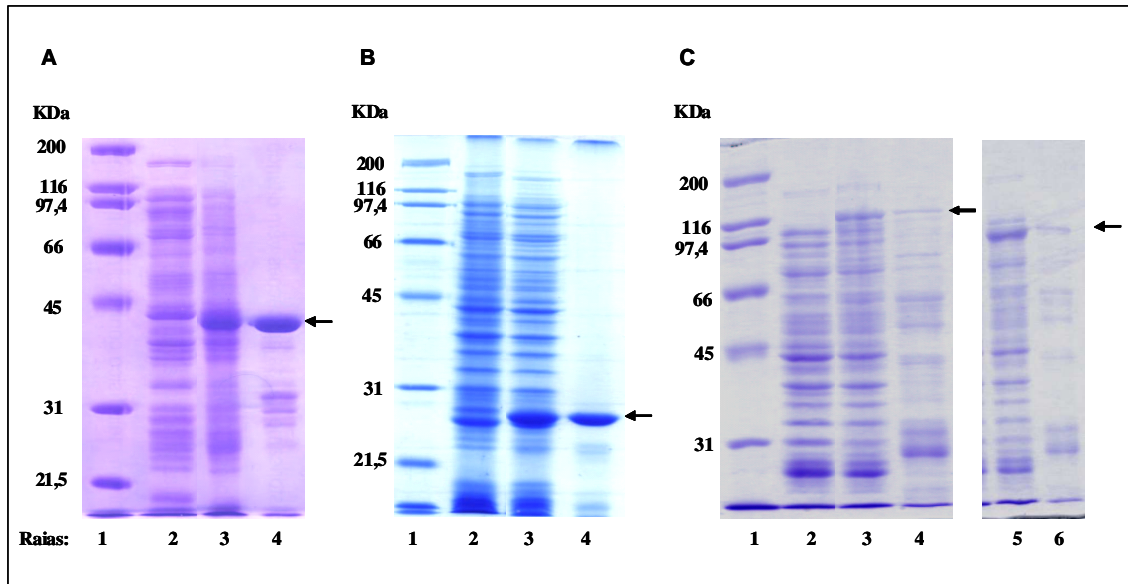
Os antígenos recombinantes rLci4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6, produzidos na forma solúvel (rLci2B-NH6) ou como corpúsculo de inclusão (rLci4A-NH6, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6) em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com as construções plasmídeais em plasmídeo *pRSET*, foram purificados por cromatografia de afinidade com coluna de sefarose-níquel. No processo de purificação, um tampão contendo triton X-100 foi utilizado para remoção de endotoxinas. O rendimento das proteínas purificadas, determinado pelo método de Lowry modificado, mostrou que para cada litro de cultura bacteriana foram obtidos: 1,96 mg, 3 mg, 1,06 mg e 2,8 mg de rLci4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente.

A análise das proteínas recombinantes purificadas, realizada por SDS-PAGE, mostrou que rLci4A-NH6 (28 kDa, Figura 4 A) e rLci2B-NH6 (39 kDa, Figura 4 B) estavam essencialmente integras, com somente poucas bandas polipeptídicas adicionais de fraca intensidade, geralmente com menor mobilidade relativa.

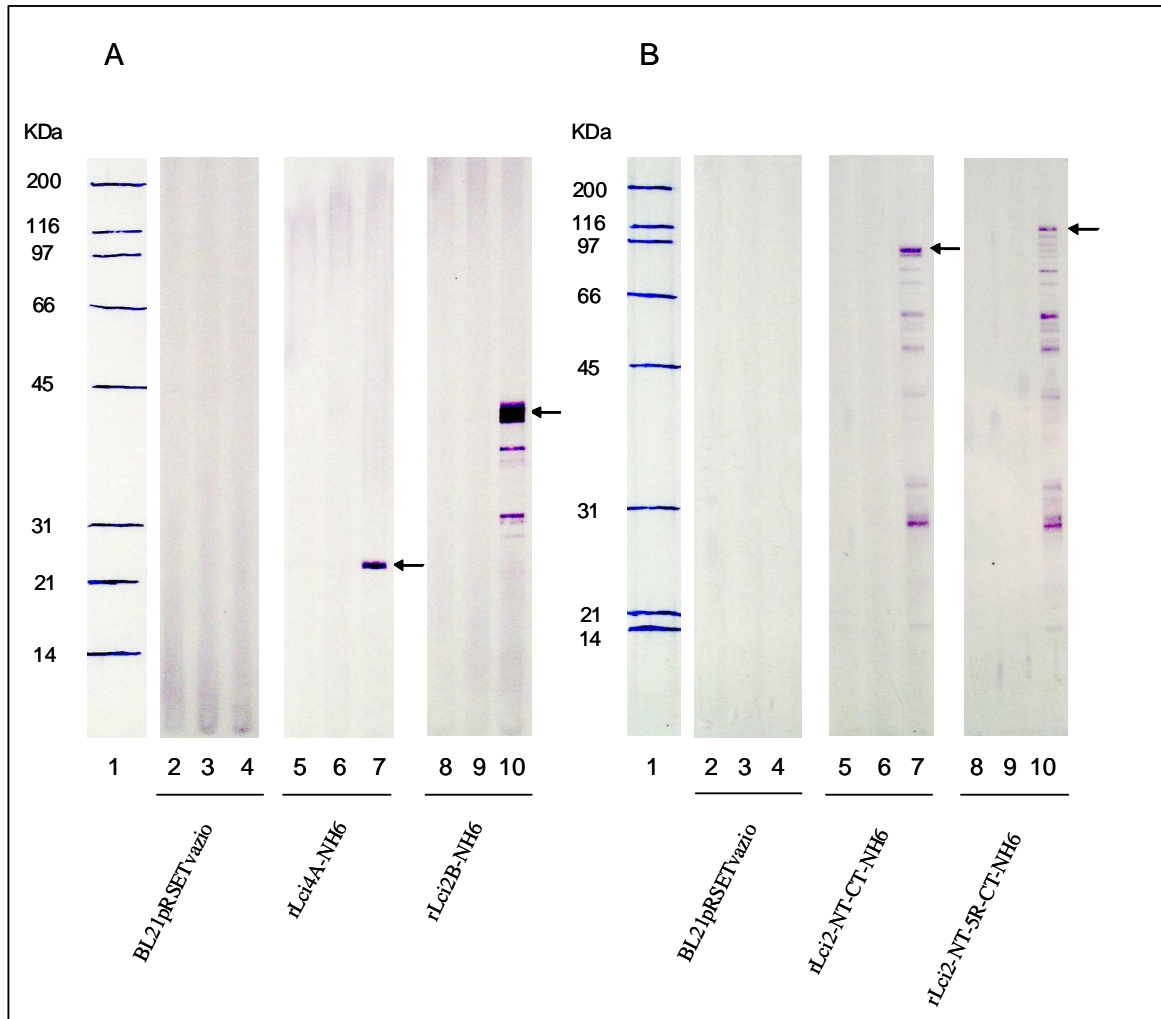
Já a análise das proteínas rLci2-NT-CT-NH6 (96 kDa, Figura 4 C) e rLci2-NT-5R-CT-NH6 (116 kDa, Figura 4 C) purificadas revelou bandas de intensidade fraca compatíveis com as proteínas íntegras e, além disso, várias outras bandas polipeptídicas, por vezes intensas e com menor mobilidade relativa. Como no lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS-*pRSET-Lci2-NT-CT* ou BL21(DE3)pLysS-*pRSET-Lci2-NT-5R-CT*, obtido após 3 h da indução da proteína recombinante por IPTG, observam-se bandas de forte intensidade com 96 kDa e 116 kDa compatíveis com rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 íntegras, respectivamente, ausentes no lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS-*pRSET* sem inserto (Figura 4 C), provavelmente, outras bandas além de 96 kDa e 116 kDa representam produtos de degradação gerados durante o processo de purificação das proteínas recombinantes.

A análise realizada por *Western blot*, usando-se anticorpo anti-histidina, confirmou que as bandas 28, 39, 96 e 116 kDa observadas por SDS-PAGE correspondiam as proteínas recombinantes purificadas rLci4A-NH6, rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente (Figura 5). Além disso, a análise também mostrou que

praticamente todas as bandas com mobilidade relativa menor, detectadas com anticorpos anti-histidina, correspondem a produto de degradação das proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* BL21(DE3)pLysS, sendo observado mais intensamente nas proteínas rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 (Figura 5 B)



**Figura 4. Avaliação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade.** Em (A), marcador de peso molecular (raia 1), lisado de Bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET* sem inserto 3 horas após indução com IPTG (raia 2), lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET-Lci4A* 3 horas após indução com IPTG (raia 2) e rLci4A-NH6 purificada por cromatografia de afinidade (raia 3); (B) marcador de peso molecular (raia 1), lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET* sem inserto 3 horas após indução com IPTG (raia 2), lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET-Lci2B* 3 horas após indução com IPTG (raia 2) e rLci2B-NH6 purificada (raia 3); (C) lisado de Bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET* sem inserto 3 horas após indução com IPTG (raia 2), lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET-Lci2-NT-CT* 3 horas após a indução com IPTG (raia 2), rLci2-NT-CT-NH6 purificada (raia 3), lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com *pRSET-Lci2-NT-5R-CT* 3 horas após a indução com IPTG (raia 4), rLci2-NT-5R-CT-NH6 purificada (raia 5). As setas indicam bandas íntegras das proteínas purificadas.



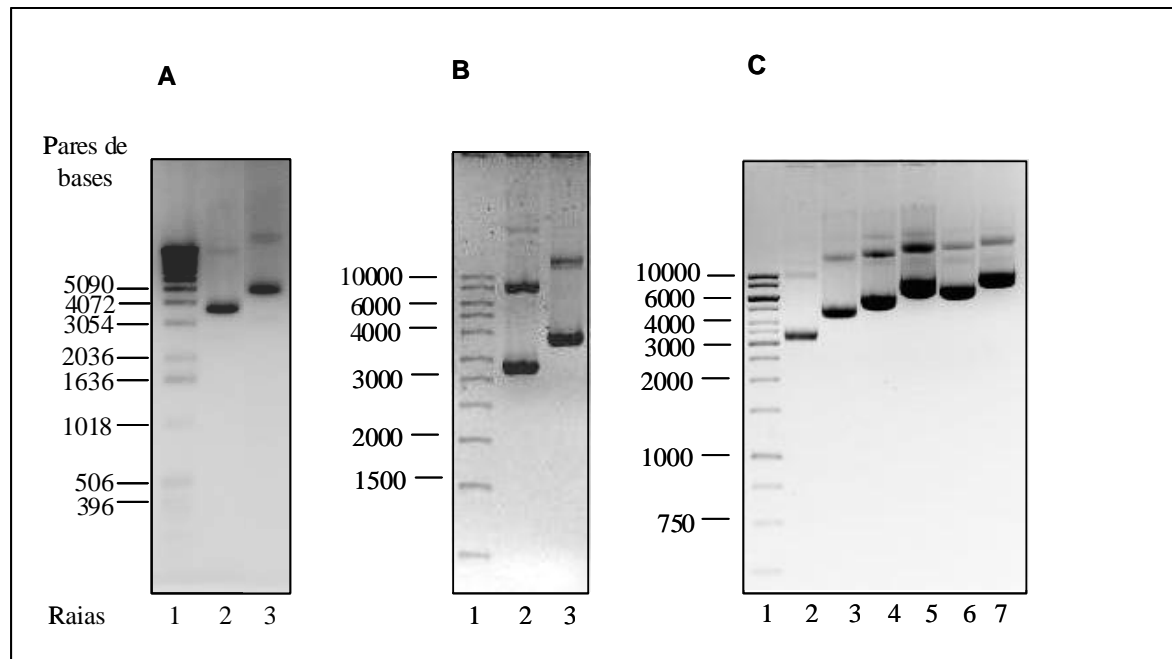
**Figura 5. Detecção por *western blot* das proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade.** Em (A), marcador de peso molecular (raia 1), rLci4A-NH6 (raias 5, 6 e 7) e rLci2B-NH6 (raias 8, 9 e 10) purificadas; (B), marcador de peso molecular (raia 1), rLci2-NT-CT-NH6 (raias 5, 6 e 7) e rLci2-NT-5R-CT-NH6 (raias 8, 9 e 10) foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 12 (A) ou 10% (B), respectivamente. As amostras de BL21(DE3)pLysS-*pRSET* sem inserto, obtidas após 3 h de indução com IPTG, foram utilizadas nas raia 2, 3 e 4, nos dois géis, como controle negativo. As proteínas fracionadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As raia 2, 5 e 8 foram incubadas com diluente (TBS-T-L); as 3, 6 e 9 com soro de camundongo sadio na diluição 1:500 e as 4, 7 e 10 com anticorpo anti-histidina na diluição de 1:1000. Em seguida, as raia foram incubadas com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:500. A revelação foi feita pela adição do substrato contendo BCIP e NBT, conforme descrito em material e métodos. As setas indicam bandas intactas das proteínas recombinantes.



Os plasmídeos utilizados nos protocolos de imunização foram produzidos em *E. coli* TOP10 transformadas pelas construções plasmideais (pcDNA3.1-scmu-IL-12, pcDNA3.1-sem inserto, pBK-CMV-Lci2B, pBK-CMV-sem inserto, *p43.2-Lci2-NT-CT*, *p43.2-Lci2-NT-5R-CT*, *p43.2-LAMP-Lci2-NT-CT*, *p43.2-LAMP-Lci2-NT-5R-CT* *p43.2-sem inserto* e *p43.2-LAMP*) e purificados usando-se reagentes de um conjunto da QIAGEN. O rendimento de plasmídeo variou de 1,53 a 3,2 mg por 500 mL de cultura de *E. coli* TOP10. A avaliação do grau de pureza determinada pela relação entre a leitura óptica a 260/280 nm mostrou valor superior a 1.8, indicando que cada preparação plasmideal exibia um nível muito baixo de contaminação de proteínas. A avaliação de alíquotas das preparações plasmideais através de eletroforese em gel de agarose revelou um bom grau de integridade e de pureza das moléculas de DNA plasmideal purificadas. Cada uma das preparações apresentou bandas que correspondem à molécula de DNA plasmideal superespiralada, sendo essas bandas as mais baixas e intensas nos géis (Figura 6). Além disso, foram observadas bandas que devem corresponder a concatâmeros de plasmídeo.

A determinação da concentração de LPS foi realizada em amostras das proteínas recombinantes, das preparações plasmideais e do ODN 1826 para examinar a qualidade das soluções ou suspensões administradas nos animais e/ou usadas na avaliação das respostas imunes. A concentração de LPS variou de 1,97 EU/mL ( $\approx$  3,55 ng/mL) a 31,54 EU/mL ( $\approx$  56,77 ng/mL), 0,7 EU/mL (1,26 ng/mL) a 88,1 EU/mL (158,58 ng/mL) e 12,6 EU/mL (22,68 ng/mL), para as proteínas recombinantes, preparações plasmideais e ODN 1826, respectivamente.

Considerando-se as diferentes combinações administradas nos camundongos, nos 5 protocolos utilizados, como: apenas proteína, proteína e plasmídeo, proteína e adjuvante ou plasmídeo, proteína e adjuvante, a quantidade máxima de endotoxina injetada foi de 13,4 ng de LPS por animal/dose.



**Figura 6. Avaliação da integridade e pureza dos plasmídeos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.** Os plasmídeos foram produzidos em *E. coli* TOP10 transformadas com cada construção plasmideal e purificados por cromatografia de troca iônica com reagentes e materiais da Qiagen, conforme descrito em material e métodos. Marcador de peso molecular (A, B e C, na raia 1), *pcDNA3.1A* ou *pcDNA3.1A-scmuIL-12* (A, raias 2 e 3), *pBK-CMV* ou *pBK-CMV-Lci2B-NH6* (B, raias 2 e 3), *p43.2*, *p43.2-LAMP*, *p43.2-Lci2-NT-CT*, *p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP*, *p43.2-Lci2-NT-5R-CT* ou *p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP* (C, raias 2 a 7).

## **6.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS INJETADOS COM rLci4A-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA, ODN1826 OU pcDNA3.1-scmu-IL-12 (PROTOCOLOS 1 E 2)**

Visando avaliar a imunogenicidade do antígeno recombinante rLci4A-NH6 e o perfil de resposta imune induzido (Th1 ou Th2), dois experimentos foram realizados.

A análise da concentração de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2a reativos a rLci4A-NH6 foi realizada por ELISA em amostras de soro obtidas 10 dias após a terceira dose de imunização, enquanto que, a resposta proliferativa de esplenócitos e produção de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-5), após estimulação *in vitro* com rLci4A-NH6 (10  $\mu$ g/mL), antígenos do lisado de formas promastigotas de *L. chagasi* (10  $\mu$ g/mL) ou Con A (0,8  $\mu$ g/mL), foram avaliadas 4 semanas depois da terceira dose de imunização.

### **6.2.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DOS ANIMAIS DO PROTOCOLO 1**

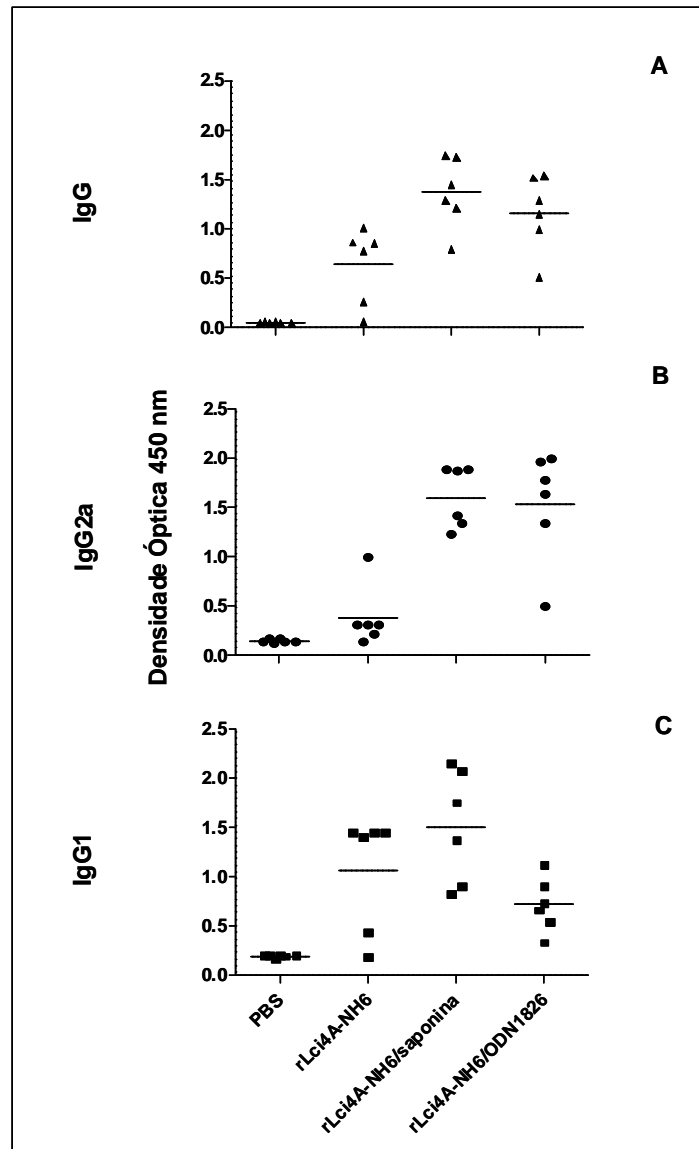
No primeiro experimento, camundongos BALB/c foram injetados 3 vezes, por via subcutânea, com PBS (G1), rLci4A-NH6 (G2), rLci4A-NH6/saponina (G3) e rLci4A-NH6/ODN1826 (G4).

#### **6.2.1.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a reativos a rLci4A-NH6**

Os valores de densidade óptica, obtidos nos ensaios imunoenzimáticos em amostras de soro diluídas de 1:12.800 (IgG) ou 1:102.400 (IgG1 e IgG2a), estão representadas na Figura 7.

Em relação à produção de IgG, todos os grupos de animais que receberam rLci4A-NH6 (G2, G3 e G4) produziram IgG antígeno-específico. Os valores de média  $\pm$  desvio padrão ( $X \pm SD$ ) da densidade óptica encontrada nos grupos foram: G1 (0,04  $\pm$  0,00), G2 (0,63  $\pm$  0,38), G3 (1,37  $\pm$  0,36) e G4 (1,16  $\pm$  0,38). A comparação entre as médias, realizada por ANOVA, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Comparações adicionais, realizadas através do pós-teste de Bonferroni, entre cada dois grupos selecionados, revelou que os grupos G2, G3 e G4 apresentaram maiores concentrações de IgG do que o grupo controle G1 (Figura 7 A). Além disso, o grupo G3, que recebeu saponina como adjuvante, apresentou uma maior concentração de IgG em relação ao grupo G2, no qual o antígeno foi usado isoladamente.

Na análise de anticorpos das subclasses de imunoglobulinas IgG2a e IgG1 reativas a rLci4A-NH6, também observou-se produção dessas duas subclasses de anticorpos pelos grupos G2, G3 e G4. Os valores de  $X \pm SD$  encontrados foram: G1 ( $0,15 \pm 0,02$  e  $0,19 \pm 0,01$ ), G2 ( $0,38 \pm 0,31$  e  $1,06 \pm 0,59$ ), G3 ( $1,61 \pm 0,31$  e  $1,51 \pm 0,57$ ) e G4 ( $1,53 \pm 0,56$  e  $0,71 \pm 0,28$ ) para IgG2a e IgG1, respectivamente. A análise estatística dos dados, por ANOVA, mostrou diferença significativa entre os grupos tanto para IgG2a quanto para IgG1 ( $p < 0,001$ ). As comparações entre cada dois grupos, pelo pós-teste de Bonferroni, mostraram maiores concentrações de IgG2a apenas nos grupos em que foram utilizados algum adjuvante G3 e G4 em relação ao grupo controle G1 (Figura 7 B). Além disso, esses mesmos grupos apresentaram concentrações maiores de IgG2a do que o grupo que recebeu o antígeno isoladamente (G2). Já em relação a IgG1, a concentração dessa subclasse de anticorpo foi maior nos grupos G2 e G3 em relação ao G1 (Figura 7 C). Os valores de média da proporção IgG2a/IgG1 obtidos nos grupos testes G2, G3 e G4 foram 0,46, 1,22 e 2,4, respectivamente, mostrando que a associação da saponina e ODN 1826 modificaram o perfil de produção dessas imunoglobulinas.



**Figura 7. Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci4A-NH6.** Grupos de camundongos BALB/c ( $n=6$ ) foram injetados 3 vezes com PBS (G1), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 (G2), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 100  $\mu\text{g}$  saponina (G3), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 10  $\mu\text{g}$  ODN1826 (G4), por via subcutânea, em intervalos de 21. Amostra de soro de cada animal, obtida 10 dias após a terceira dose de injeção, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:12.800 (IgG, em A) ou 102.400 (IgG2a e IgG1, em B e C, respectivamente), conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de densidade óptica e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A ( $G1 < G2 < G3 = G4$ ), B ( $G1 = G2 < G3 = G4$ ) e C ( $G1 = G4 < G2 = G3$ ).

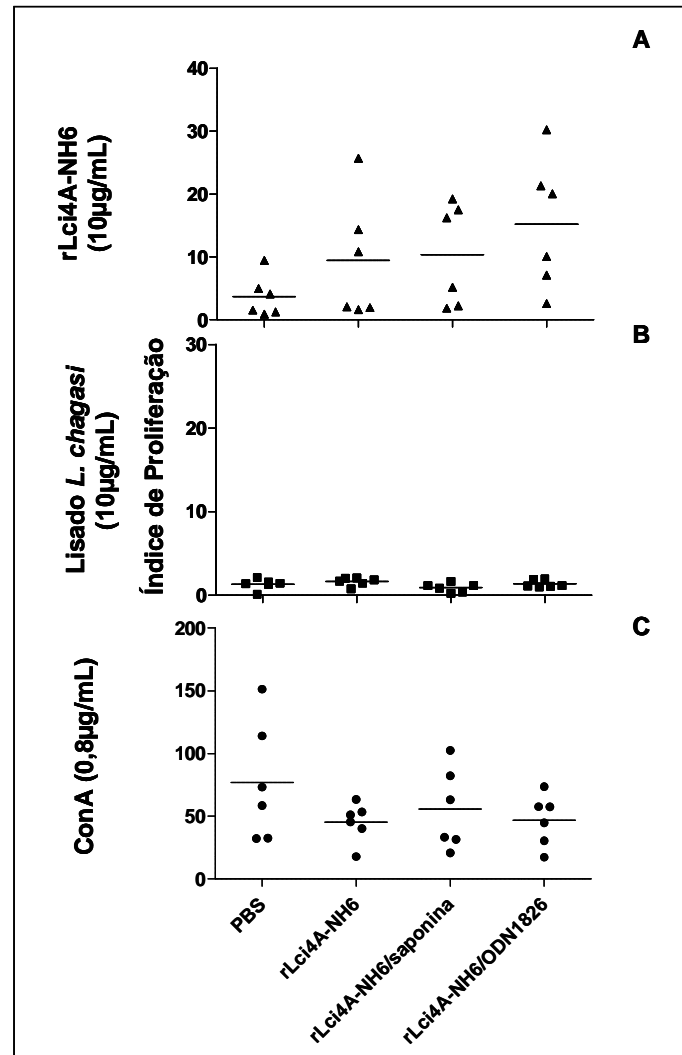
### 6.2.1.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos

Os valores encontrados de índice de proliferação (IP; razão entre os valores de cpm obtidos pelo cultivo na presença de antígenos de *Leishmania* ou Con A e os valores de cpm obtidos na ausência dos antígenos ou do mitógeno) estão representados na Figura 8.

No cultivo das células na presença de rLci4A-NH6, os valores de  $X \pm SD$  encontrados foram: G1 ( $3,70 \pm 3,27$ ), G2 ( $9,42 \pm 9,61$ ), G3 ( $10,37 \pm 8,12$ ) e G4 ( $15,22 \pm 10,36$ ). Apesar de ter sido observada uma grande variação nos valores individuais de IP em um mesmo grupo experimental (Figura 8 B), esplenócitos de camundongos do grupo rLci4A-NH6/ODN1826 (G4) apresentaram uma tendência a aumento de proliferação celular, com valor de média de IP 4 vezes maior do que a encontrada no grupo de animais que recebeu PBS (G1). No entanto, a análise estatística, por ANOVA, não revelou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Em relação à resposta proliferativa dos esplenócitos cultivados na presença de lisado de promastigota de *L. chagasi*, não foi observada proliferação celular dos animais nos 4 grupos (Figura 8B).

O uso do mitógeno concanavalina A induziu a proliferação celular em todos os grupos de animais, porém os valores individuais de IP foram muito variáveis (Figuras 8C). Os valores de  $X \pm SD$  obtidos foram: G1 ( $77,02 \pm 47,37$ ), G2 ( $45,24 \pm 15,48$ ), G3 ( $55,60 \pm 32,39$ ) e G4 ( $46,89 \pm 20,40$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 8. Avaliação da resposta proliferativa de splenócitos estimulados *in vitro* com rLci4A-NH6, lisado de *L. chagasi* ou Con A.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados três vezes com salina PBS (G1), 100 µg rLci4A-NH6 (G2), 100 µg rLci4A-NH6 / 100 µg saponina (G3), 100 µg rLci4A-NH6 / 10 µg ODN1826 (G4). Os splenócitos ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci4A-NH6 a 10 µg/mL (Figura A) ou lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL (Figura B) ou por 3 dias na presença de Con A a 0,8 µg/mL (Figuras C) e pulsados com 1 µCi de timidina [ $^3$ H]. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0.05$ .

### 6.2.1.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-5)

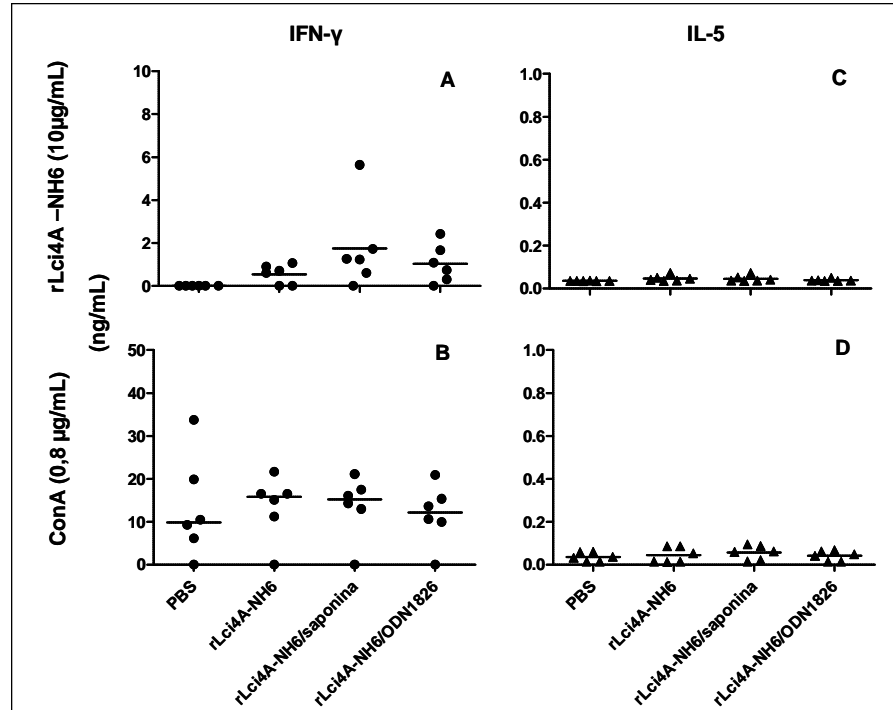
A produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 foi avaliada, por ELISA de captura, em amostras individuais de sobrenadantes obtidas a partir do cultivo dos esplenócitos conforme mencionado anteriormente. O valor mínimo de detecção do ensaio para IFN- $\gamma$  e IL-5 foi de 0,234 ng/mL e 0,062 ng/mL, respectivamente.

A concentração de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de esplenócitos cultivados na presença de rLci4A-NH6 ou Con A variou de indivíduo para indivíduo em um mesmo grupo, com exceção de sobrenadantes de esplenócitos cultivados com rLci4A-NH6 do grupo injetado com PBS, no qual não houve detecção dessa citocina (Figura 9 A e B). Os valores de  $X \pm SD$  encontrados nos grupos G2, G3 e G4 quando as células foram estimuladas com rLci4A-NH6 foram, em ng/mL, de  $0,54 \pm 0,45$ ;  $1,74 \pm 1,99$ ;  $1,03 \pm 0,89$ , respectivamente. Embora tenha sido observada uma tendência à produção de IFN- $\gamma$  por parte dos animais imunizados com rLci4A-NH6 em combinação ou não com adjuvantes, a comparação estatística não revelou diferença entre os grupos (ANOVA  $p > 0,05$ , Figura 9 A). Já no cultivo na presença de Con A, observou-se uma maior variação nos valores individuais nos grupos G1, G2, G3 e G4, sendo os valores encontrados, em ng/mL, iguais a  $13,25 \pm 11,94$ ;  $13,50 \pm 7,41$ ;  $13,65 \pm 7,25$  e  $11,74 \pm 6,97$ , respectivamente. A análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ , Figura 9 B).

Em relação à concentração de IL-5, os valores encontrados foram muito baixos quando as células foram cultivadas com rLci4A-NH6 ou Con A e não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 9 C e D)

No sobrenadante das células esplênicas cultivadas na presença apenas de meio de cultura ou de lisado protéico de promastigotas de *L. chagasi* não houve produção detectável pelo ensaio de ambas citocinas (dados não mostrados).





**Figura 9. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci4A-NH6 ou Con A.** Grupos de camundongos BALB/c ( $n=6$ ) foram injetados três vezes com PBS (G1), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 (G2), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 100  $\mu\text{g}$  saponina (G3) ou 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 10  $\mu\text{g}$  ODN1826 (G4), por via subcutânea. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci4A-NH6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A e C) ou Con A a 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtido após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto a presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA,  $p>0.05$ .

## 6.2.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DOS ANIMAIS DO PROTOCOLO 2

No segundo experimento, camundongos BALB/c foram injetados 3 vezes, com PBS (G1), rLci4A-NH6 (G2), rLci4A-NH6/saponina (G3), rLci4A-NH6/ODN1826 (G4), rLci4A-NH6/50  $\mu$ g (G5), 10  $\mu$ g (G6) ou 2  $\mu$ g (G7) do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 (aqui denominado de pIL-12). Os grupos G1 ao G4 foram injetados pela via subcutânea, enquanto que os plasmídeos foram administrados pela via intramuscular com eletroporação. Nas segunda e terceira doses, os animais dos grupos G5 ao G7 receberam rLci4A associada à saponina.

### 6.2.2.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci4A-NH6

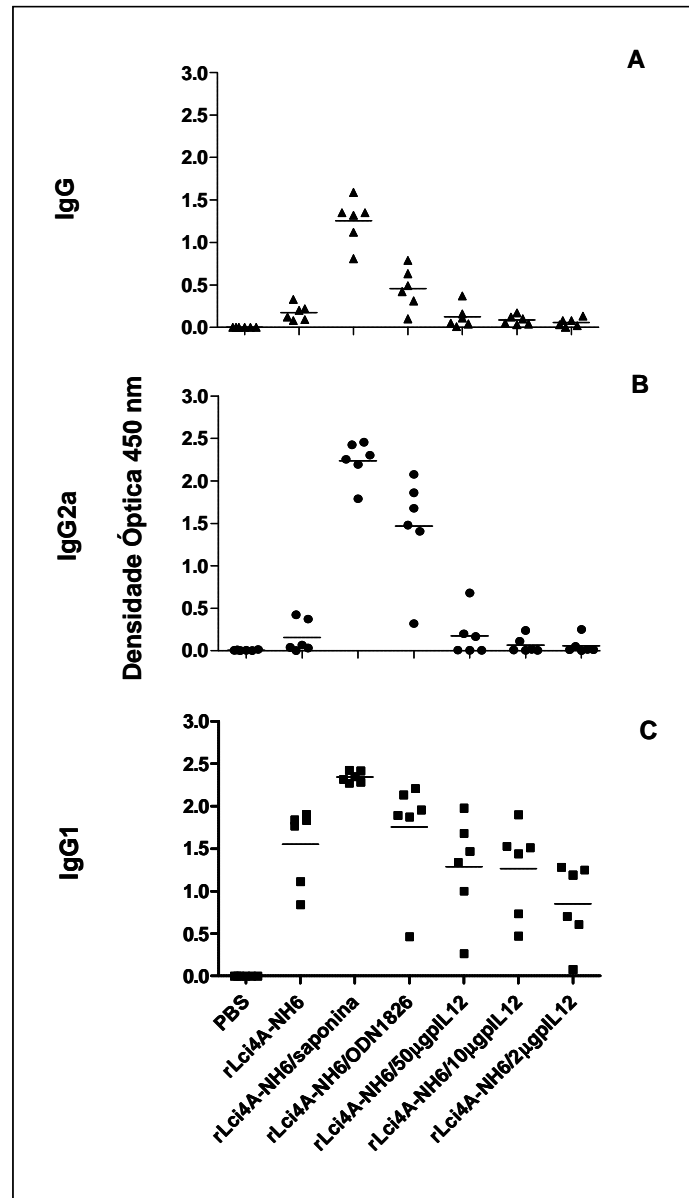
Os valores de densidade óptica de cada animal, obtidos em amostras de soro diluídas 1:10.000 (IgG) ou 1:50.000 (IgG1 e IgG2a), estão representados na Figura 10.

Na avaliação de IgG, observou-se produção desse anticorpo por todos os grupos de animais que receberam rLci4A-NH6, no entanto, animais dos grupos G2, G5, G6 e G7 apresentaram baixos valores de densidade óptica (Figura 10 A).

Os valores de  $X \pm SD$  de densidade óptica observados foram: G1 ( $0,00 \pm 0,00$ ), G2 ( $0,17 \pm 0,09$ ), G3 ( $1,26 \pm 0,26$ ), G4 ( $0,46 \pm 0,24$ ), G5 ( $0,12 \pm 0,13$ ), G6 ( $0,08 \pm 0,05$ ) e G7 ( $0,06 \pm 0,05$ ). A comparação estatística revelou que houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Comparações adicionais entre cada dois grupos, pelo pós-teste de Bonferroni, mostraram que houve maior concentração de IgG nos grupos de animais que receberam o antígeno com saponina (G3) ou com ODN 1826 (G4) em relação ao grupo controle (G1). Além disso, esses mesmos grupos apresentaram maiores concentrações de IgG do que o grupo que recebeu apenas o antígeno (G3 e G2,  $p < 0,001$  e G4 e G2,  $p < 0,05$ , Figura 10 A).

Em relação à produção das subclasses IgG2a e IgG1 reativas a rLci4A, os valores de  $X \pm SD$  de densidade óptica encontrados nos grupos foram: G1 ( $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ), G2 ( $0,15 \pm 0,19$  e  $1,55 \pm 0,45$ ), G3 ( $2,24 \pm 0,24$  e  $2,34 \pm 0,06$ ), G4 ( $1,47 \pm 0,61$  e  $1,76 \pm 0,65$ ), G5 ( $0,18 \pm 0,26$  e  $1,29 \pm 0,6$ ), G6 ( $0,06 \pm 0,09$  e  $1,27 \pm 0,54$ ) e G7 ( $0,06 \pm 0,09$  e  $0,85 \pm 0,48$ ) para IgG2a e IgG1, respectivamente. A análise estatística dos dados mostrou diferença significativa entre os grupos na produção das duas subclasses (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Comparações adicionais entre cada dois grupos mostraram que houve maior concentração de

IgG2a apenas nos grupos que receberam o antígeno associado à saponina (G3) ou ODN 1826 (G4) em relação ao grupo controle G1. Esses mesmos grupos também apresentaram uma maior concentração de IgG2a em relação ao grupo que recebeu o antígeno sem adjuvante. A utilização de doses diferentes de IL-12 não favoreceu a produção de IgG2a (Figura 10 B). Com relação à produção de IgG1, a concentração desse anticorpo foi maior em todos os grupos testes (G2 a G7) em relação ao grupo controle G1, sendo em menor significância no grupo G7 (Figura 10C). As médias dos valores de proporção IgG2a/IgG1 encontradas nos grupos que receberam rLci4A-NH6 (G2), rLci4A-NH6/saponina (G3), rLci4A-NH6/ODN1826 (G4), rLci4A-NH6/50 $\mu$ gpIL-12 (G5), rLci4A-NH6/10  $\mu$ gpIL-12 (G6) ou rLci4A-NH6/2 $\mu$ gpIL-12 (G7) foram 0,12; 0,95; 1,14; 0,11; 0,06 e 0,08, respectivamente, mostrando mais uma vez que o uso de ODN 1826 como adjuvante promoveu mudança do perfil de produção dessas subclasses de anticorpo.



**Figura 10. Avaliação da produção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci4A-NH6.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados 3 vezes com PBS (G1), 100 µg rLci4A-NH6 (G2), 100 µg rLci4A-NH6 / 100 µg saponina (G3), 100 µg rLci4A-NH6 / 10 µg ODN1826 (G4), 100 µg rLci4A-NH6 / 50 µg pIL-12 (G5), 100 µg rLci4A-NH6 / 10 µg pIL-12 (G6) ou 100 µg rLci4A-NH6 / 2 µg pIL-12 (G7). A injeção de PBS, da proteína isoladamente ou associada à adjuvantes (G1, G2, G3 e G4) foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administradas por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100 µg de rLci4A-NH6 associada à 100 µg saponina., por via subcutânea, em intervalos de 21. Amostra de soro de cada animal, obtida 10 dias após a terceira dose de injeção, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:10.000 (IgG, em A) ou 1:50.000 (IgG2a e IgG1, em B e C, respectivamente). Os símbolos representam os valores individuais de densidade óptica e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A ( $G1=G2=G5=G6=G7 < G3=G4$ ), B ( $G1=G2=G5=G6=G7 < G3=G4$ ) e C ( $G1 < G2=G3=G4=G5=G6=G7$ ).

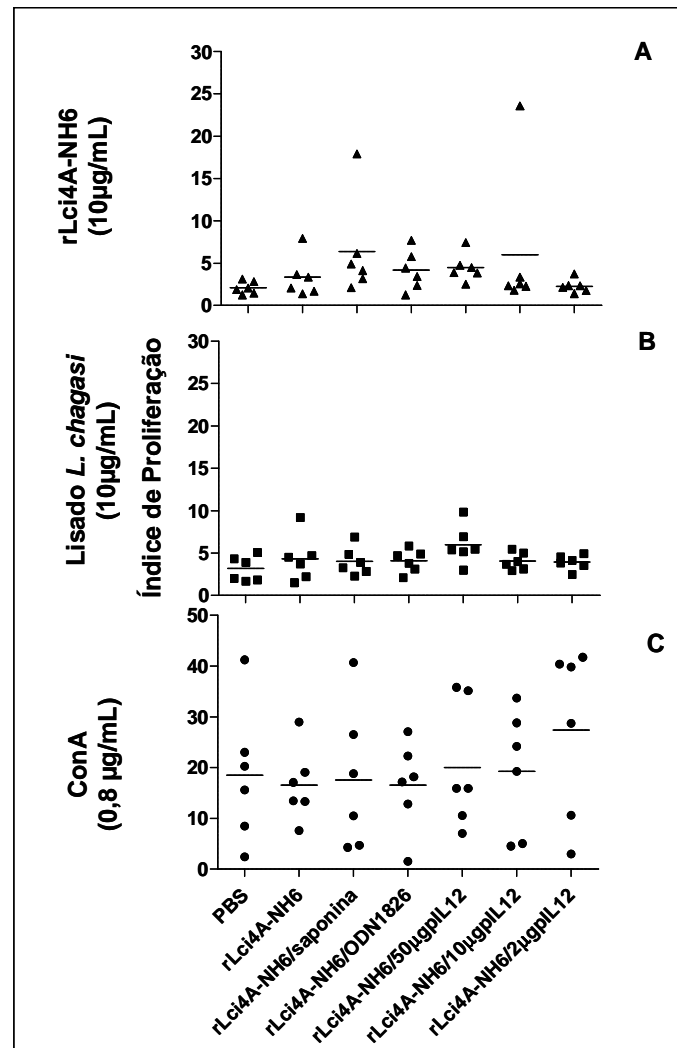
### 6.2.2.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos

A resposta proliferativa dos esplenócitos cultivados na presença de rLci4A-NH6 ou lisado de *L. chagasi* foi muito baixa, em geral, em todos os grupos experimentais (Figura 11 A e B). No cultivo na presença de rLci4A-NH6, observou-se aumento de IP apenas em alguns animais. Os valores de  $X \pm SD$  encontrados foram: G1 ( $2,11 \pm 0,75$ ), G2 ( $3,34 \pm 2,41$ ), G3 ( $6,40 \pm 5,82$ ), G4 ( $4,17 \pm 2,34$ ), G5 ( $4,48 \pm 1,63$ ), G6 ( $5,98 \pm 8,63$ ) e G7 ( $2,29 \pm 0,80$ ). A análise estatística desses dados não mostrou diferença significativa entre as médias (ANOVA,  $p > 0,05$ ). No entanto, observou-se uma tendência ao aumento de IP no grupo que recebeu saponina como adjuvante (G3) (Figura 11 A).

Com relação ao uso do mitógeno concanavalina A, os resultados individuais de IP encontrados foram muito variáveis e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 11 C). Os valores de  $X \pm SD$  de IP encontrados estão na tabela 1.

**Tabela 1. Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 2).**

<b>Grupos</b>	<b>Índice proliferação (Média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
G1 (PBS)	$18,50 \pm 13,46$
G2 (rLci4A-NH6)	$16,58 \pm 7,23$
G3 (rLci4A-NH6/saponina)	$17,59 \pm 14,19$
G4 (rLci4A-NH6/ODN1826)	$16,52 \pm 8,79$
G5 (rLci4A-NH6/50 $\mu$ gpIL-12)	$20,06 \pm 12,40$
G6 (rLci4A-NH6/10 $\mu$ gpIL-12)	$19,26 \pm 12,17$
G7 (rLci4A-NH6/2 $\mu$ gpIL-12)	$27,37 \pm 16,77$



**Figura 11. Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci4A-NH6, lisado de *L. chagasi* ou Con A.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados três vezes com PBS (G1), 100 µg rLci4A-NH6 (G2), 100 µg rLci4A-NH6 / 100 µg saponina (G3), 100 µg rLci4A-NH6 / 10 µg ODN1826 (G4), 100 µg rLci4A-NH6 / 50 µg pIL-12 (G5), 100 µg rLci4A-NH6 / 10 µg pIL-12 (G6) ou 100 µg rLci4A-NH6 / 2 µg pIL-12 (G7). A injeção da proteína, adjuvantes ou PBS foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administrados por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100 µg rLci4A-NH6 associada à 100 µg saponina. Os esplenócitos ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci4A-NH6 a 10 µg/mL (A) ou lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL (B) ou por 3 dias na presença de Con A a 0,8 µg/mL (C) e pulsados com 1 µCi de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0.05$ .

### 6.2.2.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5)

A produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 foi determinada por ELISA em cada sobrenadante do cultivo celular após a estimulação *in vitro*, conforme mencionado anteriormente. O valor mínimo de detecção do ensaio para IFN- $\gamma$  e IL-5 foi de 0,234 ng/mL e 0,062 ng/mL, respectivamente.

Com relação à produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes dos cultivos celulares na presença de rLci4A-NH6, os valores de  $X \pm SD$  encontrados, em ng/mL, foram G1 (4,43  $\pm$  2,77), G2 (5,58  $\pm$  3,38), G3 (14,51  $\pm$  7,88), G4 (8,61  $\pm$  4,51), G5 (8,60  $\pm$  5,80), G6 (9,43  $\pm$  6,12) e G7 (7,69  $\pm$  4,77). Esses resultados mostraram que houve uma produção dessa citocina em todos os grupos que receberam o antígeno, com ou sem adjuvante. Inesperadamente, também houve produção inespecífica de IFN- $\gamma$  no grupo controle G1 (Figura 12 A). Apesar disso, o valor de média do grupo G3 foi 3 vezes maior que a do grupo G1. Como os resultados individuais encontrados apresentaram uma considerável variação dentro de um mesmo grupo experimental, a análise dos dados ficou prejudicada (ANOVA,  $p > 0,05$ ). No cultivo celular na presença de Con A, houve produção de IFN- $\gamma$  em todos os grupos (Tabela 2). Não foi observada diferença significativa entre as médias dos grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 12 B).

Na avaliação da produção de IL-5, após estimulação *in vitro* com rLci4A-NH6, apenas foi observada produção dessa citocina no grupo que recebeu o antígeno associado à saponina (G3), apresentando valor de  $X \pm SD$  igual a 0,26  $\pm$  0,02. A concentração encontrada de IL-5 nesse grupo foi maior que a do grupo controle (G1), assim como a do grupo que recebeu apenas a proteína recombinante (G2) (Figura 12 C). No cultivo das células na presença de Con A, observou-se uma baixa produção de IL-5 nos grupos experimentais, sugerindo mais uma vez que esse mitógeno não induz uma produção de IL-5 da mesma forma que induz de IFN- $\gamma$  (Figura 12 D). Os valores de  $X \pm SD$  encontrados estão na Tabela 3.

No sobrenadante das células esplênicas cultivadas na presença apenas de meio de cultura ou de lisado protéico de promastigotas de *L. chagasi* não houve produção detectável de ambas citocinas (dados não mostrados).

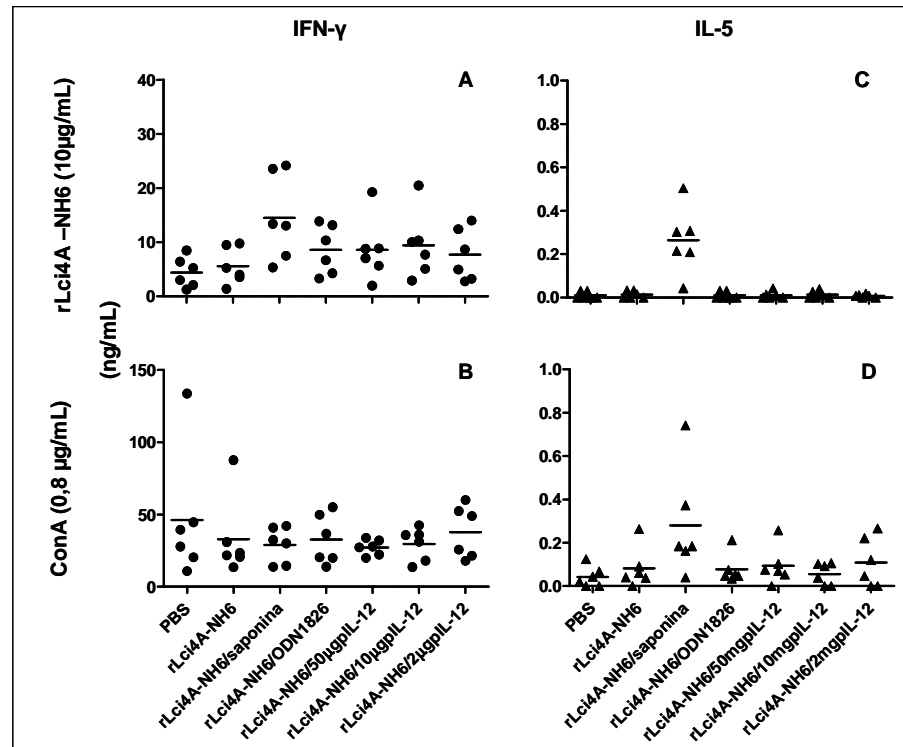
**Tabela 2. Concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 2)**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (PBS)	46,13 $\pm$ 44,62
G2 (rLci4A-NH6)	33 $\pm$ 27,33
G3 (rLci4A-NH6/saponina)	28,97 $\pm$ 12,38
G4 (rLci4A-NH6/ODN1826)	32,65 $\pm$ 17,20
G5 (rLci4A-NH6/50 $\mu$ gpIL-12)	27,21 $\pm$ 5,36
G6 (rLci4A-NH6/10 $\mu$ gpIL-12)	29,54 $\pm$ 11,32
G7 (rLci4A-NH6/2 $\mu$ gpIL-12)	37,77 $\pm$ 18,07

**Tabela 3. Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 2)**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (PBS)	0,04 $\pm$ 0,04
G2 (rLci4A-NH6)	0,08 $\pm$ 0,09
G3 (rLci4A-NH6/saponina)	0,28 $\pm$ 0,24
G4 (rLci4A-NH6/ODN1826)	0,07 $\pm$ 0,06
G5 (rLci4A-NH6/50 $\mu$ gpIL-12)	0,09 $\pm$ 0,08
G6 (rLci4A-NH6/10 $\mu$ gpIL-12)	0,05 $\pm$ 0,05
G7 (rLci4A-NH6/2 $\mu$ gpIL-12)	0,10 $\pm$ 0,11





**Figura 12. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci4A-NH6 ou Con A.** Grupos de camundongos BALB/c ( $n=6$ ) foram injetados três vezes com PBS (G1), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 (G2), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 100  $\mu\text{g}$  saponina (G3), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 10  $\mu\text{g}$  ODN1826 (G4), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 50  $\mu\text{g}$  pIL-12 (G5), 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 10  $\mu\text{g}$  pIL-12 (G6) ou 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 / 2  $\mu\text{g}$  pIL-12 (G7). A injeção da proteína, adjuvantes ou PBS foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administrados por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100  $\mu\text{g}$  rLci4A-NH6 associada à 100  $\mu\text{g}$  saponina. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci4A-NH6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A e C) ou Con A a 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtido após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em C ( $G1=G2=G4=G5=G6=G7 < G3$ ), A, B e D (ANOVA  $p > 0,05$ ).

### 6.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS INJETADOS COM rLci2B-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA, ODN1826 OU IL-12 – PROTOCOLO 3

Diante dos resultados obtidos nos dois primeiros protocolos, nos quais não foi possível observar a indução de uma resposta imune predominantemente celular Th1, um novo protocolo foi realizado, porém utilizando outro antígeno recombinante (rLci2B-NH6). Nesse protocolo, os camundongos receberam três doses de: PBS (G1), rLci2B-NH6 (G2), rLci2B-

NH6/saponina (G3), rLci2B-NH6/ODN1826 (G4), rLci2B-NH6/50 $\mu$ gpIL-12 (G5), rLci2B-NH6/10 $\mu$ gpIL-12 (G6) e rLci2B-NH6/2 $\mu$ gpIL-12 (G7). A injeção de PBS ou da proteína, sozinha ou associada à saponina ou ODN 1826 (G1 a G4), foi feita por via subcutânea, enquanto que a dos plasmídeos codificando as diferentes doses de IL-12 foi feita pela via intramuscular, seguida de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção. Nas segunda e terceira doses, os animais dos grupos G5 ao G7 receberam rLci2B associada à saponina.

### 6.3.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6

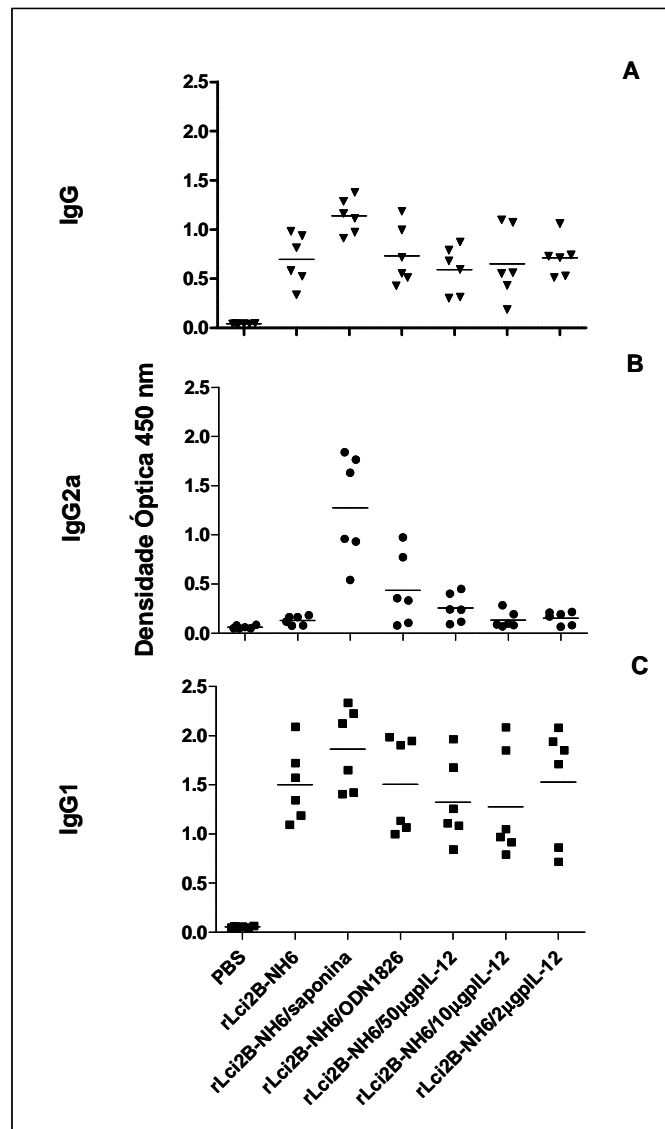
A resposta imune humoral dos animais foi avaliada 10 dias após a terceira dose de imunização em amostras de soro diluídas a 1:50.000 tanto para IgG quanto para IgG1 e IgG2a.

Os valores de densidade óptica obtidos nos ensaios imunoenzimáticos estão representados na Figura 13.

Em relação a IgG, houve produção desse anticorpo em todos os grupos teste (G2 a G7) e a análise estatística revelou diferença significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,001$ ). As comparações, realizadas entre cada dois grupos, mostraram que os grupos G2 ( $X \pm SD$ ;  $0,70 \pm 0,25$ ), G3 ( $1,14 \pm 0,18$ ), G4 ( $0,73 \pm 0,30$ ), G5 ( $0,60 \pm 0,24$ ), G6 ( $0,65 \pm 0,36$ ) e G7 ( $0,71 \pm 0,20$ ) apresentaram maiores concentrações de anticorpos do que o grupo controle G1 ( $0,04 \pm 0,00$ ). Além disso, o grupo G3, que recebeu saponina como adjuvante, apresentou uma maior concentração de IgG que o grupo que recebeu apenas o antígeno (G2) (Figura 13 A).

Na análise da produção das subclasses, observou-se produção de IgG2a e IgG1 em alguns ou todos grupos testes, respectivamente. A análise estatística, por ANOVA, revelou diferença entre os grupos nas duas avaliações ( $p < 0,001$ ). Em relação a IgG2a, apenas o grupo que recebeu o antígeno associado à saponina G3 ( $1,28 \pm 0,54$ ) apresentou maior concentração do que o grupo controle G1 ( $0,06 \pm 0,02$ ). Além disso, a concentração dessa imunoglobulina encontrada nesse mesmo grupo foi quase 10 vezes maior do que a do grupo de animais que receberam o antígeno isoladamente (G2,  $0,13 \pm 0,05$ ). Nesse experimento, o uso de ODN ou IL-12 não favoreceu a produção de IgG2a (Figura 13 B). Já para IgG1, observou-se que os grupos G2 ( $1,50 \pm 0,37$ ), G3 ( $1,86 \pm 0,42$ ), G4 ( $1,51 \pm 0,42$ ), G5 ( $1,32 \pm 0,42$ ), G6 ( $1,28 \pm 0,55$ ) e G7 ( $1,53 \pm 0,59$ ) apresentaram maiores concentrações desse anticorpo do que o grupo G1 ( $0,06 \pm 0,01$ ) (Figura 13 C). Os valores de média da proporção IgG2a/IgG1 nos grupos G2, G3, G4, G5 G6 e G7 foram 0,09; 0,67; 0,26; 0,19; 0,10 e 0,10, respectivamente,

mostrando que não houve produção predominantemente de IgG2a em nenhum dos grupos experimentais.



**Figura 13. Detecção de anticorpos IgG , IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados 3 vezes com PBS (G1), 100 µg rLci2B-NH6 (G2), 100 µg rLci2B-NH6 / 100 µg saponina (G3), 100 µg rLci2B-NH6 / 10 µg ODN1826 (G4), 100 µg rLci2B-NH6 / 50 µg pIL-12 (G5), 100 µg rLci2B-NH6 / 10 µg pIL-12 (G6) ou 100 µg rLci2B-NH6 / 2 µg pIL-12 (G7). A injeção de PBS, da proteína isoladamente ou associada à adjuvantes (G1, G2, G3 e G4) foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administradas por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100 µg de rLci4A-NH6 associada à 100 µg saponina., por via subcutânea, em intervalos de 21. Amostra de soro de cada animal, obtida 10 dias após a terceira dose de injeção, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:50.000 (IgG, IgG2a e IgG1, em A, B e C, respectivamente). Os símbolos representam valores individuais e as linhas as médias de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A ( $G1 < G2 = G4 = G5 = G6 = G7 < G3$ ), B ( $G1 = G2 = G4 = G5 = G6 = G7 < G3$ ) e C ( $G1 < G2 = G3 = G4 = G5 = G6 = G7$ ).

### 6.3.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos

A avaliação da resposta linfoproliferativa foi realizada no cultivo de esplenócitos dos animais, na presença de rLci2B-NH6 a 10 µg/mL, proteínas do lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL ou Con A a 2,5 µg/mL.

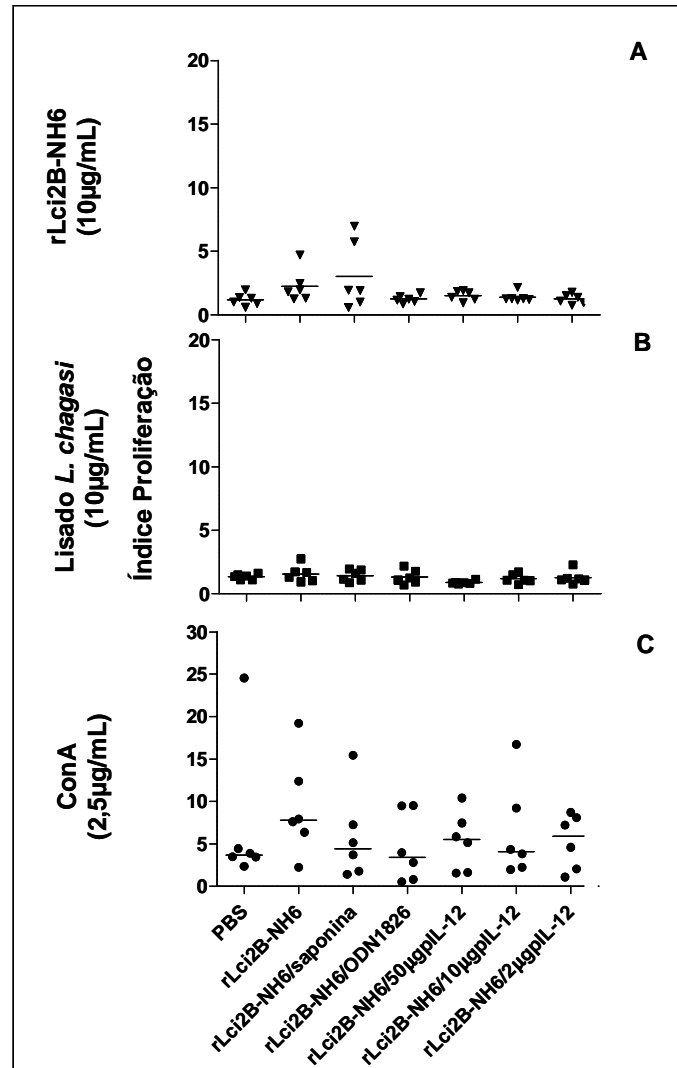
Os valores de IP encontrados após cultivo nas condições *in vitro* supracitadas estão representados na Figura 14.

Nos cultivos dos esplenócitos na presença de rLci2B-NH6 ou lisado de *L. chagasi*, observaram-se valores de IP muito baixos (Figura 14 A e B). No entanto, houve um discreto aumento da média de IP no grupo que recebeu rLci2B-NH6/saponina G3 ( $3,03 \pm 2,66$ ) e foi estimulado com a proteína recombinante em relação ao grupo controle G1 ( $1,20 \pm 0,47$ ). Contudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 14 A).

Por outro lado, o cultivo dessas mesmas células na presença de Con A induziu a proliferação dos esplenócitos de cada um dos grupos de camundongos, porém com valores individuais de IP variando dentro de um mesmo grupo e mais baixos do que nos outros dois protocolos (Figura 14 C). Os valores de  $X \pm SD$  de IP encontrados estão na tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

**Tabela 4. Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 3).**

<b>Grupos</b>	<b>Índice proliferação (Média <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
G1 (PBS)	$7,01 \pm 8,61$
G2 (rLci2B-NH6)	$9,28 \pm 5,58$
G3 (rLci2B-NH6/saponina)	$5,78 \pm 5,20$
G4 (rLci2B-NH6/ODN1826)	$4,51 \pm 4,07$
G5 (rLci2B-NH6/50µgpIL-12)	$5,33 \pm 3,42$
G6 (rLci2B-NH6/10µgpIL-12)	$6,37 \pm 5,70$
G7 (rLci2B-NH6/2µgpIL-12)	$5,28 \pm 3,21$



**Figura 14.** Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6, lisado de *L. chagasi* ou Con A. Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados três vezes com PBS (G1), 100 µg rLci2B-NH6 (G2), 100 µg rLci2B-NH6 / 100 µg saponina (G3), 100 µg rLci2B-NH6 / 10 µg ODN1826 (G4), 100 µg rLci2B-NH6 / 50 µg pIL-12 (G5), 100 µg rLci2B-NH6 / 10 µg pIL-12 (G6) ou 100 µg rLci2B-NH6 / 2 µg pIL-12 (G7). A injeção da proteína, adjuvantes ou PBS foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administrados por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100 µg rLci4A-NH6 associada à 100 µg saponina. Os esplenócitos ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (A) ou lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL (B) ou por 3 dias na presença de Con A a 2,5 µg/mL (C) e pulsados com 1 µCi de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0.05$ .

### 6.3.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5)

A produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 foi avaliada, por ELISA de captura, em amostras individuais de sobrenadante dos cultivos descritos anteriormente. O valor mínimo de detecção do ensaio para IFN- $\gamma$  e IL-5 foi de 0,234 ng/mL e 0,062 ng/mL, respectivamente.

Com relação à produção de IFN- $\gamma$ , houve uma produção detectável dessa citocina apenas no grupo que recebeu o antígeno com saponina, no cultivo com rLci2B-NH6 (Figura 15 A). Somente foi observada diferença significativa entre os grupos no cultivo celular na presença de rLci2B-NH6 (ANOVA,  $p < 0,001$ ). A comparação entre cada dois grupos mostrou que apenas o grupo G3 ( $0,48 \pm 0,23$  ng/mL) apresentou maior concentração de IFN- $\gamma$  do que o grupo G1 ( $0,01 \pm 0,01$  ng/mL) (Figura 15 A). Já no cultivo na presença de Con A, houve detecção dessa citocina em todos os grupos, entretanto, com considerável variação nos valores individuais (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 15 B). Os valores de  $X \pm SD$  encontrados nos grupos experimentais estão na Tabela 5.

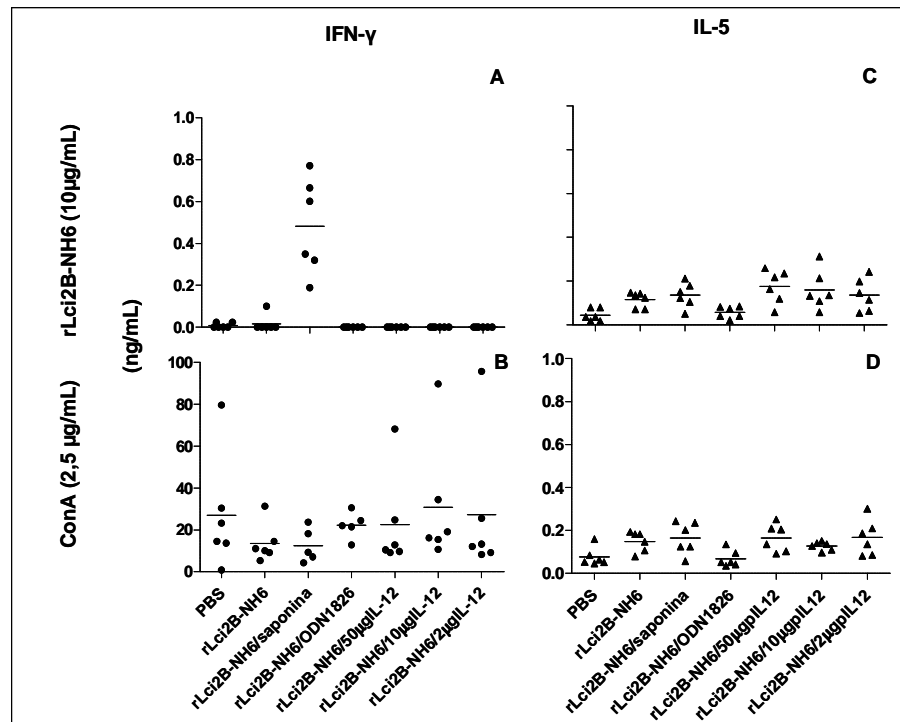
Já na avaliação da produção de IL-5, observou-se baixa produção dessa citocina pelos esplenócitos dos animais, tanto em amostras de sobrenadante do cultivo com rLc4A-NH6 quanto com Con A. Os valores de  $X \pm SD$  da concentração de IL-5, quando as células foram cultivadas na presença do mitógeno, estão na Tabela 6. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 15 C e D).

**Tabela 5. Concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo3).**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (PBS)	27,01 $\pm$ 27,58
G2 (rLci2B-NH6)	13,56 $\pm$ 9,19
G3 (rLci2B-NH6/saponina)	12,47 $\pm$ 8,14
G4 (rLci2B-NH6/ODN1826)	22,24 $\pm$ 6,37
G5 (rLci2B-NH6/50 $\mu$ gpIL-12)	22,48 $\pm$ 23,10
G6 (rLci2B-NH6/10 $\mu$ gpIL-12)	30,90 $\pm$ 29,90
G7 (rLci2B-NH6/2 $\mu$ gpIL-12)	27,30 $\pm$ 34,07

**Tabela 6. Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 3)**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (PBS)	0,07 $\pm$ 0,04
G2 (rLci2B-NH6)	0,14 $\pm$ 0,04
G3 (rLci2B-NH6/saponina)	0,16 $\pm$ 0,07
G4 (rLci2B-NH6/ODN1826)	0,06 $\pm$ 0,03
G5 (rLci2B-NH6/50 $\mu$ gpIL-12)	0,16 $\pm$ 0,06
G6 (rLci2B-NH6/10 $\mu$ gpIL-12)	0,12 $\pm$ 0,02
G7 (rLci2B-NH6/2 $\mu$ gpIL-12)	0,16 $\pm$ 0,08



**Figura 15. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6 ou Con A.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados três vezes com PBS (G1), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 (G2), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 / 100  $\mu$ g saponina (G3), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 / 10  $\mu$ g ODN1826 (G4), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 / 50  $\mu$ g pIL-12 (G5), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 / 10  $\mu$ g pIL-12 (G6) ou 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 / 2  $\mu$ g pIL-12 (G7). A injeção da proteína, adjuvantes ou PBS foi feita em três doses por via subcutânea. As diferentes doses do plasmídeo pcDNA3.1A-scmu-IL-12 foram administrados por via intramuscular, seguido de eletroporação, apenas na primeira dose de injeção (G5, G6 e G7). Nas segunda e terceira doses, esses grupos receberam 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 associada à 100  $\mu$ g saponina.. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci2B-NH6 a 10  $\mu$ g/mL (A e C) ou Con A a 2,5  $\mu$ g/mL (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtido após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A (G1=G2=G4=G5=G6=G7 < G3), B, C e D (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



## 6.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM PLASMÍDEO CODIFICANDO rLci2B-NH6 E REFORÇO COM rLci2B-NH6 ASSOCIADA A SAPONINA – PROTOCOLO 4

Previamente em nosso laboratório, camundongos que receberam 2 doses de pBK-CMV-Lci2B e reforço com rLci2B-NH6 associada à saponina apresentaram uma resposta imune celular específica Th1, caracterizada pela proliferação linfocitária, produção de IFN- $\gamma$  e anticorpos IgG2a em relação ao grupo controle negativo (SANTOS, 2007). Visando avaliar a capacidade de indução de proteção contra infecção por *Leishmania chagasi* por esse grupo experimental e, além disso, pelo grupo que recebe rLci2B-NH6 associada à saponina (resposta mista Th1/Th2), camundongos BALB/c foram imunizados com PBS (G1), pBK-CMVvazio/PBS (G2), rLci2B-NH6 (G3) e rLci2B-NH6/saponina (G4), pBK-CMV-Lci2B-NH6/rLci2B-NH6-saponina (G5). Os grupos G1, G3 e G4 receberam três doses de PBS ou proteína, por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam duas doses dos plasmídeos sem ou com inserto de rLci2B-NH6, por via intramuscular, seguido de eletroporação e a terceira dose de PBS (G2) ou proteína associada à saponina (G5), por via subcutânea. Quatro semanas após a terceira dose de imunização 6 dos 12 animais de cada grupo foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi*, por via intraperitoneal. Dois dias após a primeira dose de imunização, um animal do grupo G4 e um animal do G5 foram encontrados mortos.

### 6.4.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6

A avaliação da resposta imune humoral foi realizada 10 dias após a terceira dose de imunização, em 12 animais de cada grupo experimental, e cerca de 2 meses após o desafio, em 6 animais de cada grupo. Dados de densidade óptica, obtidos por ELISA, em amostras de soro diluídas a 1:20.000 (IgG) e 1:50.000 (IgG1 e IgG2a) após imunização e desafio dos animais, estão representados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

A avaliação da detecção IgG, IgG1 e IgG2a, nas diluições mencionadas acima, mostrou que houve produção de anticorpos reativos a rLci2B-NH6 nos grupos G3, G4 e G5 (IgG e IgG1) e apenas nos grupos G4 e G5 (IgG2a), tanto após imunização quanto desafio.

Com relação à imunoglobulina IgG, a análise estatística mostrou diferença entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,001$ ). As comparações feitas entre cada dois grupos, após imunização, revelaram que os grupos G3 ( $0,43 \pm 0,17$ ), G4 ( $0,90 \pm 0,23$ ) e G5 ( $0,33 \pm 0,22$ ) apresentaram maiores concentrações de IgG em relação aos grupos controles e que a utilização de saponina

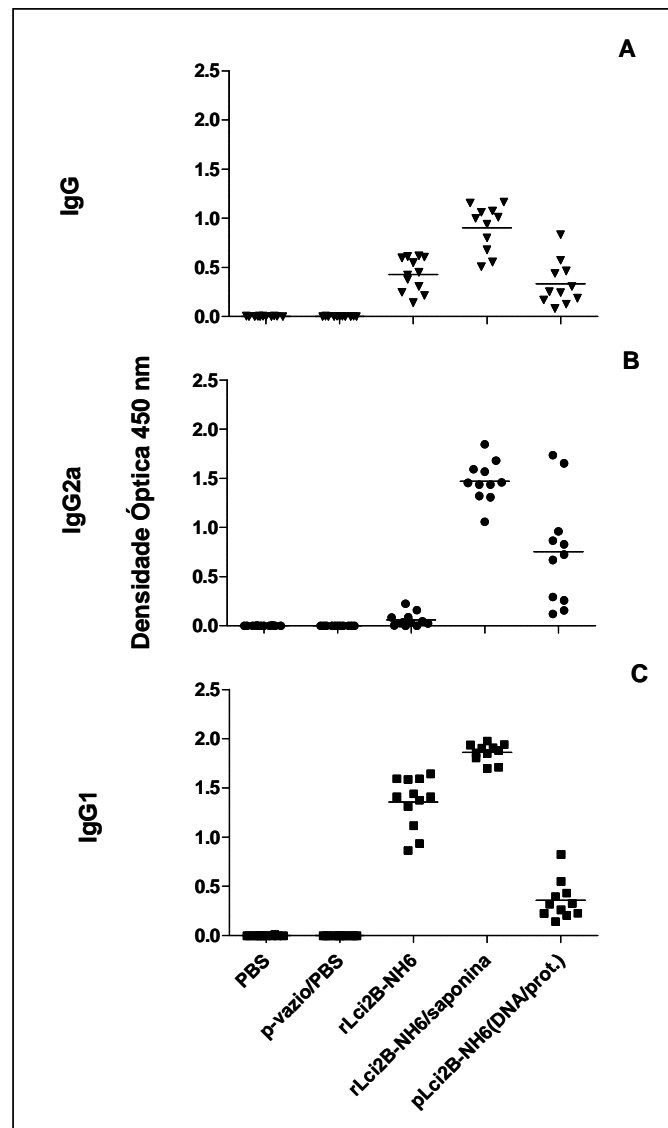
como adjuvante (G4) levou a uma produção mais intensa desse anticorpo em relação aos outros dois grupos G3 e G5. O mesmo padrão de resposta foi encontrado após o desafio dos animais, sendo os valores de  $X \pm SD$  observados de: G3 ( $0,33 \pm 0,14$ ), G4 ( $0,63 \pm 0,05$ ) e G5 ( $0,38 \pm 0,09$ ).

Em relação à produção de IgG2a e IgG1, após imunização e desafio, os valores de  $X \pm SD$  de densidade óptica obtidos nos grupos estão na Tabela 7.

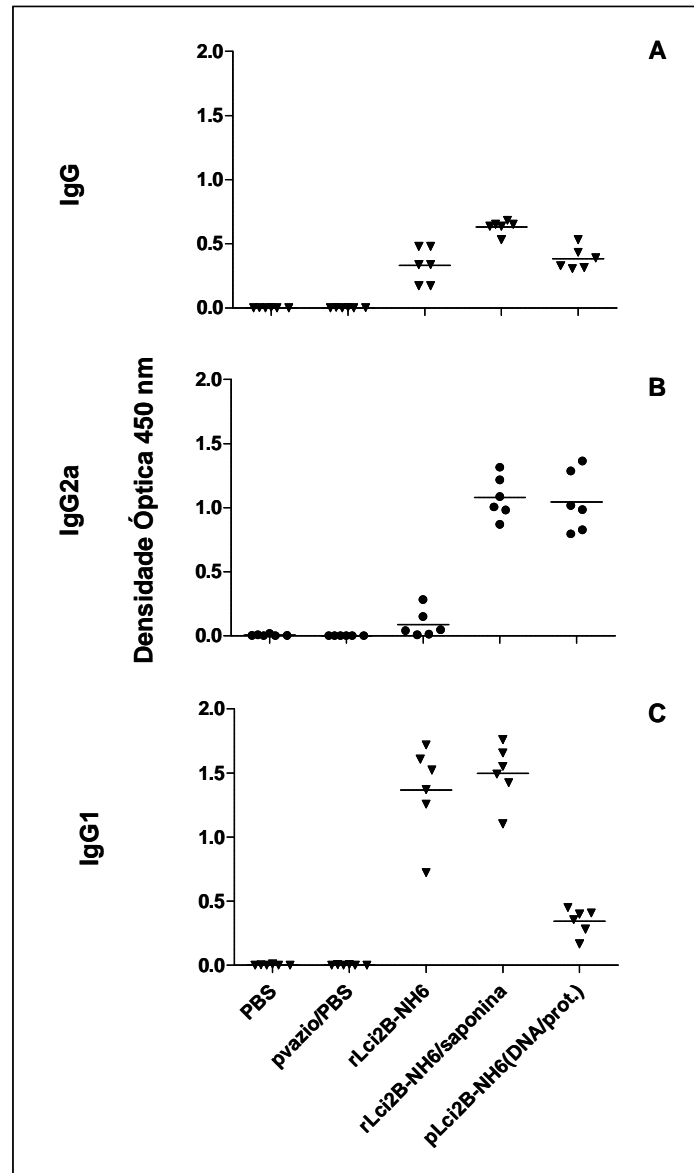
A análise estatística dos dados mostrou diferença significativa entre os grupos para produção de ambas as subclasses de anticorpo, tanto após imunização quanto após imunização e desafio (ANOVA,  $p < 0,001$ ). As comparações adicionais entre cada dois grupos, mostraram que houve detecção de maior concentração de IgG2a nos grupos que receberam o antígeno com saponina (G4) ou DNA/proteína (G5) do que os grupos controles, como também em relação ao grupo que recebeu apenas o antígeno (G2) (Figuras 16 e 17 B). No entanto, observou-se uma concentração maior de IgG2a no grupo que recebeu saponina como adjuvante (G4), somente após a imunização (Figura 16 B). Para IgG1, apesar de terem sido detectadas maiores concentrações desse anticorpo nos grupos G3, G4 e G5 em relação aos grupos controles, a utilização de DNA/proteína (G5) induziu uma concentração mais baixa de IgG1 em relação ao uso de apenas o antígeno (G3) ou antígeno com saponina (G4). (Figuras 16C e 17C). Os valores de média da proporção IgG2/IgG1 mostraram que a utilização de DNA/proteína modificou o perfil de produção dessas imunoglobulinas, favorecendo a produção de IgG2a (Tabela 7).

**Tabela 7. Valores de densidade óptica obtidos nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B (protocolo 4).**

Grupos	Após imunização			Após imunização e desafio		
	IgG2a	IgG1	IgG2a/IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2a/IgG1
G1	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-
G2	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-
G3	$0,06 \pm 0,07$	$1,36 \pm 0,26$	0,04	$0,09 \pm 0,10$	$1,37 \pm 0,36$	0,06
G4	$1,47 \pm 0,21$	$1,86 \pm 0,09$	0,79	$1,10 \pm 0,16$	$1,50 \pm 0,23$	0,73
G5	$0,75 \pm 0,55$	$0,36 \pm 0,19$	2,08	$1,05 \pm 0,23$	$0,34 \pm 0,10$	3,09



**Figura 16. Detecção de anticorpos IgG , IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6 (após imunização).** Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50 µg pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100 µg rLci2B-NH6 (G3), 100 µg rLci2B-NH6/saponina (G4), 50 µg pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100 µg rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot.)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100 µg rLci2B-NH6 associada à 100 µg saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Amostra de soro de cada animal, obtida 10 dias após a terceira dose de injeção, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:20.000 (IgG, em A) e 1:50.000 (IgG2a e IgG1, em B e C, respectivamente). Os símbolos representam valores individuais e as linhas as médias de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A ( $G1 < G3 < G4$ ;  $G2 < G5$ ;  $G3 = G5 < G4$ ), B ( $G1 = G3 < G4$ ;  $G2 < G5$ ;  $G3 < G4 = G5$ ) e C ( $G1 < G3 < G4$ ,  $G2 < G5$ ;  $G5 < G3 < G4$ ).



**Figura 17. Detecção de anticorpos IgG , IgG2a e IgG1 reativos a rLci2B-NH6 (após imunização e desafio).** Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50 µg pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100 µg rLci2B-NH6 (G3), 100 µg rLci2B-NH6/saponina (G4), 50 µg pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100 µg rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100 µg rLci2B-NH6 associada à 100 µg saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Quatro semanas após a terceira dose, os animais foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi*, por via intraperitoneal. Amostra de soro de 6 animais de cada grupo, obtida 60 dias após o desafio, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:20.000 (IgG) e 1:50.000 (IgG2a e IgG1). Os símbolos representam valores individuais e as linhas as médias de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A ( $G1 < G3 < G4$ ;  $G2 < G5$ ;  $G3 = G5 < G4$ ), B ( $G1 = G3 < G4$ ;  $G2 < G5$ ) e C ( $G1 < G3 = G4$ ;  $G2 < G5$ ;  $G5 < G4$ ).

#### 6.4.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos

A avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos *in vitro* foi realizada no sobrenadante de cultivo celular na presença de rLci2B-NH6 a 10 µg/mL, proteínas do lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL ou Con A a 2,5 µg/mL.

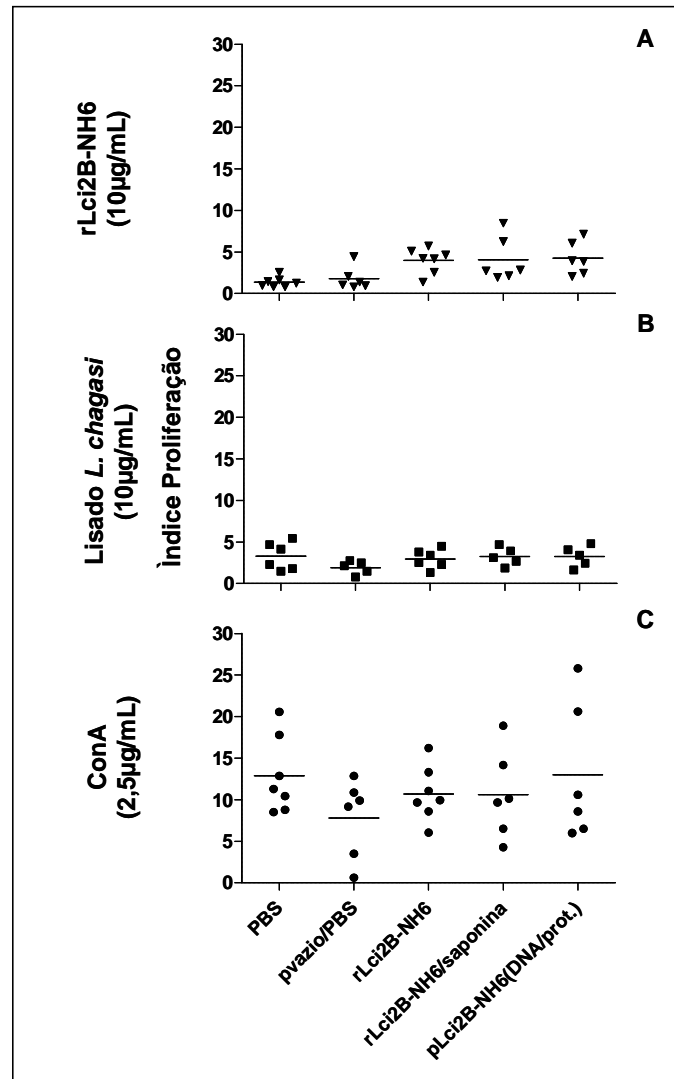
Após imunização, a estimulação *in vitro* das células com rLci2B-NH6 não induziu a proliferação dos esplenócitos (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Os valores de  $X \pm SD$  de IP nos grupos controles foram G1 ( $1,36 \pm 0,62$ ) e G2 ( $1,77 \pm 1,38$ ). Por outro lado, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, houve uma tendência a aumento de IP nos grupos teste G3 ( $3,98 \pm 1,51$ ), G4 ( $4,06 \pm 2,68$ ) e G5 ( $4,24 \pm 2,00$ ). Já após imunização e imunização desafio dos animais, houve maior proliferação celular no grupo G4 ( $4,93 \pm 3,07$ ) em relação ao grupo G1 ( $1,21 \pm 0,44$ ) (Figura 19 A).

Após a imunização e desafio dos animais, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de IP dos grupos quando os esplenócitos foram cultivados na presença do lisado de promastigota de *L. chagasi* a 10µg/mL (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figuras 18 e 19 B).

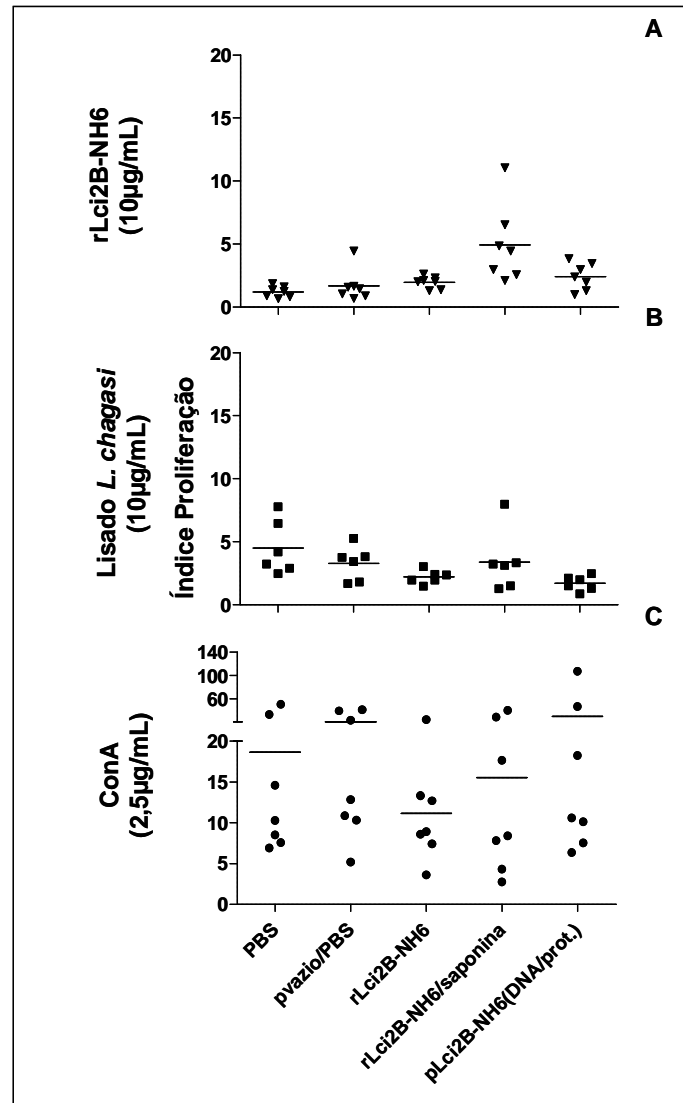
O cultivo dessas mesmas células na presença do mitógeno Con A, tanto pós-imunização quanto pós-imunização e desafio, induziu a proliferação dos esplenócitos de cada um dos grupos de camundongos, sendo os valores individuais de IP encontrados muito variados, sem diferença estatística entre os grupos (Figuras 18 e 19 C). Os valores de  $X \pm SD$ , após imunização e desafio, estão na Tabela 8.

**Tabela 8. Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 4).**

Grupos	Após imunização	Após imunização e desafio
	Índice proliferação (Média $\pm$ desvio)	Índice proliferação (Média $\pm$ desvio)
G1 (PBS)	12,89 $\pm$ 4,61	18,65 $\pm$ 16,51
G2 (pBK-CMV vazio/PBS)	10,69 $\pm$ 3,30	11,16 $\pm$ 6,41
G3 (rLci2B-NH6)	10,61 $\pm$ 5,27	15,53 $\pm$ 13,84
G4 (rLci2B-NH6/saponina)	7,81 $\pm$ 4,72	20,22 $\pm$ 14,39
G5 (pBK-CMV-Lci2B – DNA/proteína)	13,01 $\pm$ 8,24	29,40 $\pm$ 36,80



**Figura 18. Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6, lisado de *L. chagasi* ou Con A (após imunização).** Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50 µg pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100 µg rLci2B-NH6 (G3), 100 µg rLci2B-NH6/saponina (G4), 50 µg pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100 µg rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100 µg rLci2B-NH6 associada à 100 µg saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos de 6 animais de cada grupo ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (A) ou lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL (B) ou por 3 dias na presença de Con A a 2,5 µg/mL (C) e pulsados com 1 µCi de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0.05$ .



**Figura 19.** Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6, lisado de *L. chagasi* ou Con A (após imunização e desafio). Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50 µg pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100 µg rLci2B-NH6 (G3), 100 µg rLci2B-NH6/saponina (G4), 50 µg pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100 µg rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100 µg rLci2B-NH6 associada à 100 µg saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Quatro semanas após a terceira dose, os animais foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi*, por via intraperitoneal. Os esplenócitos de 6 animais de cada grupo ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (A) ou lisado de promastigotas de *L. chagasi* a 10 µg/mL (B) ou por 3 dias na presença de Con A a 2,5 µg/mL (C) e pulsados com 1 µCi de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A (G1=G3<G4; G2=G5); B e C (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

### 6.4.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5)

Com relação à produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 no sobrenadante do cultivo dos esplenócitos, por ELISA, o valor mínimo de detecção do ensaio foi de 0,234 ng/mL para IFN- $\gamma$  e 0,062 ng/mL para IL-5.

Na avaliação da produção de IFN- $\gamma$ , quando esplenócitos foram cultivados na presença de rLci2B-NH6 a 10  $\mu$ g/mL, tanto após imunização quanto após imunização e desafio, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figuras 20 e 21 A). Apenas alguns animais dos grupos G4 e G5 produziram IFN- $\gamma$  detectável pelo método e, por esse motivo, observou-se uma tendência nesses dois grupos em produzir essa citocina, principalmente após a imunização e o desafio dos animais (Figuras 20 e 21 A). Apesar do grupo que recebeu DNA/proteína (G5) não ter produzido quantidade significativa de IFN- $\gamma$  e proliferação celular, os resultados encontrados nesse protocolo mostram uma tendência a geração de resposta imune celular Th1 nesse grupo, pelo menos em alguns animais. Com relação a IL-5, observou-se o mesmo padrão de resultado após imunização e desafio dos animais (Figuras 20 e 21 C), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Observou-se produção detectável de IL-5 tanto no grupo que recebeu apenas o antígeno (G3), quanto no grupo que recebeu o antígeno com saponina G4 ( $0,598 \pm 0,510$  e  $0,49 \pm 0,27$  ng/mL), após imunização e desafio. No entanto, apenas houve produção estatisticamente significativa no grupo G4, mostrando assim a indução de resposta imune mista (Th1/Th2).

Na presença de Con A, após imunização e desafio dos animais, verificou-se produção de IFN- $\gamma$  em todos os grupos, com considerável variação dentro de um mesmo grupo. Os valores de  $X \pm SD$  encontrados estão na tabela 9. Não houve diferença estatisticamente entre as médias dos grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figuras 20B e 21B). Já para IL-5, observou-se uma maior produção dessa citocina apenas no grupo que recebeu o antígeno com saponina (G4,  $1,38 \pm 1,13$  ng/mL). Os outros grupos produziram baixas concentrações de IL-5 (Tabela 10), sendo a produção individual mais heterogênea após a imunização e o desafio (Figuras 20D e 21D).

Os sobrenadantes obtidos do cultivo celular na presença de meio ou de lisado total de *L. chagasi*, tanto após imunização quanto após a imunização e o desafio, não apresentaram níveis detectáveis dessas citocinas (dados não mostrados).

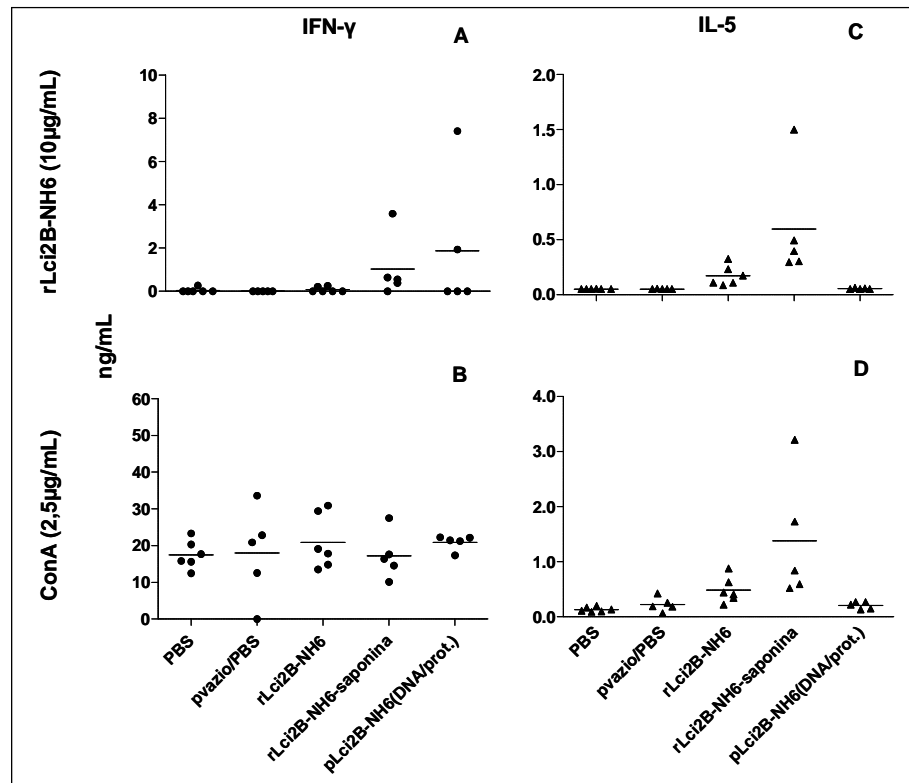


**Tabela 9. Concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 4)**

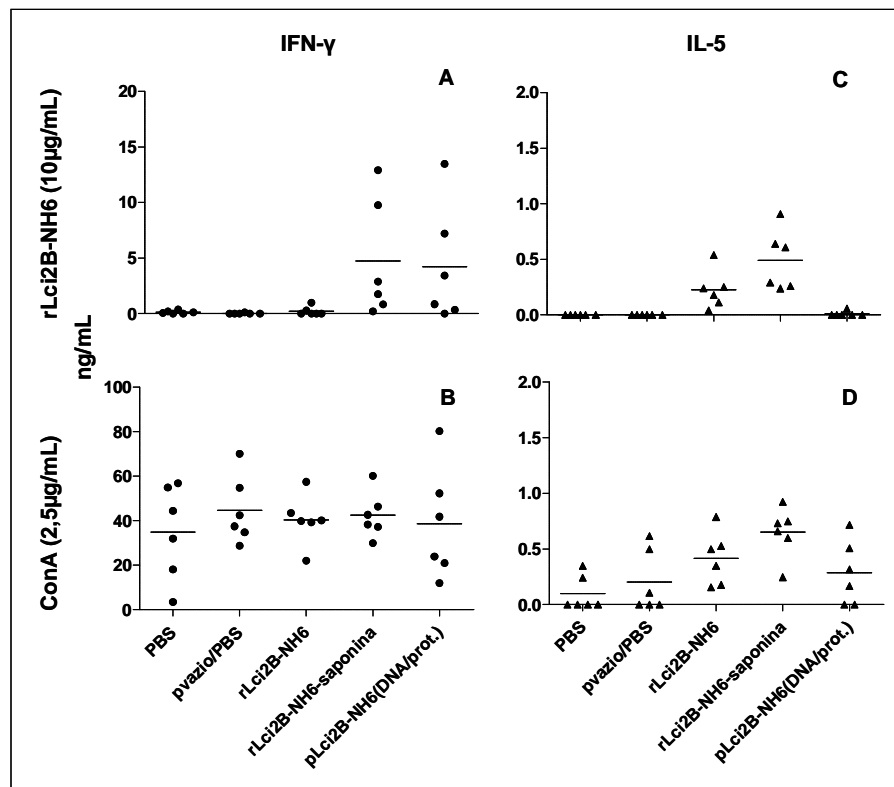
Grupos	Após imunização	Após imunização e desafio
	Concentração (ng/mL)	Concentração (ng/mL)
G1 (PBS)	17,53 $\pm$ 3,844	34,95 $\pm$ 21,20
G2 (pBK-CMV vazio/PBS)	17,99 $\pm$ 12,54	44,70 $\pm$ 15,21
G3 (rLci2B-NH6)	20,95 $\pm$ 7,454	40,36 $\pm$ 11,31
G4 (rLci2B-NH6/saponina)	17,24 $\pm$ 6,406	42,45 $\pm$ 10,28
G5 (pBK-CMV-Lci2B – DNA/proteína)	20,90 $\pm$ 2,029	38,54 $\pm$ 25,18

**Tabela 10. Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 4)**

Grupos	Após imunização	Após imunização e desafio
	Concentração (ng/mL)	Concentração (ng/mL)
G1 (PBS)	0,13 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,15
G2 (pBK-CMV vazio/PBS)	0,22 $\pm$ 0,13	0,20 $\pm$ 0,27
G3 (rLci2B-NH6)	0,48 $\pm$ 0,23	0,41 $\pm$ 0,23
G4 (rLci2B-NH6/saponina)	1,37 $\pm$ 1,13	0,65 $\pm$ 0,22
G5 (pBK-CMV-Lci2B – DNA/proteína)	0,20 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,28



**Figura 20. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6 ou Con A (após imunização).** Grupos de camundongos BALB/c ( $n=12$ ) foram injetados com PBS (G1), 50  $\mu\text{g}$  pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100  $\mu\text{g}$  rLci2B-NH6 (G3), 100  $\mu\text{g}$  rLci2B-NH6/saponina (G4), 50  $\mu\text{g}$  pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100  $\mu\text{g}$  rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot.)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100  $\mu\text{g}$  rLci2B-NH6 associada à 100  $\mu\text{g}$  saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci2B-NH6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A e C) ou Con A a 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtido após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em C e D ( $G1=G3 < G4$ ;  $G2=G5$ ;  $G5 < G4$ ), A e B (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

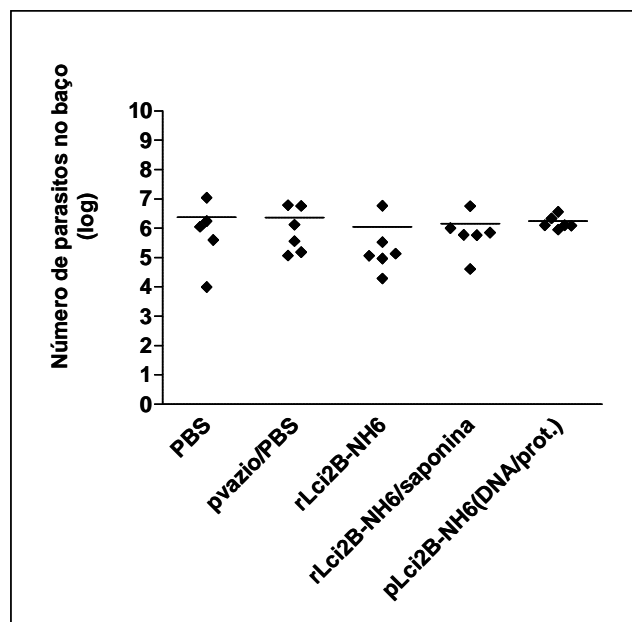


**Figura 21. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6 ou Con A (após imunização e desafio).** Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50  $\mu$ g pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 (G3), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6/saponina (G4), 50  $\mu$ g pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100  $\mu$ g rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B/rLci2B-saponina (DNA/prot)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 associada à 100  $\mu$ g saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Quatro semanas após a terceira dose de injeção, 6 animais de cada grupo foram infectados com  $1 \times 10^7$  *L. chagasi*, por via intraperitoneal. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci2B-NH6 a 10  $\mu$ g/mL (A e C) ou Con A a 2,5  $\mu$ g/mL (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtido após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em C (G1=G3<G4; G2=G5; G5<G4), D (G1=G3<G4; G2=G5), A e B (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

#### 6.4.4 Determinação da carga parasitária no baço

A avaliação da carga parasitária no baço dos animais foi realizada pelo ensaio de diluição limitante, oito semanas após a infecção dos animais com  $1 \times 10^7$  formas promastigotas de *Leishmania*, conforme descrito em material e métodos.

Os valores de média da carga parasitária no baço nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram de  $2,39 \times 10^6$ ;  $2,32 \times 10^6$ ;  $1,11 \times 10^6$ ;  $1,43 \times 10^6$  e  $1,75 \times 10^6$ , respectivamente. Não houve redução de carga parasitária no baço em nenhum dos grupos teste (G3, G4 e G5) (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 22), mostrando assim que o protocolo utilizado não foi capaz de conferir proteção contra infecção dos animais por *L. chagasi*.



**Figura 22. Avaliação da carga parasitária no baço.** Grupos de camundongos BALB/c (n=12) foram injetados com PBS (G1), 50  $\mu$ g pBK-CMVvazio/PBS (G2, pvazio/PBS), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 (G3), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6/saponina (G4), 50  $\mu$ g pBK-CMV-Lci2B-NH6 / 100  $\mu$ g rLci2B-NH6-saponina [G5, pLci2B-NH6 (DNA/prot)]. Os grupos G1, G3 e G4 foram injetados 3 vezes por via subcutânea, enquanto que os grupos G2 e G5 receberam o plasmídeo por via intramuscular seguido de eletroporação, nas duas primeiras doses, e o reforço com PBS (G2) ou 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 associada à 100  $\mu$ g saponina (G5), por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Quatro semanas após a terceira dose de injeção, 6 animais de cada grupo foram infectados com  $1 \times 10^7$  *L. chagasi*, por via intraperitoneal. Os esplenócitos foram cultivados em triplicata de poços, em 12 diluições seriadas quádruplas do macerado do baço (1 mg/mL), por 14 dias. Para determinação da carga parasitária, em cada um dos poços da triplicata de cada animal, foi determinada por visualização em microscópio óptico a última diluição onde foi possível visualizar pelo menos uma *Leishmania* e, em seguida, calculou-se a média geométrica dos três títulos obtidos, assim como o número de parasitos por  $\mu$ g de baço. Para o cálculo da carga parasitária no baço, o título obtido foi multiplicado pelo peso do baço de cada animal (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

## **6.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM AS QUIMERAS LAMP/Lci2-NT-5R-CT ou LAMP/Lci2-NT-CT E REFORÇO COM AS RESPECTIVAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À SAPONINA – PROTOCOLO 5**

Os resultados obtidos até o momento utilizando o antígeno recombinante rLci2B-NH6 mostraram que esse antígeno isoladamente induz uma resposta imune Th2 e que, a utilização de saponina como adjuvante desvia essa resposta para mista Th1/Th2. Como essa proteína possui domínios repetitivos de aminoácidos e essa região pode servir como alvo de ligação de células B, induzindo assim uma resposta imune humoral, resolvemos utilizar uma nova construção sem os domínios repetitivos, a partir de informações do gene que codifica *Lci2B*. Novas construções plasmídeais foram obtidas contendo segmentos dos genes de interesse, assim como as duas proteínas recombinantes (rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2 NT-5R-CT-NH6), conforme descrito em material e métodos. Plasmídeos codificando LAMP foram utilizados para geração das quimeras dessa molécula com os antígenos, a fim de favorecer a apresentação dos peptídeos via MHC de classe II.

Nesse último protocolo utilizado, camundongos BALB/c foram injetados duas vezes com p43.2 (G1), p43.2-LAMP (G2), p43.2-Lci2-NT-5R-CT (G3), p43.2-LAMP-Lci2-NT-5R-CT (G4), p43.2-Lci2-NT-CT (G5), p43.2-LAMP-Lci2-NT-CT (G6), por via subcutânea. Na terceira dose, os animais receberam 100 µg de saponina (G1 e G2), 100 µg de rLci2-NT-5R-CT-NH6 associada à 100 µg saponina (G3 e G4) ou 100 µg de rLci2-NT-CT-NH6 associada à 100 µg de saponina (G5 e G6), também por via subcutânea. Dois dias após a terceira dose, dois animais do grupo G1 foram encontrados mortos.

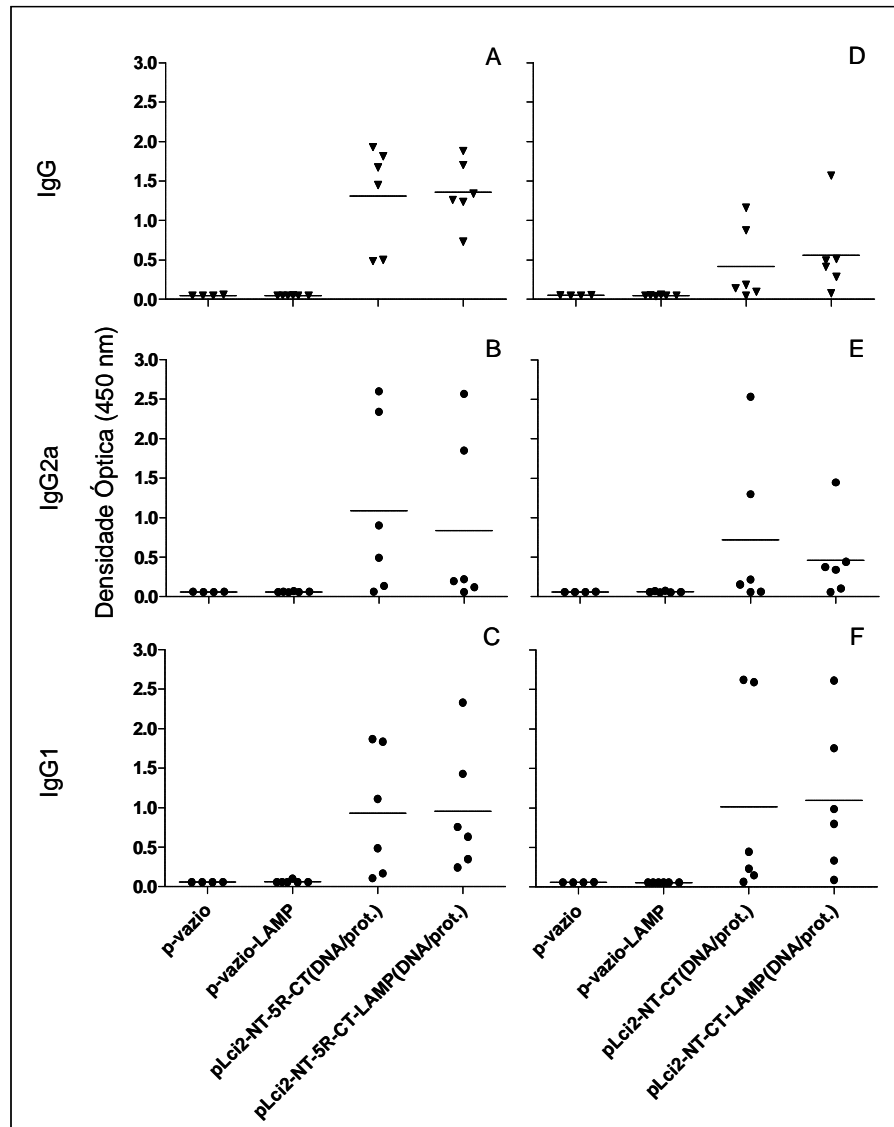
### **6.5.1 Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos aos antígenos rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6**

A resposta imune humoral foi avaliada 10 dias após a terceira dose de injeção quanto a produção de anticorpos antígeno específicos IgG, IgG1 e IgG2a reativos a rLci2-NT-5R-CT-NH6 em amostra de soro de cada animal dos grupos G1, G2, G3 e G4 ou anticorpos reativos a rLci2-NT-CT-NH6 para os grupos G1, G2, G5 e G6. Os valores de densidade óptica, na diluição de 1:200, (IgG, todos os grupos), 1:51.200 (IgG1 e IgG2a, grupos G1, G2, G3 e G4) ou 1:3.200 (IgG1 e IgG2a, grupos G1, G2, G5 e G6), estão representados na Figura 23.

A resposta imune humoral induzida nesse protocolo de imunização foi menos intensa do que a resposta imune observada nos 4 protocolos, cujos resultados foram descritos previamente.

Com relação à produção de IgG, observou-se uma produção heterogênea dessa classe de anticorpos pelos animais dos grupos G3, G4, G5 e G6. A análise estatística revelou diferença significativa apenas entre os grupos G1, G2, G3 e G4 (ANOVA,  $p < 0,001$ ). As comparações entre cada dois grupos mostraram maior concentração de IgG no grupo G3 ( $1,31 \pm 0,65$ ) em relação ao grupo controle G1 ( $0,05 \pm 0,01$ ) e do grupo G4 ( $1,36 \pm 0,40$ ) em relação ao grupo controle G2 ( $0,05 \pm 0,00$ ) (Figura 23 A). A utilização do antígeno fusionado a LAMP não alterou o perfil de produção de IgG. Com relação aos animais que receberam o antígeno sem os domínios repetitivos de aminoácidos, apesar de ter sido observada uma tendência a aumento de produção de IgG pelos grupos G5 ( $0,42 \pm 0,48$ ) e G6 ( $0,56 \pm 0,52$ ) em relação aos controles G1 ( $0,05 \pm 0,00$ ) e G2 ( $0,05 \pm 0,00$ ), esses resultados não foram estatisticamente significantes (ANOVA,  $p > 0,05$  Figura 23D).

Com relação a IgG2a, apesar de terem sido observados valores de  $X \pm SD$  maiores nos grupos G3 ( $1,09 \pm 1,11$ ), G4 ( $0,83 \pm 1,09$ ), G5 ( $0,72 \pm 1,01$ ) e G6 ( $0,46 \pm 0,51$ ), não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos e seus controles, provavelmente, devido a grande variação encontrada em um mesmo grupo experimental (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 23 B e E). Já para IgG1, a concentração desse anticorpo foi maior apenas no grupo G4 ( $0,93 \pm 0,80$ ) em relação a G2 ( $0,06 \pm 0,02$ ). Nos outros grupos (G3, G5 e G6), apesar de alguns animais terem produzido IgG1, a grande variação encontrada dificultou a análise dos resultados (ANOVA,  $p > 0,05$  Figura 23 C e F). Os valores de média da proporção IgG2a/IgG1 foram 1,01; 0,61; 0,78 e 0,54 nos grupos G3, G4, G5 e G6, respectivamente. A utilização da nova construção sem os domínios repetitivos, fusionadas os não a LAMP, não induziu produção predominante de IgG2a antígeno específico.



**Figura 23. Detecção de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 reativos a rLci2-NT-5R-CT-NH6 (A, B e C) ou rLci2-NT-CT-NH6 (D, E e F).** Grupos de camundongos BALB/c ( $n=6$ ) foram injetados com 50  $\mu\text{g}$  p43.2 (G1, pvazio), 50  $\mu\text{g}$  p43.2-LAMP (G2, pvazio-LAMP), 50  $\mu\text{g}$  p43.2-Lci2-NT-5R-CT [G3, pLci2-NT-5R-CT(DNA/prot.)], 50  $\mu\text{g}$  p43.2-rLci2-NT-5R-CT-LAMP [G4, pLci2-NT-5R-CT-LAMP(DNA/prot.)], 50  $\mu\text{g}$  p43.2-Lci2-NT-CT [G5, pLci2-NT-CT(DNA/prot.)] ou 50  $\mu\text{g}$  p43.2-rLci2NT-CT-LAMP (G6, pLci2-NT-CT-LAMP(DNA/prot.)). Os grupos G1 a G6 receberam nas duas primeiras doses 50 $\mu\text{g}$  de cada plasmídeo, por via subcutânea, e na terceira dose os grupos G1 e G2 receberam de 100 $\mu\text{g}$  saponina, os grupos G3 e G4 100  $\mu\text{g}$  rLci2-NT-5R-CT associada à 100  $\mu\text{g}$  saponina e os grupos G5 e G6 100  $\mu\text{g}$  rLci2-NT-CT associada à 100 $\mu\text{g}$  saponina, por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Amostra de soro de cada animal, obtida 10 dias após a terceira dose de injeção, foi avaliada por ELISA, na diluição de 1:200 (IgG, em A e D), 1:51.200 (IgG1 e IgG2a, B e C ) ou 1:3.200 (IgG1 e IgG2a, em E e F). Os símbolos representam valores individuais e as linhas as médias de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p<0,05$ . Em A ( $G1<G3$ ;  $G2<G4$ ), C ( $G1=G3$ ;  $G2<G4$ ), B, D, E e F (ANOVA,  $p>0,05$ ).

### 6.5.2 Avaliação da proliferação de esplenócitos

A resposta linfoproliferativa de esplenócitos *in vitro* foi avaliada no cultivo celular dos animais de cada grupo experimental, na presença de rLci2-NT-5R-CT-NH6 a 10 µg/mL, para animais dos grupos G1, G2, G3 e G4, rLci2-NT-CT-NH6 a 10 µg/mL, para animais dos grupos G1, G2, G5 e G6, antígeno solúvel de amastigotas axênicas de *L. chagasi* a 10 µg/mL ou Con A a 2,5 µg/mL para todos os grupos.

Células de alguns animais dos grupos G3, G4, G5 e G6 proliferaram após estimulação *in vitro* com as respectivas proteínas recombinates (Figura 24). A análise estatística dos dados mostrou que houve diferença apenas entre os grupos cujas células foram cultivadas com rLci2-NT-5R-CT-NH6 (ANOVA,  $p < 0,05$ ). As comparações adicionais revelaram que houve um aumento de IP no grupo G4 ( $5,05 \pm 1,70$ ) em relação ao grupo controle G2 ( $1,21 \pm 0,46$ ) (Figura 24 A). Com relação ao cultivo na presença de rLci2-NT-CT-NH6, apesar de ter sido observada uma tendência a aumento de IP, houve uma variação nos valores individuais de IP e as médias dos grupos não foram estatisticamente significantes (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 24 B).

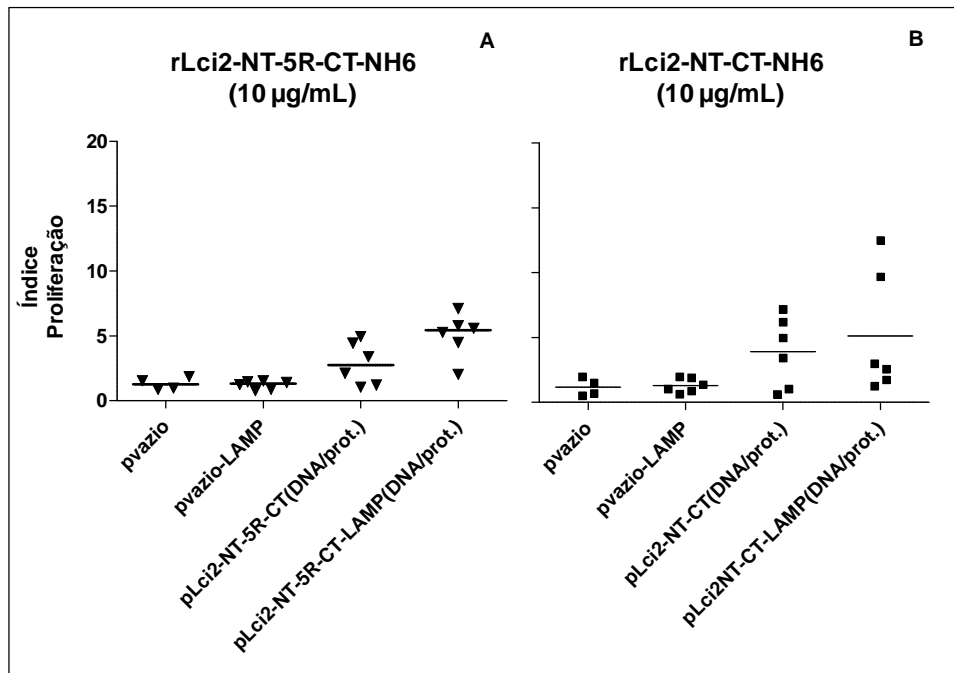
Com relação ao cultivo celular na presença de antígeno solúvel de amastigotas axênicas de *L. chagasi* a 10 µg/mL, não foi observada diferença estatisticamente entre os valores de média de IP dos grupos experimentais (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 25A).

Já no cultivo dessas mesmas células na presença do mitógeno Con A a 2,5 µg/mL, houve proliferação dos esplenócitos dos animais de cada um dos grupos de camundongos, sendo também encontrada uma variação nos valores individuais (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 25 B). Os valores de  $X \pm SD$  obtidos estão na Tabela 11.

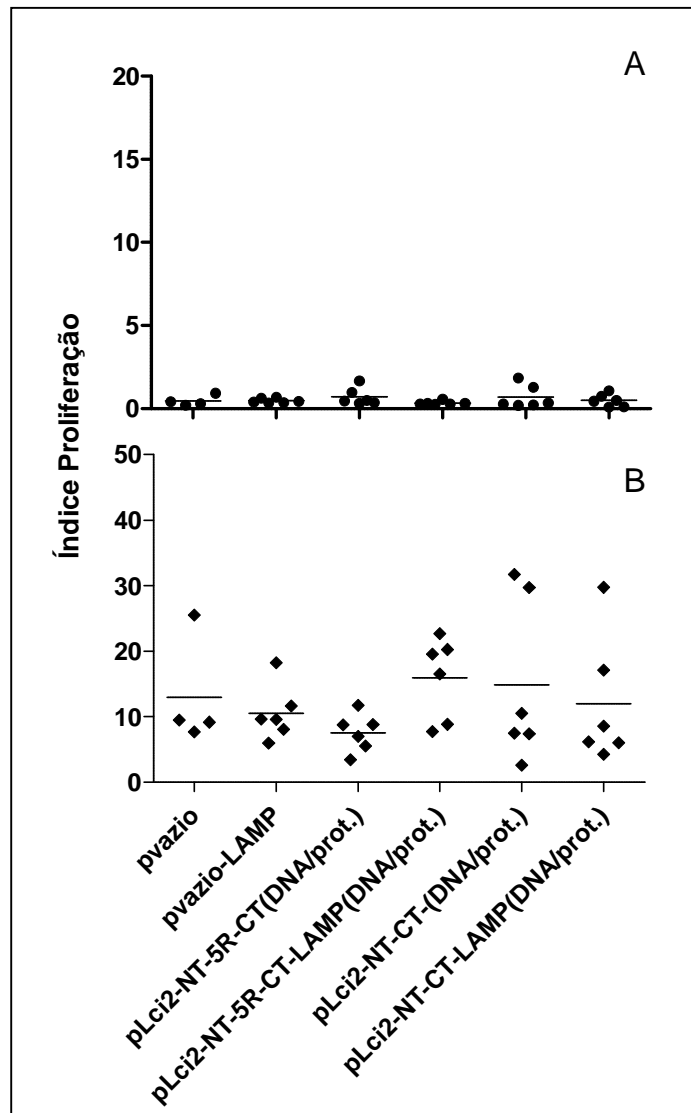
**Tabela 11. Avaliação da resposta linfoproliferativa de esplenócitos cultivados na presença de concanavalina A (protocolo 5)**

Grupos	Índice proliferação (Média $\pm$ desvio padrão)
G1 (p43.2)	50,83 $\pm$ 7,55
G2 (p43.2-LAMP)	50,95 $\pm$ 13,82
G3 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT) DNA/prot.	36,85 $\pm$ 10,85
G4 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP) DNA/prot.	24,43 $\pm$ 10,22
G5 (p43.2-Lci2-NT-CT) DNA/prot.	34,91 $\pm$ 15,60
G6 (p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP) DNA/prot.	33,06 $\pm$ 6,29





**Figura 24.** Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2-NT-5R-CT-NH6 (A) ou rLci2-NT-CT-NH6 (B). Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados com 50 µg p43.2 (G1, pvazio), 50 µg p43.2-LAMP (G2, pvazio-LAMP), 50 µg p43.2-Lci2-NT-5R-CT [G3, pLci2-NT-5R-CT(DNA/prot.)], 50 µg p43.2-rLci2-NT-5R-CT-LAMP [G4, pLci2-NT-5R-CT-LAMP(DNA/prot.)], 50 µg p43.2-Lci2-NT-CT [G5, pLci2-NT-CT(DNA/prot.)] ou 50 µg p43.2-rLci2-NT-CT-LAMP (G6, pLci2-NT-CT-LAMP(DNA/prot.)). Os grupos G1 a G6 receberam nas duas primeiras doses 50µg de cada plasmídeo, por via subcutânea, e na terceira dose os grupos G1 e G2 receberam de 100µg saponina, os grupos G3 e G4 100 µg rLci2-NT-5R-CT associada à 100 µg saponina e os grupos G5 e G6 100 µg rLci2-NT-CT associada à 100µg saponina, por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos de 6 animais de cada grupo ( $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata) foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços, por 5 dias na presença de rLci2-NT-5R-CT-NH6 a 10 µg/mL (A) ou rLci2-NT-CT-NH6 a 10 µg/mL (B) e pulsados com 1 µCi de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Em A (G1=G3, G2<G4), B (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 25. Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com lisado de *L. chagasi* (A) ou Con A (B).** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados com 50  $\mu$ g p43.2 (G1, pvazio), 50  $\mu$ g p43.2-LAMP (G2, pvazio-LAMP), 50  $\mu$ g p43.2-Lci2-NT-5R-CT [G3, pLci2-NT-5R-CT(DNA/prot.)], 50  $\mu$ g p43.2-rLci2-NT-5R-CT-LAMP [G4, pLci2-NT-5R-CT-LAMP(DNA/prot.)], 50  $\mu$ g p43.2-Lci2-NT-CT [G5, pLci2-NT-CT(DNA/prot.)] ou 50  $\mu$ g p43.2-rLci2NT-CT-LAMP (G6, pLci2-NT-CT-LAMP(DNA/prot.)). Os grupos G1 a G6 receberam nas duas primeiras doses 50 $\mu$ g de cada plasmídeo, por via subcutânea, e na terceira dose os grupos G1 e G2 receberam de 100 $\mu$ g saponina, os grupos G3 e G4 100  $\mu$ g rLci2-NT-5R-CT associada à 100  $\mu$ g saponina e os grupos G5 e G6 100  $\mu$ g rLci2-NT-CT associada à 100 $\mu$ g saponina, por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos foram cultivados por 5 dias na presença antígeno solúvel de amastigota axênica de *L. chagasi* a 10  $\mu$ g/mL (A) ou por 3 dias na presença de ConA a 2,5  $\mu$ g/mL (B) e pulsados com 1  $\mu$ Ci de timidina [H]3. Os símbolos representam os valores individuais de índice de proliferação e as linhas indicam as médias dos grupos de animais. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0,05$ .

### 6.5.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ e IL-5)

A produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 foi avaliada, por ELISA de captura, no sobrenadante de cada cultivo celular. O valor mínimo de detecção do ensaio foi de 0,117 ng/mL para IFN- $\gamma$  e 0,062 pg/mL para IL-5.

Com relação ao cultivo celular na presença dos antígenos recombinantes rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6, houve produção detectável de IFN- $\gamma$  apenas em alguns animais dos grupos teste (G3, G4, G5 e G6) e não houve detecção de IL-5 em grupo algum (Figura 26 A e B).

Na presença de Con A, houve detecção tanto de IFN- $\gamma$  quanto IL-5 em todos os grupos de animais, sendo a produção de IFN- $\gamma$  muito mais intensa (ANOVA,  $p > 0,05$ , Figura 27 A e B). Os valores de  $X \pm SD$  encontrados para IFN- $\gamma$  e IL-5 estão nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

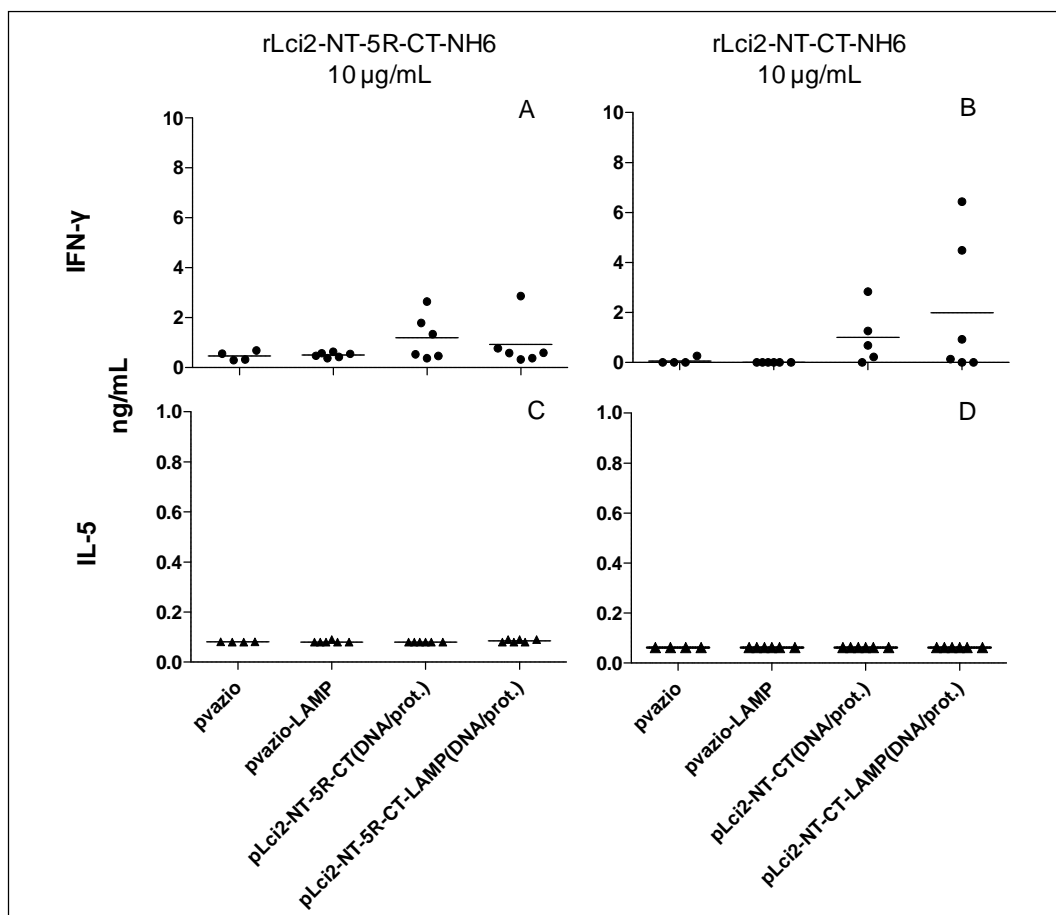
Não houve produção detectável de ambas as citocinas em nenhum dos sobrenadantes dos cultivos celulares, tanto na presença de meio RPMI quanto de antígeno solúvel de amastigotas de *L. chagasi* (dados não mostrados).

**Tabela 12. Concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 5)**

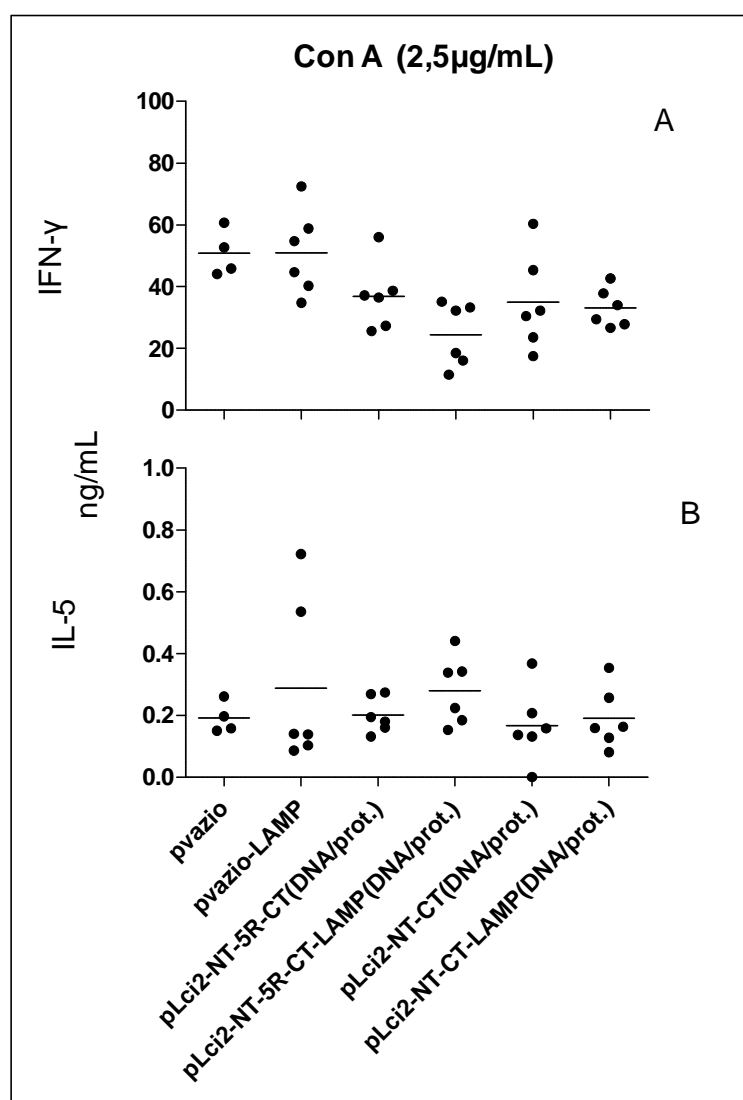
<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (p43.2)	50,83 $\pm$ 7,55
G2 (p43.2-LAMP)	50,95 $\pm$ 13,82
G3 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT) DNA/prot.	36,86 $\pm$ 10,85
G4 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP) DNA/prot.	24,43 $\pm$ 10,22
G5 (p43.2-Lci2-NT-CT) DNA/prot.	34,91 $\pm$ 15,60
G6 (p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP) DNA/prot.	33,06 $\pm$ 6,29

**Tabela 13. Concentração de IL-5 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos na presença de Con A (protocolo 5)**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração (ng/mL) Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1 (p43.2)	0,19 $\pm$ 0,05
G2 (p43.2-LAMP)	0,28 $\pm$ 0,27
G3 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT) DNA/prot.	0,20 $\pm$ 0,05
G4 (p43.2-Lci2-NT-5R-CT-LAMP) DNA/prot.	0,28 $\pm$ 0,11
G5 (p43.2-Lci2-NT-CT) DNA/prot.	0,16 $\pm$ 0,12
G6 (p43.2-Lci2-NT-CT-LAMP) DNA/prot.	0,19 $\pm$ 0,09



**Figura 26.** Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5, por ELISA de captura, após estimulação *in vitro* com rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6. Grupos de camundongos BALB/c ( $n=6$ ) foram injetados com 50  $\mu\text{g}$  p43.2 (G1, pvazio), 50  $\mu\text{g}$  p43.2-LAMP (G2, pvazio-LAMP), 50  $\mu\text{g}$  p43.2-Lci2-NT-5R-CT [G3, pLci2-NT-5R-CT(DNA/prot.)], 50  $\mu\text{g}$  p43.2-rLci2-NT-5R-CT-LAMP [G4, pLci2-NT-5R-CT-LAMP(DNA/prot.)], 50  $\mu\text{g}$  p43.2-Lci2-NT-CT [G5, pLci2-NT-CT(DNA/prot.)] ou 50  $\mu\text{g}$  p43.2-rLci2NT-CT-LAMP (G6, pLci2-NT-CT-LAMP(DNA/prot.)). Os grupos G1 a G6 receberam nas duas primeiras doses 50 $\mu\text{g}$  de cada plasmídeo, por via subcutânea, e na terceira dose os grupos G1 e G2 receberam de 100 $\mu\text{g}$  saponina, os grupos G3 e G4 100  $\mu\text{g}$  rLci2-NT-5R-CT associada à 100  $\mu\text{g}$  saponina e os grupos G5 e G6 100  $\mu\text{g}$  rLci2-NT-CT associada à 100 $\mu\text{g}$  saponina, por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de rLci2-NT-5R-CT-NH6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A e C) rLci2-NT-CT-NH6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B e D). Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtidos após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p>0,05$ .



**Figura 27. Avaliação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-5, por ELISA de captura, após estimulação *in vitro* com Con A.** Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram injetados com 50 $\mu$ g p43.2 (G1, pvazio), 50 $\mu$ g p43.2-LAMP (G2, pvazio-LAMP), 50 $\mu$ g p43.2-Lci2-NT-5R-CT / rLci2B-NT-5R-CT-NH6-saponina [G3, pLci2-NT-5R-CT(DNA/prot.)], 50 $\mu$ g p43.2-rLci2-NT-5R-CT-LAMP / rLci2B-NT-5R-CT-NH6-saponina [G4, pLci2-NT-5R-CT-LAMP(DNA/prot.)], 50 $\mu$ g p43.2-Lci2-NT-CT / rLci2B-NT-5R-CT-NH6-saponina [G5, pLci2-NT-CT(DNA/prot.)] ou 50 $\mu$ g p43.2-rLci2NT-CT-LAMP / rLci2B-NT-5R-CT-NH6-saponina (G6, pLci2-NT-CT-LAMP(DNA/prot.)). Os grupos G1 a G6 receberam nas duas primeiras doses 50 $\mu$ g de cada plasmídeo, por via subcutânea, e na terceira dose os grupos G1 e G2 receberam de 100 $\mu$ g saponina, os grupos G3 e G4 100 $\mu$ g rLci2-NT-5R-CT associada à 100 $\mu$ g saponina e os grupos G5 e G6 100 $\mu$ g rLci2-NT-CT associada à 100 $\mu$ g saponina, por via subcutânea, em intervalos de 21 dias. Os esplenócitos ( $9 \times 10^5$ /poço, em duplicata) foram cultivados em placas de 24 poços na presença de Con A a 2,5  $\mu$ g/mL. Sobrenadantes do cultivo celular de cada animal, obtidos após 48 horas de cultivo, foram avaliados quanto à presença dessas citocinas por ELISA de captura, conforme descrito em material e métodos. Os símbolos representam os valores individuais de cada animal e as linhas representam a média de cada grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA,  $p > 0,05$ .

## 7.0 DISCUSSÃO

Visando à utilização de antígenos de *Leishmania* em método diagnóstico, vacina e terapia para leishmaniose visceral, em nosso laboratório, proteínas recombinantes foram identificadas a partir de bibliotecas genéticas de *Leishmania chagasi* (cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2), construídas em fago lambda (ZAP Express, Stratagene, La Jolla, CA, EUA). No processo de triagem da biblioteca, 30 clones de fagos recombinantes contendo segmento de cDNA de *L. chagasi* foram selecionados pela reatividade das proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli* a anticorpos de uma mistura de soros de quatro cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, que apresentavam resposta imune humoral e celular específica (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Antígenos recombinantes codificados por cinco diferentes genes foram selecionados e os insertos foram denominados *Lci1*, *Lci2*, *Lci3*, *Lci4* e *Lci30*. Clones de fago lambda codificando 4 antígenos diferentes (rLci1A, rLci2B, rLci3A, rLci4A) foram excisados dando origem às construções plasmideais *pBK-CMV-Lci1A*, *pBK-CMV-Lci2B*, *pBK-CMV-Lci3A* e *pBK-CMV-Lci4A*, apropriados para a expressão em *E. coli* e em mamíferos. Os insertos dessas construções foram, separadamente, transferidos para o plasmídeo *pRSET*, que é capaz de induzir a produção das respectivas proteínas em *E. coli* da cepa BL21(DE3)pLysS com uma cauda de seis histidinas na extremidade amina (OLIVEIRA *et al.*, 2011, submetido à publicação). Dentre esses quatro antígenos produzidos por *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada por construção plasmideal em *pRSET*, dois foram escolhidos arbitrariamente para serem utilizados no presente trabalho. Adicionalmente, para avaliar a influência de domínios repetitivos sobre a qualidade da resposta imune, foi concebida uma construção de DNA (*Lci2-NT-CT*) codificando a seqüência não repetitiva de 701 AA da NT codificada pelo gene da cinesina (BURNS *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007) e seqüência não repetitiva de 76 AA da CT de rLci2B-NH6 (*LinJ14\_V3.1180*; GERALD *et al.*, 2007), apropriada para produzir a proteína recombinante rLci2-NT-CT-NH6, usando-se plasmídeo *pRSET* (Figura 1B). Além disso, outra construção de DNA foi concebida (*Lci2-NT-5R-CT*), adequada para produzir uma proteína recombinante contendo 5R entre os domínios das NT e CT, denominada rLci2-NT-CT-NH6, usando-se plasmídeo *pRSET* (Figura 1C).

Alguns protocolos de imunização já foram realizados por nosso grupo, utilizando especialmente o antígeno recombinante rLci2B-NH6 associado a adjuvantes ou os antígenos Lci1A, Lci2B, Lci3A e Lci4A na forma de DNA plasmideal. No entanto, nenhum dos protocolos até então avaliados com esses antígenos mostrou-se eficaz na indução de uma resposta imune celular Th1 intensa (dados não publicados).

No presente trabalho, a resposta imune humoral e celular induzida por 4 antígenos recombinantes de *L. chagasi* foi avaliada em diferentes protocolos de imunização. Visando à indução de resposta imune celular do tipo Th1, algumas estratégias foram utilizadas, sendo elas: (I) utilização dos antígenos associados a moléculas imunomoduladoras, reconhecidamente capazes de induzir uma resposta imune celular do tipo Th1, (II) administração de plasmídeos codificando os antígenos de interesse seguido de reforço com a proteína, sistema *prime – boost*, (III) utilização de quimera composta por um antígeno sem motivos repetitivos de aminoácidos e LAMP, a fim de direcionar a apresentação dos antígenos para células TCD4+ via MHC classe II. Além disso, optou-se por utilizar camundongos nesses experimentos, a fim de que as diferentes estratégias fossem avaliadas primeiramente nesse modelo animal, para depois selecionar os protocolos a serem utilizados em cães.

Inicialmente, os antígenos utilizados no presente trabalho foram rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6. A proteína recombinante rLci4A-NH6 corresponde a um segmento da extremidade carboxila (CT) da poli-ubiquitina codificada pelo *LinJ36\_V3.3690* (OLIVEIRA *et al.*, submetido a publicação), sendo composto por uma cauda de seis histidinas (NH6), seguidos  $\approx 2,3$  segmentos repetitivos de 76 aminoácidos (Figura 1D). Já rLci2B-NH6 corresponde a um segmento da CT de uma cinesina codificada pelo gene *LinJ14\_V3.1180* (BURNS, *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007). Esse antígeno possui uma cauda NH6, seguidos de um segmento com 5,5 motivos repetitivos de 39 AA (5R) e um segmento não repetitivo de 76 AA (Figura 1A).

Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que a injeção em camundongos de um plasmídeo codificando a proteína Lci4A induz a produção significativa de anticorpos IgG1 e IgG2a antígeno específicos, proliferação celular e produção detectável de IFN- $\gamma$ , porém não significativa (SANTOS, 2007). Sendo assim, um novo protocolo de imunização foi realizado utilizando esse mesmo antígeno, no entanto, na forma de proteína, associada ou não a adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune celular Th1.

Os resultados encontrados nos dois primeiros protocolos avaliados nesse trabalho mostraram que rLci4A-NH6, utilizada na forma de proteína, sem adjuvante algum, induz uma resposta imune tipicamente humoral, com produção predominante de anticorpos IgG1. Por outro lado, a utilização de saponina (Quil A) ou ODN 1826 como adjuvante induz produção significativa de IgG1, IgG2a e uma tendência a aumento de IFN- $\gamma$  e proliferação celular de esplenócitos. Os resultados para produção de IL-5 não foram reprodutíveis nos dois protocolos, sendo detectada apenas a presença dessa citocina no sobrenadante do cultivo dos



esplenócitos dos animais que receberam rLci4A-NH6 e saponina, no protocolo 2. Contudo, esse grupo experimental também se destaca quando as células dos animais são cultivadas com o mitógeno concanavalina A. Curiosamente, a utilização de diferentes doses de um plasmídeo codificando IL-12 murina falhou em promover uma resposta imune celular predominantemente Th1. Nos três grupos que receberam IL-12, houve uma produção predominante de anticorpos IgG1 e não houve uma produção significativa de IFN- $\gamma$  nem proliferação celular em nenhum dos grupos.

Com relação ao uso de rLci2B-NH6, em estudos prévios realizados por nosso grupo, a resposta imune induzida por esse antígeno, isoladamente ou em associação com adjuvantes compatíveis com o uso no cão (saponina Quil A, hidróxido de alumínio, adjuvante de Freund e plasmídeo codificando IL-12 murina – pcDNA3.1-scmu-IL12), foi avaliada em camundongos BALB/c. Nesse experimento, demonstrou-se que a utilização de rLci2B-NH6, isoladamente, induz uma resposta imune do tipo Th2 e, dentre os adjuvantes utilizados, apenas a saponina foi capaz de modificar a resposta imune induzida pelo antígeno para uma resposta mista (Th1/Th2), caracterizada pela produção de IgG1 e IgG2a, IFN- $\gamma$ , IL-5 e linfoproliferação de esplenócitos, sugerindo um desvio parcial da resposta imune em direção a Th1 (FRAGA, 2007). Nesse mesmo estudo não foi observada uma indução de resposta imune Th1 pelos animais que receberam rLci2B-NH6 e 50  $\mu$ g de pcDNA3.1-scmu-IL-12 em três doses de injeção. Suspeitou-se que a administração de três doses do plasmídeo contendo inserto de IL-12 tenha sido tóxica e, portanto, não tenha induzido o efeito desejado. Essa hipótese foi reforçada em outro experimento, no qual foi observado aumento de baço, fígado e linfonodos de camundongos BALB/c 10 dias após uma única administração de 50  $\mu$ g de pcDNA3.1-musc-IL-12 em comparação aos órgãos dos animais que receberam o plasmídeo sem inserto, sugerindo um efeito tóxico. Portanto, diferentes doses (50, 10, 0,2  $\mu$ g) de pcDNA3.1-musc-IL-12 foram utilizadas apenas na primeira dose de administração junto com rLci2B-NH6 associada à saponina a fim de tentar promover um desvio da resposta imune Th1/Th2 para predominantemente ou exclusivamente Th1. Surpreendentemente, nenhuma das doses de pcDNA-muIL-12 utilizadas foi capaz de modificar a resposta imune Th1/Th2 (PINHEIRO, 2007). Acredita-se que a resposta imune induzida pela combinação de rLci2B-NH6 e saponina tenha sido muito intensa, não permitindo que o fornecimento adicional de IL-12, conseqüente à administração do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, levasse a um efeito aditivo.

Diante dos resultados acima descritos, um novo protocolo foi realizado nesse trabalho (protocolo 3) utilizando os mesmos adjuvantes dos protocolos 1 e 2 (saponina, ODN 1826 e

doses diferentes de pcDNA3.1A-muIL-12. No entanto, diferentemente do experimento realizado anteriormente (PINHEIRO, 2007), doses de 50, 10 ou 0,2 µg de pcDNA3.1A-muIL-12 foram co-administradas apenas com o antígeno rLci2B-NH6 isoladamente, na primeira dose de injeção. A ausência da saponina nessa combinação poderia levar a uma resposta imune menos intensa e a adição de IL-12 poderia desviar a resposta imune de Th2 para Th1. Os resultados desse novo protocolo mostraram que o antígeno utilizado isoladamente ou associado à saponina induziu, em parte, resultados semelhantes aos encontrados anteriormente por Fraga (2007), e que o uso de ODN 1826 com rLci2B-NH6, apesar de favorecer a indução de uma maior concentração de IgG2a, não alterou o perfil de resposta imune já induzido pelo antígeno por si só. Além disso, também não houve mudança no perfil de resposta imune com o uso de alguma das doses de pcDNA3.1A-muIL-12.

Os resultados encontrados aqui, referentes ao uso dos antígenos rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6 associados à saponina, ODN 1826 ou IL-12 mostraram que não foi possível a obtenção de uma resposta imune celular exclusivamente ou predominantemente Th1 em nenhuma condição testada. As razões pelas quais esses adjuvantes não terem favorecido esse tipo de resposta ainda não estão bem esclarecidas.

Apesar de trabalhos demonstrarem que a utilização da saponina Quil A com um antígeno de *L. donovani* (rORFF) induz uma resposta imune celular Th1 capaz de promover a redução de carga parasitária no fígado (SANTOS *et al.*, 2002), alguns estudos têm mostrado que, geralmente, há também indução concomitante de resposta Th2 com o uso desse adjuvante (TADOKORO *et al.*, 1996). Como nossos dois antígenos, rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6, por si só, já induzem uma resposta predominantemente humoral, o uso da saponina utilizada nesse trabalho, a Quil A, apesar de favorecer a geração de resposta imune celular, provavelmente não é capaz de promover uma resposta Th1 intensa quando associado aos nossos antígenos. Uma alternativa poderia ser a utilização em estudos futuros de uma das frações da Quil A como, por exemplo, a QS-21, uma vez que estudos têm demonstrado que essa fração é mais potente no que diz respeito à indução de anticorpos IgG2a antígeno específico (KENSIL *et al.*, 1991). Além disso, outro tipo de saponina, denominada Riedel De Haen, vem sendo promissora em formulações vacinais, induzindo resposta Th1, com redução de carga parasitária de 73% no fígado de camundongos imunizados com a proteína FML associada a esse adjuvante e infectados com *L. donovani* (SANTOS *et al.*, 2002), assim como indução de proteção parcial no baço de 5 de 7 cães imunizados com a proteína recombinante A2 e Riedel e infectados com *L. chagasi* (FERNANDES *et al.*, 2008).

Com relação ao uso de oligodeoxinucleotídeos (CpG-ODN), alguns trabalhos na literatura têm utilizado com sucesso a sequência ODN 1826, induzindo resposta imune celular Th1. Como exemplo disso, Tewary e colaboradores (2004) demonstraram que essa sequência de CpG-ODN é um potente adjuvante na resposta imune protetora em camundongos imunizados com rORFF/ODN 1826. Observou-se, nesses animais, o aumento de proliferação celular e concentrações de IL-12 e IFN- $\gamma$ , além de redução parcial de carga parasitária no baço e fígado. Em nossos protocolos, observamos uma tendência à indução de resposta imune Th1 quando ODN 1826 foi associado principalmente à rLci4-NH6. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa com relação à produção de IFN- $\gamma$  ou proliferação celular. Contudo a média entre os valores da proporção de IgG2a/IgG1 sugeriram que realmente houve uma mudança no perfil de produção dessas subclasses de anticorpos, sendo essa proporção 5 ou 9 vezes maior com relação ao uso do antígeno isoladamente, nos protocolos 1 e 2, respectivamente. Duas possibilidades podem ser aventadas para tentar justificar as diferenças encontradas entre os experimentos de Tewary e os nossos. A primeira é que pelo fato da utilização apenas do antígeno rORFF já induzir uma resposta imune celular, essa resposta é intensificada pelo uso de ODN 1826. A outra é que os antígenos, apesar de terem sido administrados com a mesma dose de ODN 1826 (10  $\mu$ g), as vias utilizadas foram diferentes, sendo intramuscular e subcutânea nos estudos de Tewary e no nosso trabalho, respectivamente.

Já com relação ao uso de IL-12, diversos estudos na literatura mostraram que a co-administração dessa citocina, na forma de proteína ou plasmídeo codificando IL-12, juntamente com alguns antígenos pode promover intensificação ou desvio para uma resposta imune Th1 (SYPEK *et al.*, 1993; AFONSO *et al.*, 1994; GURUNATHAN *et al.*, 1998; YAMAKAMI *et al.*, 2001; TEWARY *et al.*, 2006). Surpreendentemente, os animais injetados com rLci4A-NH6 ou rLci2B-NH6 e doses diferentes de pcDNA3.1-scmu-IL-12 não apresentaram uma resposta imune Th1. Algumas possibilidades podem ser levantadas para explicar a falha de indução desse perfil de resposta imune, dentre elas a qualidade do DNA plasmideal ou a quantidade de plasmídeo injetado, que poderia ter sido insuficiente para geração da resposta imune desejada.

A construção plasmideal pcDNA-scmu-IL-12 utilizada em todos os experimentos aqui descritos foi obtida em nosso laboratório pela subclonagem do inserto do plasmídeo pCI-neo-IL-12, gentilmente cedido pela Dra. Emanuela Handman (Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália, Noormohammadi *et al.*, 2001), para o pCDNA3.1. A sequência do inserto do pcDNA3.1-scmu-IL-12 analisada revelou substituição de um nucleotídeo em quatro

códons diferentes, em relação ao inserto da construção plasmideal pCI-neo-IL-12, sendo que a substituição em um dos códons foi feita de modo deliberado para a introdução da seqüência Kozak (KOZAK, 1986), para favorecer síntese da proteína recombinante em células de mamífero. As outras três substituições introduzidas, não intencionalmente, provavelmente durante a PCR realizada no processo de subclonagem, não implicam em alterações de aminoácido da cadeia polipeptídica. Para demonstração da atividade biológica da IL-12 codificada pelo plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, um experimento foi realizado, no qual a concentração de IFN- $\gamma$  foi avaliada no soro de camundongos BALB/c injetados com 50  $\mu$ g de pcDNA3.1 sem inserto ou pcDNA3.1-scmu-IL-12, seguido de eletroporação ou não. Os animais que receberam pcDNA3.1 sem inserto por eletroporação ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação apresentaram valores abaixo ou próximos ao limite inferior de detecção do ensaio (15 pg/mL), enquanto que os camundongos que receberam pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação produziram cerca de 3 ng/mL de IFN- $\gamma$  (BARROUIN-MELLO *et al.*, dados não publicados), demonstrando assim que houve uma produção de IFN- $\gamma$  dependente de IL-12. Com relação à qualidade da construção plasmideal, o plasmídeo purificado e utilizado no presente trabalho apresentou boa integridade, com visualização de bandas bem definidas em gel de agarose e relação de densidade óptica a 260/280 nm de 1,8. Além disso, imediatamente após a administração do plasmídeo no músculo dos animais, pulsos elétricos foram aplicados com o uso de um aparelho eletroporador, com a finalidade de aumentar a permeabilidade celular para entrada do DNA plasmideal nas células dos animais e, conseqüentemente a produção de IL-12.

O método de eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos que abrem poros na membrana pelos quais polinucleotídeos, ou outras macromoléculas de interesse, podem passar para alcançar o interior das células. Posteriormente, esses poros são fechados e as moléculas internalizadas podem exercer seus efeitos biológicos (SOMIARI *et al.* 2000). Vários fatores podem influenciar na eficiência de transfecção de plasmídeos administrados por eletroporação, incluindo fatores relacionados aos pulsos elétricos aplicados (MIR *et al.*, 1999). Por isso, as condições utilizadas nesse trabalho foram baseadas em um estudo presente na literatura, no qual os autores testaram diferentes condições de eletroporação em células musculares de camundongos, como baixa voltagem e intervalo entre os pulsos em milissegundos ou alta voltagem e intervalo entre pulsos em microsegundos (LUCAS; HELLER, 2001). Esses autores definiram parâmetros para eletroporação utilizando um plasmídeo codificando IL-12 murina, os quais proporcionaram um aumento na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  no soro dos animais.

Outra possibilidade para explicar os resultados mencionados acima poderia ser que uma única dose do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 tenha sido insuficiente para induzir uma resposta imune Th1. No entanto, conforme já mencionado, uma única dose de 50 µg de pcDNA3.1A-scmu-IL-12 em camundongos BALB/c provavelmente foi tão intensa que levou a efeitos tóxicos levando a um aumento de baço, fígado e linfonodos (PINHEIRO, 2007). Trabalhos presentes na literatura utilizando plasmídeo codificando IL-12 em camundongo têm mostrado uma supressão da resposta Th1, provavelmente decorrente da indução de apoptose de células T devido a altas concentrações de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico (KOBUSHI *et al.*, 1998; LASARTE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001). Pelo fato de dados na literatura sugerirem que a administração de IL-12 durante o reforço da imunização pode não ser benéfica para a indução de resposta imune Th1 (GHERARDI, *et al.*, 2000), não podemos afastar a possibilidade que doses menores (10 µg, 2 µg ou 0,4 µg) possam induzir uma resposta Th1 se forem administradas duas ou três vezes nos animais.

Além disso, as vias de administração dos antígenos rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6 (subcutânea, no dorso) e pcDNA3.1-scmu-IL-12 (intramuscular, no membro inferior) podem não ter proporcionado o encontro de células apresentadoras de antígeno, antígenos e IL-12 em quantidades adequadas em um mesmo órgão linfóide (linfonodo de drenagem). Com base nos resultados descritos na literatura científica, as conseqüências da administração de IL-12 podem variar na dependência da quantidade e o número de doses utilizadas e o processo de otimização do seu uso pode ser difícil devem ser criteriosamente avaliados.

Uma nova estratégia de indução de resposta imune Th1, *DNA prime protein booster*, vem sendo utilizada, na qual há uma sensibilização dos animais com plasmídeos codificando antígenos recombinantes e reforço com as proteínas purificadas, associadas ou não a adjuvantes (IBORRA, 2003; TEWARY *et al.*, 2005; RAFATI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Além disso, um estudo comparando a potência, eficácia e durabilidade da imunização em camundongos utilizando DNA/DNA, DNA/proteína ou proteína/proteína com uma proteína de superfície de *Leishmania donovani* (gp63) mostrou que a imunização com DNA/proteína, ou seja, sensibilização com DNA e reforço com a proteína, induziu uma resposta imune celular duradoura e mais intensa do que a utilização apenas de DNA ou proteína isoladamente (MAZUMDER *et al.*, 2001).

Utilizando essa estratégia no nosso laboratório, Santos em 2007, demonstrou que camundongos BALB/c injetados duas vezes com plasmídeo contendo inserto de rLci2B-NH6 e que na terceira dose receberam a proteína recombinante associada à saponina (pBK-CMV-rLci2B-NH6 / rLci2B-NH6-saponina) apresentaram uma resposta imune celular específica

Th1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , proliferação celular e anticorpos antígeno específicos da subclasse IgG2a e ausência de IL-5 e produção de IgG1 não significante. Com base nesses resultados, o protocolo 4 de imunização foi realizado, no qual foi utilizado o mesmo grupo experimental citado acima (pBK-CMV-rLci2B-NH6 / rLci2B-NH6-saponina). Porém, 2 meses após o reforço com rLci2B-NH6/saponina os animais foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi* para avaliação de resposta imune protetora no que diz respeito a carga parasitária no baço dos animais. Os resultados desse experimento mostraram que houve geração de uma resposta imune celular Th1, no entanto, de baixa intensidade e não homogênea. Além disso, não houve redução de carga parasitária no baço. Apesar de não ter sido possível induzir uma resposta Th1 protetora, conseguimos mostrar que essa estratégia levou a uma mudança de perfil de resposta imune induzida pela administração do antígeno isoladamente, de Th2 para Th1 fraca. Talvez, a escolha de outro adjuvante para ser administrado junto com a proteína possa intensificar a resposta Th1 gerada. Uma possibilidade poderia ser o uso de ODN 1826, conforme foi utilizado recentemente no trabalho de Mazunder e colaboradores (2011), no qual foi demonstrado que houve uma redução de carga parasitária no fígado e baço  $10^7$  e  $10^{10}$  vezes, respectivamente, em animais imunizados com plasmídeo codificando gp63 + ODN1826 e receberam reforço com a proteína + ODN 1826.

Os resultados obtidos até então nesse trabalho mostraram que, apesar de imunogênicos em camundongos, os antígenos recombinantes utilizados, associados ou não a adjuvantes, ou ainda, administrados como DNA/proteína não induziram uma resposta predominantemente celular Th1 intensa ou protetora contra infecção com o parasito.

Trabalhos na literatura sugerem que antígenos compostos por motivos repetitivos de aminoácidos podem servir de alvos de ligação de linfócitos B e, portanto, favorecer a geração de uma resposta imune humoral (GOTO *et al.*, 2006; DEY *et al.*, 2008).

Conforme mencionado no capítulo de material e métodos, a proteína recombinante obtida em nosso laboratório (rLci2B-NH6) é composta por aproximadamente 5,5 domínios repetitivos de 39 aminoácidos e uma região não repetitiva amino-terminal. Acredita-se que os motivos repetitivos de aminoácidos presentes nesse antígeno estejam exercendo um papel significativo na indução de resposta Th2. Pensando assim, visando avaliar o papel desses motivos repetitivos 5R na indução da resposta imune Th2, resolvemos utilizar um novo antígeno sem os 5R.

Uma nova molécula foi sintetizada quimicamente por uma empresa biotecnológica, conforme descrito no ítem 4.2 (Figura 2) e a partir daí, obtivemos novas construções

plasmídeos, assim como novos antígenos purificados. Esses novos antígenos codificam a sequência não repetitiva de 701 AA da NT codificada pelo gene da cinesina (BURNS *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007) e sequência não repetitiva de 76 AA da CT de rLci2B-NH6 (*LinJ14\_V3.1180*; GERALD *et al.*, 2007), gerando *Lci2-NT-CT*, ou com os domínios 5R de rLci2B, *Lci2-NT-5R-CT*, sendo esta última utilizada como controle no ensaio. Essas construções foram subclonadas em plasmídeo *pRSET* para purificação das respectivas proteínas, assim como para um plasmídeo apropriado para expressão de proteínas em células eucariotas, contendo ou não o gene que codifica para uma proteína transmembrana associada a lisossomos (LAMP), descrita por Chen e colaboradores (1985). Alguns trabalhos, incluindo relatos do grupo do pesquisador Ernesto T. A. Marques, que nos cedeu o plasmídeo contendo LAMP (*p43.2-LAMP*), têm demonstrado que antígenos fusionados a essa molécula são capazes de gerar uma intensa atividade T-citotóxica e maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específico em comparação aos mesmos antígenos não fusionados ao LAMP (MARQUES *et al.*, 2003; CHIKHLIKAR *et al.* 2004; ANWAR *et al.*, 2005; ARRUDA *et al.*, 2006).

Nesse último protocolo de imunização foram utilizados plasmídeos codificando as novas construções e reforço com as respectivas proteínas recombinantes associadas à saponina. Os resultados observados não foram satisfatórios. Animais que receberam o plasmídeo contendo esses novos antígenos, fusionados ou não a LAMP, apresentaram uma baixa produção de anticorpos antígeno específico e, além disso, essa produção foi bastante heterogênea entre os animais de um mesmo grupo experimental. Talvez, a fraca resposta imune humoral pudesse ter ocorrido devido à indução de uma resposta predominantemente Th1. Entretanto, surpreendentemente, não houve uma indução de resposta imune celular significativa. Contudo, aumento significativo de proliferação celular pelos animais que receberam a quimera *Lci2-NT-5R-CT* com LAMP e uma tendência a aumento com a quimera *Lci2-NT-CT*.

Dey e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos que receberam duas doses de um plasmídeo codificando o domínio motor da cinesina de *L. donovani* (rLvacc) desenvolveram uma resposta imune específica celular do tipo Th1. Essa proteína rLvacc é composta por aproximadamente 300 aminoácidos, os quais correspondem a um fragmento da região N-terminal (NT) da construção sintetizada quimicamente e utilizada no presente trabalho. Por esse motivo, esperávamos que a utilização da construção sem os domínios repetitivos 5R (*Lci2-NT-CT*) fosse capaz de induzir uma resposta imune celular Th1.

Analisando os 5 protocolos aqui descritos, observou-se que, na maioria das vezes, houve uma dispersão grande nos resultados obtidos em um mesmo grupo experimental o que, conseqüentemente, dificultou a análise estatística dos dados. Contudo, no protocolo 5, observou-se a geração de uma fraca resposta imune humoral, na qual alguns animais dos grupos teste não produziram anticorpos antígeno específicos. Conforme mostrado na Figura 5, os dois antígenos purificados, rLci2-NT-5R-CT-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6, encontravam-se degradados. Ainda não sabemos em qual etapa da produção desses antígenos ocorreu essa degradação. Entretanto, apesar de um coquetel de inibidores de proteases ter sido adicionado ao tampão de lise no processo de purificação das proteínas e mesmo assim os resultados obtidos terem sido semelhantes ao encontrado na Figura 5, uma avaliação mais criteriosa precisa ser feita. A utilização dessas proteínas degradadas pode ter levado a perda de epítomos importantes para geração de uma resposta imune específica.

Outra possibilidade que pode ser levantada para explicar a fraca resposta imune encontrada, é que nesse último protocolo, os plasmídeos foram administrados pela via subcutânea e não intramuscular com eletroporação como foi realizado anteriormente. A Escolha dessa via de administração foi motivada devido ao estudo publicado por Arruda e colaboradores (2006), no qual a administração de um plasmídeo contendo quimera de uma proteína do vírus da imunodeficiência humana com LAMP (LAMP/Gag), por via subcutânea, induziu uma intensa resposta Th1, caracterizada pela produção predominante de IgG2a, IFN-gama e baixa produção de IL-4. Contudo, nesse experimento, o reforço foi realizado com  $10^7$  unidades formadoras de placas do vírus recombinante da vaccínia contendo a proteína de interesse, rVV-gag-pol, o que pode ter contribuído para intensidade da resposta observada pelos autores.

Com relação aos plasmídeos utilizados nesse protocolo, as construções produzidas e purificadas apresentaram boa integridade, com visualização de bandas bem definidas em gel de agarose e relação de densidade óptica a 260/280 nm de 1,8. Apesar de esses resultados sugerirem que os plasmídeos estavam em boa qualidade, estudos para verificação da expressão das proteínas em células de mamíferos *in vitro* não foram realizados.

Em outro estudo realizado por nosso grupo, no qual camundongos foram injetados com os antígenos recombinantes rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2-NT-CT-NH6 associados à saponina, a produção de anticorpos, apesar de ter menos intensa quando comparada aos outros protocolos já avaliados por nós, foi homogênea nos grupos experimentais (TEIXEIRA, 2011). Isso nos leva a suspeitar também que a grande variação encontrada em um mesmo grupo



experimental pode ser atribuída à via a administração dos plasmídeos, que pode ter levado à transfecção de células *in vivo* de forma diferente nos animais.

Diante disso, torna-se necessária a identificação de qual etapa do processo de produção ou purificação desses dois antígenos recombinantes está ocorrendo a degradação das proteínas. É de fundamental importância a obtenção de amostras protéicas íntegras para serem utilizadas em novos protocolos de imunização. Além disso, experimentos necessitam ser realizados para verificar se as construções plasmídeais estão de fato sendo capazes de produzir as proteínas após a administração nos animais. Nesse novo protocolo de imunização, a administração dos plasmídeos será realizada pela via intramuscular, seguida de eletroporação, visando facilitar a penetração das moléculas de DNA nas células musculares dos animais.

A realização desse trabalho permitiu o conhecimento da resposta imune induzida por alguns antígenos de *L. chagasi* utilizando diferentes abordagens de imunização e um conjunto de metodologias aplicadas à biotecnologia. Outros antígenos de *Leishmania* estão disponíveis em nosso laboratório para serem avaliados em novos protocolos de imunização.

## 8.0 CONCLUSÕES

- Os antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* rLci4A-NH6 e rLci2B-NH6 são imunogênicos em camundongos;
- Camundongos imunizados com rLci4A-NH6 ou rLci2B-NH6 associados aos adjuvantes saponina, ODN 1826 ou pIL-12 não apresentaram resposta imune celular específica predominantemente Th1;
- A imunização de camundongos com plasmídeos codificando Lci2B e reforço com a proteína associada à saponina induziu resposta imune celular fraca, a qual não foi capaz de conferir proteção contra infecção dos animais;
- A utilização das quimeras Lci2-NT-5R-CT/LAMP e Lci2-NT-CT/LAMP induziu uma fraca resposta imune nos animais, provavelmente devido a degradação protéica

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*, obtidos em nosso laboratório, são imunogênicos no modelo murino. Entretanto, outras estratégias precisam ser utilizadas a fim de se conseguir a indução de resposta imune predominantemente celular Th1 intensa contra o parasito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEICAO-SILVA, F. M. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J Parasitol**, 77: 557-561, 1991.

AFONSO, L.C.C; SCHARTON, T. M.; VIEIRA, L.Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, 263(5144): 235-237, 1994.

ALBORZI, A., M. RASOULI, *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. **Am J Trop Med Hyg** 74(2): 306-7, 2006.

ALVAR, J.; YACTAYO, S. BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Triends in parasitology**, 22 (12), 552-7, 2006.

ANWAR, A.; CHANDRASEKARAN, A.; NG, M.L.; MARQUES, E.; AUGUST, J.T. West Nile pre-membrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. **Virology**, 332(1):66-77, 2005.

ARRUDA, L. B.; CHIKHLIKAR, P. R.; AUGUST, J. T.; MARQUES, E. T., DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. **Immunology**, 112 (1): 126-33, 2004.

ARRUDA, L. B., D. SIM, Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. **J Immunol**, 177(4): 2265-75, 2006.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, 30(12-13):1269-81, 2000.

BACELLAR, O., A. D'OLIVEIRA, JR., IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, 12(8): 1228-31, 2000.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, 154(4):639-649, 1986.

BALEEIRO, C. O., PARANHOS-SILVA, M., DOS SANTOS, J. C., OLIVEIRA, G. G., NASCIMENTO, E. G., DE CARVALHO, L. P., DOS-SANTOS, W. L. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area, **Vet Parasitol**, 2006.

BANETH, G. AND S. E. SHAW. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, 106(4): 315-24, 2002.

BARRAL, A., D. PEDRAL-SAMPAIO, Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, 44(5): 536-46, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human\_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz J Med Biol Res**, 31(1):149-155, 1998.

BERRAHAL F, MARY C, ROZE M, BERENGER A, ESCOFFIER K, LAMOUREUX D, DUNAN S., Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**, 55: 273-7, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 120p, 2003.

BUFFET, P. A., A. SULAHIAN, Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob Agents Chemother**, 39(9): 2167-8, 1995.

BURNS JM, JR., SHREFFLER WG, BENSON DR, GHALIB HW, BADARO R, REED SG., Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 775-9, 1993.

CARVALHO E. M, BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, BARRAL-NETTO M, BADARO R, ROCHA H, JOHNSON WD, JR., Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J Infect Dis**, 165: 535-40, 1992.

CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, W. D. JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J Clin Invest**, 76(6):2066-2069, 1985.

CHEN, H. W., C. H. PAN, H. W. HUAN, M. Y. LIAU, J. R. CHIANG et al., Suppression of immune response and protective immunity to a Japanese encephalitis virus DNA vaccine by co-administration of an IL-12-expressing plasmid. **J Immunol**, 166: 7419-7426, 2001.

CHIKHLIKAR, P.; ARRUDA, L. B.; AGRAWAL, S., B., GUGGINO, W.; AUGUST, J. T.; MARQUES JR, E. T. A. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8+ responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. **Virology**, 323: 220-232, 2004.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, 141: 539-543, 1997

COURTENAY O, QUINNELL RJ, GARCEZ LM, SHAW JJ, DYE C, Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, 186: 1314-20, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. **Hospital (Rio de Janeiro)**. 11: 3-9, 1937.

DE ANDRADE T. M.; TEIXEIRA, R.; DE PEREIRA, C.; DE CARVALHO FILHO, E. M. Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis. **Rev Inst Méd Trop Sao Paulo**, 24(5):298-302, 1982.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara. **Hospital (Rio de Janeiro)** 45: 703-707, 1954.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 95(3):239-243, 2001.

DEY, AYAN; SHARMA, PAWAN; REDHU, NARESH SINGH; SINGH, SARMAN. Kinesin motor domain of *Leishmania donovani* as a future vaccine candidate. **Clinical and vaccine immunology**: CVI, volume 15, pag 836-42, 2008.

D'OLIVEIRA JUNIOR A, COSTA SR, BARBOSA AB, ORGE MDLG, CARVALHO EM,. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92: 15-20,1997.

DOS SANTOS, L. R.; BARROUIN-MELO, S. M.; CHANG, Y. F.; OLSEN, J.; MCDONOUGH, S. P.; QUIMBY, F.; DOS SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G. S. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, 98(1-2):43-48, 2004.

DYE, C., The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg**, 55(2): 125-130, 1996.

EVANS, T.; REIS, M. F. F. E.; ALENCAR, J. E.; NAIDU, T. G.; JESUS, J. A. L.; McAULIFFE, J. A. F.; PEARSON, R. D. American visceral leishmaniasis (kala-azar). **West J Méd**, 142: 777-781, 1985.

FERNANDES, A. P., M. M. COSTA,. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, 2008.

FERREIRA, J. H. L.; GENTIL, L.G.; DIAS, S. S.; FEDELI, C. E. C.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L., Immunization with the cysteine proteinase *Ldscys1* gene from *leishmania (leishmania) chagasi* and the recombinant *Ldssys1* protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis, **Vaccine**, 26,677-85, 2008.

FERRER, M. L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona: Hoechst Roussel, 1999.

FRAGA, R. E. Avaliação da resposta imune murina após imunização com um antígeno recombinante de *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* em associação com diferentes adjuvantes. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, 56: 58-66, 1984.

GERALD NJ, COPPENS I, DWYER DM, Molecular dissection and expression of the LdK39 kinesin in the human pathogen, *Leishmania donovani*. **Mol Microbiol**, 63: 962-79, 2007.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**, 92(1):324-329, 1993.

GHERARDI, M. M.; RAMIREZ, J. C.; ESTEBAN, M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of il-12 boost are mediated by nitric oxide. **J Virol**, p. 6278–6286, July, 2000.

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**, 20: 59-66, 2002.

GOTO Y, COLER RN, GUDERIAN J, MOHAMATH R, REED SG, Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infect Immun**, 74: 3939-45, 2006.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet Parasitol**, 100(1-2): 87-103, 2001.

GRAMICCIA, M., GRADONI L.; ORSINI S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann Trop Med Parasitol**, 86: 613-620, 1992.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J., PERIBÁÑEZ, M. A.; MOLINA, R.; GRACIA, M. J.; CASTILLO, J.A., Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop**, 77, pp. 203–207. 2000.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infect Dis**, 2(8): 494-501, 2002.

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**, 186(7): 1137–1147, 1997.

GURUNATHAN, S., C. PRUSSIN, Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **Nat Med**, 4(12): 1409-15, 1998.

HEMMI H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, 408(6813):740-5, 2000.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, 14(2):229-43, 2001.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J Exp Med**, 177(5):1505-1509, 1993.

HUYNH, C.; ANDREWS, N.W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. **Cell Microbiol**, 10(2):293-300, 2000.

IBORRA, S., M. SOTO. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, 71(11): 6562-72, 2003.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R., The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev**, 201: 239-253, 2004.

KENSIL, C. R., PATEL, U., LENNICK, M., MARCIANI, D.; Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. **The journal of immunology**, 146, 431-437, 1991.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J. A.; EL HASSAN, A. M.; THEANDER, T. G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol Lett**, 65(1-2):105-8, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R., M. KILLICK-KENDRICK,. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, 1(4): 311-8, 1994.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med**, 170(3): 827-45, 1989.

KOBLISH, H. K.; HUNTER, C. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; LEE, W. M. Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. **J Exp Méd**, 188(9):1603-10, 1998.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU Z. S.; SARIDOMICHELAKIS M. N.; ARGYRIADIS D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, 5:376-383, 1999.

KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, 44(2):283-292, 1986.

KRIEG, A. M.; YI, A.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, 374, 546 – 549, 1995.

KRIEG, A. M., KLINE, J. N. Immune effects and therapeutic applications of CpG motifs in bacterial DNA. **Immunopharmacology**, 48, 303-305, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227 (5259): 680-685, 1970.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U.; GUERRA, L. L.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, 115(1-2): 135-45, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81(3):517,1987.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. 1977, Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, 266(5603):628-630.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl). **Ann Parasitol Hum Comp**, 54(3):277-295, 1979.

LASARTE, J. J., F. J. CORRALES, N. CASARES, A. LOPEZ-DIAZ DE CERIO, C. QIAN Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. **J Immunol** 162: 5270-5277, 1999.

LECLERC, C. New approaches in vaccine development. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 26, 329-41, 2003.

LIPFORD G. B., KLAUS H., WAGNER H. Bacterial DNA as immune cell activator. **Trends in microbiology**, 6, 496, 1998.

LIU, S., J. RILEY, Comparison of common gamma-chain cytokines, interleukin-2, interleukin-7, and interleukin-15 for the in vitro generation of human tumor-reactive T lymphocytes for adoptive cell transfer therapy. **J Immunother** 29(3): 284-93, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193: 265-275, 1951.



LUCAS, M. L.; HELLER, R. Immunomodulation by Electrically Enhanced Delivery of Plasmid DNA Encoding IL-12 to Murine Skeletal Muscle. **Molecular Therapy**, 3(1): 47-53, 2001.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104(22):9375-80, 2007.

MAURICIO IL, HOWARD MK, STOTHARD JR, MILES MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, 119 ( Pt 3): 237-46, 1999.

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

MARQUES, E. T., JR., P. CHIKHLIKAR, HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. **J Biol Chem**, 278(39): 37926-36, 2003.

MAZUNDER, S., MAJI, M., DAS, A., ALI, N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/ protein and protein/protein based vaccination using gp63 against leishmania donovani in BALB/c mice. **Plos one**, 6 (2) 1-15, 2011.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, 47(1-2):67-76, 2007.

MILES, A. P., H. A. MCCLELLAN, Montanide ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. **Vaccine**, 23(19): 2530-9, 2005.

MIR, L. M.; BUREAU, M. F.; GEHI, J.; RANGARA, R.; ROUY, D.; CAILLAUD, J. M. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proc Natl Acad Sci**, 96: 4262–4267, 1999.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 88(4): 491-493, 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. 2002, Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, 18(9):399-405.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**, 71(3-4):181-195, 1999.

MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, 7: 145-173, 1989.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, 136(7):2348-57, 1986.

Murray, H. W. and D. M. Cartelli Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **J Clin Invest**, 72(1): 32-44, 1983.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 174(8):4916-4923, 2005.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J Exp Med**, 189(4):741-746, 1999.

NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J Exp Med**, 158(3):670-689, 1983.

NICOLLE, C. Sur trois cas d'infection splénic infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisie. **Arch Inst Pasteur Tunis**, 3: 1-26, 1908.

NIETO, A.; BERNAL, G.D., ORDEN, J. A., FUENTE, R.D.L., MADRID-ELENA, N.; Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model, **Veterinary research**, 42:39, 2011.

OLIVEIRA G.G.S.; MAGALHÃES F.B.; TEIXEIRA, M.C.A.; PEREIRA, A.M.; PINHEIRO; C.G.M., SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, M.B; BEDOR, C.N.G; ALBUQUERQUE, A.L.; DOS-SANTOS, W.L.C.; GOMES, Y.M.; MOREIRA JR, E.D.; BRITO, M.E.F., PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DE MELO NETO, O.P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins, encoded by genes from five different families, with distinct capacities for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniases (submetido a publicação).

PAMPIGLIONE, S., P. E. MANSON-BAHR, Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 69(1): 60-8,1975.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q.; JERONIMO, S. M. B. *Leishmania* species: Visceral (Kalaazar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone,.2, .2831-2845, 2000.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, 62(1):229-235, 1994.

PINHEIRO, C. G. M. Uso de plasmídeo codificando interleucina-12 (IL-12) visando modificar a resposta imune induzida pela administração de um antígeno recombinante de *leishmania chagasi* (Ic9) e saponina. Salvador. Dissertação (Mestrado em imunologia) - Universidade Federal da Bahia.

POZIO, E.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Trop.**38(4):383-93, 1981.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, 122(Pt 3):253-261, 2001.

QUINNELL, R. J., O. COURTENAY. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol** 91(3-4): 161-8. 2003.

RAZ, E., H. TIGHE. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93: 5141-5, 1996.

REICHELT, P., C. SCHWARZ. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. **Protein Expr Purif** 46(2): 483-8, 2006.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet Immunol Immunopathol**, 71(1):69-76, 1999.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, 31(1): 143-148, 1998.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, 16(7): 292-7, 2000.

SALDARRIAGA, O. A., PEREZ, L. E., TRAVI, B. L., MELBY, P. C.,. Selective enhancement of the type 1 cytokine response by expression of a canine interleukin (IL)-12 fused heterodimeric DNA, **Vet Immunol Immunopathol**, vol 110, 377-88, 2006.

SANTOS, W. R; LIMA, V. M. F.; SOUZA, E. P.; BERNARDO, R. R.; PALATINIK, M.; SOUSA, C.B.P. Saponins, IL-12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 21: 30-43 (2002).

SANTOS, Lenita Ramires dos. **Avaliação de protocolos para indução de resposta imune contra antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***, 2007. 199 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SEAMAN, J., A. J. MERCER. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Ann Intern Med**, 124(7): 664-72. 1996

SJÖLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 Immune Response and Simultaneous Lack of Activation of a Th2 Response Are Required for Generation of Immunity to Leishmaniasis. **J Immunol**, 160(8): 3949–3957, 1998.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis: A randomized clinical trial. **Vet Q**, 19(1): 10-13, 1997.

SOLANO-GALLEGO L, MORELL P, ARBOIX M, ALBEROLA J, FERRER L, Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol** 39: 560-3, 2001.

SOMIARI, S.; GLASSPOOL-MAOLNE, J.; DRABICK, J.J.; GILBERT, R.A.; HELLER, R.; JAROSZESKI, M.J.; MALONE, R.W. Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery. **Mol Ther**, 2(3): 178-187, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C. L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, 35(1):63-73, 2005.

SUN HX, XIE Y, YE YP, Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, 27: 1787-96, 2009.

SUNDAR, S.; REED, S. G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H. W. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 56(5):522-525, 1997.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E. H.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin-12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response. **J Exp Med**, 177: 1797-1802, 1993.

TEIXEIRA, M. C. A.; SANTOS, R. J.; SAMPAIO, R. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS SANTOS, W. L. C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol Res**, 88: 963–968, 2002.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G. S.; MARCO A. SILVANY; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; COSTA, C. H.; DOS-SANTOS, W. L.; EICHINGER, D.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, 35: 51-54, 2007.

TEIXEIRA, Naiara Carvalho. **Imunização de camundongos com fragmentos recombinantes de cinesina de *Leishmania chagasi* e/ou plasmídeos codificando IL-12 e IL-2 murinas**, 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, 52(3):287-92, 1995.

TEWARY, P.; SUKUMARAN, B., SAXENA, S., MADHUBALA, R., Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen, **Vaccine**, 22, 3053-60, 2004.

TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 24: 2409-2416, 2006.

TEWARY, P.; M. JAIN,. A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **J Infect Dis** 191(12): 2130-7, 2005.

TRAVI, B.L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, 64(3-4):119-24, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, 3(2):133-146, 2003.

ULMER, J. B.; DONNELLY, J.; PARKER, S. E.; RHODES, G. H.; FEIGNER, P. L., DWARKI, V. J.; GROMKOWSKI, S.; DECK, R. R., DeWITT, C. M.; FRIEDMAN, A.; HAWE, L. A.; LEANDER, K. R.; PERRY, H.C.; SHIVER, J. W.; MONTGOMERY, D. L.; LIUT, M. A. Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. **Science**, 259: 1745-49, 1993.

VIDAL, S.; BELOUCHI, A. M.; CELLIER, M.; BEATTY B.; GROS P. Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. **Mamm Genome** 6: 224-230, 1995.

WALKER P S., SCHARTON-KERSTEN T, ARTHUR M. KRIEG, LAURIE LOVE-HOMAN, EDGAR D. ROWTON§, MARK C. UDEY, AND JONATHAN C. VOGEL. 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN-g dependent mechanisms. **Medical Sciences**, Vol. 96, pp. 6970–6975.

WATERBORG, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. Then Protein Protocols Handbook. Humana Press: 2ed., 7-10, 2002.

WHO Expert Committee. Control of the leishmaniasis **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, 793, Geneva, Suíça, 1-14, 1990.

WHO, Urbanization, an increase risk factor for leishmaniasis. **Weekly epidemiology record** 44: 365-372, 2002.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, 38: 147-160, 2005.

WILSON, M. E.; WEINSTOCK, J. V. Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. **Methods** 9: 248-254, 1996.

WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B. L.; MENTE K. A.; MCGOWAN S. E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 161: 6148-6155, 1998.

WOLFF, J. A., R. W. MALONE, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science** 247(4949 Pt 1): 1465-8,1990.

YAMAKAMI, K; AKAO, S; SATO, M.; NITTA, Y.; MIYAZAKI, J.; TADAKUMA, T. A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection, **Parasitol Int** 50, 81-91, 2001.

APÊNDICE A – Manuscrito submetido para publicação em revista científica indexada.

### **Running title**

Murine immunization with kinesin

### **Title**

Evaluation of different protocols to immunize mice with a recombinant C-terminal fragment of a *Leishmania chagasi* kinesin

### **Authors**

\*Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro<sup>1,2</sup>; Lenita Ramires dos Santos<sup>1</sup>; Ricardo Evangelista Fraga<sup>1</sup>; Laiz de Souza Paixão<sup>1,3</sup>; Naiara Carvalho Teixeira<sup>1,2</sup>; Lain Carlos Pontes-de-Carvalho<sup>1</sup>; Geraldo Gileno de Sá Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil. <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil. <sup>3</sup>Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil.

### **\*Corresponding Author**

Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro

Mailing address: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Patologia e Bioinervenção, Rua Waldemar Falcão, No. 121, Candeal. Salvador-Bahia, BRAZIL. CEP. 40295-001. Tel: 55-71-3176-2257

e-mail: cpinheiro@bahia.fiocruz.br

**Abstract**

Murine immune response to rLci2B-NH6 protein was studied. Mice that received rLci2B-NH6 or pBK-CMV-Lci2B produced specific IgG. Animals immunized with rLci2B-NH6/saponin or rLci2B-NH6 associated with any amount of single doses pcDNA3.1-scmIL-12 tested produced specific IgG2a and IgG1, while mice immunized with rLci2B-NH6 alone or associated with Freund's adjuvant, peanut oil, alum or plasmid encoding murine IL-12 (pcDNA3.1-scmIL-12), generated IgG1 but no IgG2a specific antibodies. Mice injected with pBK-CMV-Lci2B followed by booster with rLci2B-NH6, produced IgG2a. Mice immunized with rLci2B-saponin or with injection of pBKCMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin showed specific lymphoproliferative response and IFN- $\gamma$  production. However, the groups injected with pBK-CMV-Lci2B or pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin did not produce IL-5 and the group sensitized with rLci2B-NH6/saponin/pcDNA3.1-scmIL-12 showed a reduced IL-5 concentration related to rLci2B-NH6/saponin injected group, after in vitro stimulation with rLci2B-NH6. In conclusion, mice immunized with rLci2B-NH6 develop Th2 immune response. The association of rLci2B-NH6 with saponin induced a strong mixed Th1/Th2 immune response which was not modified to Th1 type by using IL-12. A cellular immune response was generated after injection of pBK-CMV-Lci2B and booster with rLci2B-NH6/saponin with proliferative response and a mild IFN- $\gamma$  production. Nevertheless, neither the immune response generated by injection of pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6 nor by rLci2B-NH6/saponin reduced the parasite load in the spleen.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, recombinant antigen, vaccine

**Financial Support:** INOVABIO Program, MCT, Brazil, RENORBIO Program, MCT, Brazil, MILENIO VACINAS Program, CNPq and FAPESB.



## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a progressive parasitic infection which is caused by at least two different species of protozoan: *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum/chagasi* (Mauricio et al. 1999, WHO 1990). Natural infection is transmitted by the bite of phlebotomine sand fly insects of the family Psychodidae, subfamily Phlebotominae (Alexander 2000, Killick-Kendrick 1990). *L. infantum/chagasi*, which is found mainly in the Mediterranean basin and South America, is a zoonotic disease that frequently causes generalized disease in both people and dogs that can be fatal (Abranches et al. 1991, Corredor et al. 1989, Deane & Deane 1955). Dogs are considered the major reservoirs of *L. infantum/chagasi* and in endemic areas canine infection rates often exceed 30 % (Ashford et al. 1995, Berrahal et al. 1996). Thus, canine infection constitutes an important problem for controlling zoonotic VL because sick dogs, and possibly asymptomatic animals, are the major reservoirs of the parasite (Corredor et al. 1989, Lopes et al. 1984, Molina et al. 1994).

The evidence of acquired immunity and resistance to reinfection in natural *Leishmania* hosts suggests that the vaccine design against VL is feasible. In dogs, protective immune response against VL seems to be cellular of the so-called Th1 type (Pinelli et al. 1994), and the predominant cytokine expressed after specific stimulation is interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Thus, most of the studies aim to identify *Leishmania* antigens capable of stimulating a Th1 type characteristic immune response. In fact, several antigens identified as candidates to vaccine component showed a protective-associated immune response but with different organ-specific protection degree in a murine experimental model of VL (reviewed in Khamesipour et al. 2006). Surprisingly, murine experimental VL protection has been found also in a mixed specific Th1/Th2 environment (Ghosh et al. 2001, Mazumdar et al. 2004)

whereas an antigen highly immunogenic and Th1 immune response inducer, rLACK, was not capable to induce a protective immune response against neither *L. donovani* nor *L. chagasi* (Melby et al. 2001, Marques-da-Silva et al. 2005). In spite of the fact that the clear Th1 versus Th2 dichotomy to be found in the murine cutaneous leishmaniasis model caused by *L. major*, characterized by Th1 cytokines (IFN- $\gamma$ ) associated with resistance/protection and Th2-type cytokines (IL-4) with disease exacerbation/susceptibility, it is not so evident in experimental visceral leishmaniasis. It is also of common sense that protection in visceral leishmaniasis is more difficult to obtain than the others *Leishmania* models.

Traditionally experimentally used adjuvant such as Freund's adjuvant and BCG can modulate the strength, type and intensity immune response to *Leishmania* antigens (Champsi & McMahon-Pratt 1988, Kenney et al. 1999, Khalil et al. 2006). However, the use of these adjuvants to use in dogs and in humans is not recommended due several toxic effects. In the last years, many others adjuvant formulations and new immunization protocols have been constantly evaluated (Palatinik-de-Sousa et al. 1994, Ali & Afrin, 1998). Among different vaccination protocols, the use of IL-12 in co-administration of parasite fractions or antigens (Afonso et al. 1994, Tewary et al. 2006) and DNA-based immunization have driven, in same cases, the specific cellular immune response to Th1-type without the induce local toxic effects (Watts & Kennedy 1999), which plays an important role against intracellular parasites. Recently, the use of a heterologous DNA primer-protein booster immunization strategy to induce potent cellular immunity to *Leishmania* antigens and to promote control of infections is been successful evaluated (Iborra et al. 2003, Tewary et al. 2005, Rafati et al. 2006).

In this study, we examined the immunogenic properties of a new *Leishmania infantum/chagasi* recombinant antigen (rLci2B-NH6) aiming to access the potential of this protein as a vaccine component. This recombinant protein was identified in an amastigote form cDNA library (Teixeira et al. 2007) and it was selected by antibody reactivity with

pooled serum samples of VL asymptomatic dogs. In addition, aiming to modulate efficiently the immune response to rLci2B-NH6, we evaluated and described here different immunization protocols in an attempt to induce a large spectrum of murine specific immune response to rLci2B-NH6 to find further a *Leishmania* protective-associated immune response.

## **Material and Methods**

### *Animals*

Five to six-week-old BALB/c mice (male and female) were obtained from the Gonçalo Moniz Research Center Animal House and kept under appropriate conditions with free access to food and water in accordance to the Institutional Guidelines. All mice were used at ages ranging from 6 to 8 weeks at the starter of experimentation. The use of mice in this study was previous approved by a national relevant committee.

### *Plasmid preparation*

Plasmid DNA (pBK-CMV- rLci2B) was selected from a cDNA library constructed with *L. chagasi* RNA amastigotes (Teixeira et al. 2007) in lambda phage (Stratagene) and obtained after excision of this. For prokaryotic system protein expression and further purification to use in immunization, rLci2B-NH6 cDNA fragment was subcloned by transferring a code region of pBK-CMV- rLci2B to pRSET plasmid (latter named pRSET-rLci2B) by *KpnI* and *BamHI* enzymatic digestion and ligation with T4 DNA ligase. The plasmid encoding a single-chain murine IL-12 (pCIneo-scmu-IL-12) was provided by Dra. Emmanuela Handman (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia).

The single-chain IL-12 cDNA fragment was subcloned to a plasmid ampicillin-resistance pcDNA3.1 (Invitrogen) after PCR and named pcDNA3.1-scmu-IL-12. The plasmids used for mice injection (pBK-CMV- rLci2B and pBK-CMV vector without insert, pcDNA3.1-scmu-IL-12 and pcDNA3.1 vector without insert) were prepared from overnight cultures and purified by anion-exchange chromatography using a Qiagen Megaprep kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. For use pRSET- rLci2B to *Escherichia coli* transformation an alkaline mini-prep was done (Sambrooks 1989). Plasmid concentration and quality were evaluated by spectrophotometric analysis and agarose gel electrophoresis. The ratio of the optical density at 260 nm to that at 280 nm ranged from 1.83 to 1.88.

#### *Expression of rLci2B-NH6 in Escherichia coli and purification*

For His-tagged rLci2B-NH6 production, the *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) was transformed with pRSET-rLci2B-NH6 and a single transformed bacterial colony was grown following standard procedures in LB medium. The overnight culture was used to starter a freshly D.O 0.1 at 600nm culture. After induction with IPTG (0,25 mM IPTG at an OD600 of 0.6) the cells were grown for a further 3 h and centrifuged by 15 minutes, 4°C, at 6.000 g. The bacterial pellets were resuspended in a lysis buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) with 4 mg of deoxicholate acid/sediment weight (gr) and 1 mg lisozyme/suspension volume (mL), then followed by sonication and centrifugation at 17.000 g, 4° C, for 15 minutes. The purification of rLci2B-NH6 was done with the soluble fraction of the centrifugation using Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham) charged with Ni<sup>+</sup>. At the end, the bounded proteins were eluted with a buffer containing Imidazole 0,5 M. The fractions containing the recombinant protein, as determined by SDS-PAGE, were pooled

and dialyzed against PBS. The purity of the recombinant protein was checked by running it on SDS-PAGE gel followed by Coomassie blue staining. Western blot was performed for detecting rLci2B-NH6 protein, using a mixture of dog's serum with reactive antibodies anti-*Leishmania* and a mouse anti-His tag antibody (Invitrogen), after transfer purified rLci2B-NH6 to a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad transblot apparatus (Bio-Rad Laboratories).

#### *Mammalian cell expression of rLci2B-NH6*

COS-7 cells were cultured in DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 1% non-essential amino-acid solution (Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin solution (Life Technologies), from now on referred as supplemented DMEM, at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere. The day before transfection, 10<sup>6</sup> cells were plated into 35 mm petri dishes. Transfections were carried out with 1 µg of plasmid, either pBK-CMV- rLci2B or pBK-CMV empty plasmid (the latter as the negative control), per petri dish, using lipofectamine (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. The day after transfection, the attached cells on the Petri dishes were washed once with 0.15 M phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS), and cultured with fresh DMEM medium. After 48 hours, the cells were scraped out of plates and resuspended in SDS-PAGE (Laemmli, 1970) sample buffer. The rLci2B-NH6 expression was determined in transfected cells by Western blot analysis using a pool of serum of *Leishmania* positive dogs. For Western blotting, transfected or untransfected cells were analysed as whole cell lysate.

#### *Immunization protocols*

Immunizations experiments with the recombinant protein were performed injecting groups of six mice with (i) 100 µg of rLci2B-NH6 protein in saline or rLci2B-NH6 associated with (ii) Freund's adjuvant, (iii) saponin, (i.v) peanut oil or (v) alum, subcutaneously (s.c) in the dorsal region. Control mice received the adjuvant alone. Boosters were given twice with the same antigen preparations at 3-weeks intervals (table 1). For the experiments with DNA construction (pBK-CMV- rLci2B), animals were immunized by intramuscular (i.m) injection of 50 µg (in 50 µL) of plasmid DNA diluted in saline in each hind leg quadriceps followed by electroporation, 100V with 5 pulses and 20 ms of intervald. Control groups of mice were injected with sterile saline and with the vector pBK-CMV devoid of insert. In a DNA primer/protein booster protocol, groups of mice were injected with i.m. twice with plasmid DNA at 3-week intervals and boosted s.c. once with rLci2B-NH6 /saponin. Additionally, fifty micrograms of plasmid encoding murine IL-12 (pcDNA3.1-mIL-12) was administered (i.m. followed by electroporation) in groups of mice injected with rLci2B-NH6, at 3-week intervals, or a single dose of different amounts of the same plasmid DNA (50 µg, 10 µg, 2 µg and 0.4 µg pcDNA3.1-mIL-12) associated with rLci2B-NH6-saponin were injected, followed by two additional rLci2B-NH6-saponin booster.

#### *Determination of Ag-specific antibody response and isotypes*

Serum samples were obtained at 2 weeks after the last injection dose by orbital plexus puncture. Total IgG, IgG1 and IgG2a were measured in individual serum samples by ELISA against rLci2B-NH6 and promastigote *Leishmania* antigens. Briefly, for the total specific IgG production, 96-well microtiter plates were coated with 0,5 µg rLci2B-NH6, overnight at 4°C, in a 100 µL volume of carbonate-bicarbonate buffer pH 9,6. All incubations were carried out

for 60 minutes at room temperature except for the substrate-development step, and then the plates were washed thrice after each incubation step with PBS containing 0,05% Tween-20 (PBST). After blocking with 10% skimmed milk in PBS, wells were incubated with a dilution of each sample (1:5.000) followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated-goat anti mouse IgG (Sigma) at 1:400 (protocol 1 and protocol 2) or other batch of anti mouse IgG at 1:4000 (protocol 3). Wells colors reaction were developed at room temperature with TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) for 15 minutes and stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then, the absorbance at 450 nm was measured. To detect specific isotypes to rLci2B-NH6 and promastigote *Leishmania* antigens the plates were coated as described above. The blocking stage and washes were done with 10% FBS in PBS only and with PBST, respectively. After incubation of samples (diluted at 1:50.000 or 1:350.000), biotinylated monoclonal rat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Pharminchem) were added to the wells and incubated for two hours. Avidin-peroxidase incubation followed by addition of substrate TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to development of color and measured at 450 nm as described before.

#### *Splenocytes culture and proliferation assay*

Spleens were removed aseptically from mice in each group 3 to 4-weeks after the last injection dose. Single-cells suspensions were prepared by grinding the spleen with the disk bottom of the plunger from 5-mL syringe. RPMI 1640 medium (10 mL) was added to the suspension, and then the contents was mixed well it was centrifuged at 4°C by 100 x g for 30 seconds. The supernatant was pipetted out slowly and the cells were pelleted by centrifugation at 4°C and 400 x g for 10 minutes. Supplemented RPMI medium (FBS 10%; 50 µM 2-ME 0,01M; HEPES 1mM pH 7,2; glutamine 200mM) was used to resuspend and adjuste the cells concentration to 3 x 10<sup>6</sup>/mL. For proliferation assay, 3 x 10<sup>5</sup> cells were plated in triplicate

onto 96 well plates in a 100  $\mu$ L volume in the presence or absence of 2  $\mu$ g/mL cell mitogen Concanavalin A (100  $\mu$ L) or 10  $\mu$ g/mL rLci2B-NH6 (100  $\mu$ L) for 3 and 5 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, respectively. Proliferation was quantified by measurement of the incorporation of 1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]-labeled thymidine during additional 18 hours of culture. Stimulation index (Si) were calculated as the ratios of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in the presence of antigen versus the non-stimulated (medium alone) control.

#### *Cytokine production assay*

For cytokine production 9 x 10<sup>5</sup> cells (300  $\mu$ L), prepared as described above, were plated onto 24-wells plates and incubated in the presence or absence of 2  $\mu$ g/mL Con A mitogen (300  $\mu$ L) or 10  $\mu$ g/mL of rLci2B-NH6 (300  $\mu$ L). After 48 hours of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, supernatants were collected and cytokine concentrations were quantified by capture ELISA with biotinylated anti-mouse IFN-gamma and anti-mouse IL-5 (BD Pharmingen) followed by incubation with avidin conjugated to peroxidase (Sigma). The color reaction development was done by the addition of substrate buffer (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The reaction was stopped after 5-10 minutes with 50  $\mu$ L of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance at 450 nm was measured. A standard curve was plotted using recombinant murine IFN- $\gamma$  or IL-5 in the same assay and the limit of detection was 110 pg/mL and 40 pg/mL, respectively

#### ➤ *Statistical analysis*

Comparison of the level of antibody induction, spleen cells proliferation and cytokine production between the groups were determined by one-way ANOVA test followed by



Tukey's post-test using "GraphPad Prism" software (version 4.0). The reported *P*-values < 0.05 were regarded as statistically significant.

## Results

### *Purified recombinant rLci2B-NH6 and plasmid encoding Lci2B (pBK-CMV- Lci2B) used for immunization*

The rLci2B-NH6 protein used to immunize BALB/c mice was produced with a N-terminal polyhistidine tail in *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain transformed with the plasmid pRSET-rLci2B and purified by Sepharose Ni-chelated affinity chromatography. After the chromatographic purification and dialysis, the protein obtained showed a prominent band of approximately 39 kDa and very few faint bands, corresponding to rLci2B-NH6 and contaminating proteins, respectively, when analyzed by SDS-PAGE (Fig 1A). In addition, the protein from the 39 kDa band was shown to be reactive with antibodies from dogs naturally infected with *Leishmania*, but not pooled serum from healthy animals, as well as anti-histidine murine monoclonal antibody, as assessed by Western Blot (Figure 1B).

The plasmid pBK-CMV- rLci2B was shown to be able to promote a transient production of rLci2B-NH6 in COS-7 cells in transfection experiments carried out with lipofectamine. In these experiments, antibodies from dogs naturally infected with *Leishmania* detected two protein of approximately 30 and 38 kDa in the lysates of COS-7 cells transfected with pBK-CMV- rLci2B, but not in the lysates of COS-7 cells transfected pBK-CMV without insert (negative control), as assessed by Western blot assays (Fig. 1C).

*Immune response of mice immunized with rLci2B-NH6 combined with different adjuvants*

The BALB/c mice immunized with rLci2B-NH6 alone or in combination with Freund's adjuvant, saponin, peanut oil, alum or a plasmid encoding murine IL-12 (pcDNA3.1-scmu-IL-12) developed a specific humoral immune response, as compared with mice injected with saline. The formers produced antibodies of the class IgG and the subclass IgG1 reactive to rLci2B-NH6 (Fig. 2). Among the groups of animals, the concentration of specific antibodies of the class IgG and subclass IgG1 in the sera showed the following relation: rLci2B-NH6-Sap > rLci2B-NH6-Freund's Adj. = rLci2B-NH6-peanut oil = rLci2B-NH6-Alum > rLci2B-NH6- pcDNA3.1-scmu-IL-12 = rLci2B-NH6 > salina and rLci2B-NH6-Sap = rLci2B-NH6-peanut oil = rLci2B-NH6-Alum > rLci2B-NH6-Freund's Adj = rLci2B-NH6- pcDNA3.1-scmu-IL-12 > rLci2B-NH6 > salina, respectively (ANOVA and Tukey post-test,  $p < 0.05$ ). In addition, the group of mice immunized with rLci2B-NH6-saponin was the only one that produced antibodies specific of IgG2a subclass, as compared with saline control group (ANOVA and Tukey  $p < 0.05$ , Fig. 2).

A significant cell mediated immune response was evident only in mice groups that were injected with rLci2B-NH6 in association to saponin as compared with mice injected with saline.

Cellular immune response was evaluated by the determination of immune response phenotype elicited by rLci2B-NH6 injection alone or in combination of different adjuvant. Suspensions of splenocytes from injected rLci2B-NH6 mice were restimulated *in vitro* with rLci2B-NH6 and tested for the proliferation and cytokine production. A significant cell mediated response was evident only in mice that were injected with rLci2B-NH6 in association to saponin. As shown in Fig 2, immunization with this protein preparation resulted in splenocyte proliferation (2 out of 3 experiments) *in vitro* response to 0,1  $\mu\text{g/mL}$  rLci2B-

NH6 stimulation (ANOVA,  $p < 0.0014$ ; Tukey,  $p < 0.01$ ). Others rLci2B-NH6 concentrations used in the *in vitro* culture also induced statistically significant cell proliferation (10  $\mu\text{g/mL}$ , 1 out of 3 experiments and 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2 out of 3 experiments, data not shown). However, all the other groups tested did not show significant splenocyte proliferation when compared to the saline control group.

The cytokine production by splenocyte of mice that were injected with rLci2B-NH6 showed a predominant Th2 immune response profile. No IFN-gamma production was induced in response to rLci2B-NH6 protein injection administered with saline alone or in combination with Freund's adjuvant, peanut oil, alum or murine IL-12 plasmid DNA in contrast to production detected after rLci2B-NH6 /saponin administration (Figure 2, ANOVA,  $p < 0.0005$ ; Tukey,  $p < 0.01$ ). All groups, with exception of Freund's adjuvant and peanut oil, showed a high IL-5 level production (Figure 2). Interestingly, the association of rLci2B-NH6 with saponin was the only one that induced IFN-gamma production (3 out of 3 experiments) with concomitant IL-5 production (3 out of 3 experiments). Then, an exclusively Th2 characteristic immune response induced by rLci2B-NH6 protein could be modified to a mixed Th1/Th2 type when rLci2B-NH6 recombinant protein is administered in association with saponin.

*Immune response of mice immunized with rLci2B-NH6 and different amounts of plasmid encoding murine IL-12*

In order to modify to Th1 type the specific immune response generated to rLci2B-NH6 protein, a plasmid encoding a murine single-chain IL-12 was co-administrated with rLci2B-NH6 in mice. However, as seen before, no change was observed with this combination. Posterior experiments showed that a high dose of pcDNA3.1-scmur-IL-12 (50

µg) in different lineages of mice caused a significant increase in the liver, spleen and draining lymph node size of the injected animals so that it could be compromised the immune system (data not shown). Then, a single dose of different amounts of pcDNA3.1-scmu-IL-12 were used in association with rLci2B-NH6 protein and saponin (rLci2B-NH6 /sap) preparation to verify if a *in vivo* lower concentration of IL-12 was capable to drive the rLci2B-NH6 immune response to a Th1 type.

The high intensity specific humoral immune response was observed to rLci2B-NH6 protein in all conditions tested except to the controls groups injected with saline or saponin (Figure 3A, ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Tukey,  $p < 0.001$  all groups compared to the control groups). No difference occurred when the recombinant protein was administered only with saponin or with DNA plasmid (either pcDNA3.1 empty or four different amounts of pcDNA3.1-scmu-IL-12). However, even so all the groups that received rLci2B-NH6 showed the same intensity of a specific IgG1 production (Figure 3), a small difference was observed in the level of IgG2a production when rLci2B-NH6 was co-administrated with 50 µg of pcDNA3.1-scmu-IL-12 in a single dose of injection (Figure 3). This difference was statistically significant (ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Tukey,  $p < 0.05$ ) compared to rLci2B-NH6/sap injection only or the lower IL-12 DNA plasmid quantity co-administration [pcDNA3.1-scmu-IL-12 (0.4 µg)]. The other two concentrations of IL-12 DNA plasmid, as well as pcDNA3.1 empty, induced IgG2a specific antibody but with no statistically difference compared to rLci2B-NH6/sap response. The highest IgG2a/IgG1 ratio was observed in immunized mice co-injected with 50 µg of pcDNA3.1-scmu-IL-12, with  $X \pm SD$  of  $0,81 \pm 0,14$ , but with no statistical difference compared to the others groups.

The cellular immune response induced using this immunization protocol was evidenced only by cytokine production. No statistically significant splenocyte proliferation difference was observed when all the groups were compared (Figure 3) but the IFN-gamma

production was detected in all the groups injected with rLci2B-NH6. However, the group injected with the higher and the lower murine IL-12 DNA plasmid concentration showed the reduction in IFN-gamma level (Figure 3). In addition, even IFN-gamma have been detected, statistical difference occurred only between rLci2B-NH6 /saponin injected group and the controls groups injected with saline or saponin (ANOVA,  $p < 0.0158$ ; Tukey,  $p < 0.05$ ). Interestingly, the IL-5 production observed after rLci2B-NH6 administration was moderately diminished when 50  $\mu\text{g}$  of DNA plasmid encoding murine IL-12 was used in a single dose injection co-administrated with the rLci2B-NH6 to immunization (Figure 3) and was kept lower also when 0.4  $\mu\text{g}$  of DNA plasmid was used to injection. This latter result may constitute a fortuitous result and need to be repeats to confirm the data.

*Immune response of mice primed with a plasmid encoding Lci2B and boosted with rLci2B-NH6-saponin*

DNA immunizations are known to promote a Th1-type immune response to encoded proteins (Watts and Kennedy, 1999, Gurunathan et al., 2000). Thus, we examined the use of a recombinant DNA plasmid injection to produce *in vivo* Lci2B protein and to try to induce a Th1-type specific immune response in injected mice. Animals injected with pBK-CMV-Lci2B alone were capable to respond specifically to rLci2B-NH6 protein with IgG antibody production but with a very lower intensity than the protein administration (Figure 4). However, this response is predominantly of IgG2a isotype (2 out of 2 experiments) as seen clearly in others serum dilution tested (data not shown). The cellular immune response was also very weak (2 out of 2 experiments) and not statistically significant when compared to controls groups (Figure 4).

A heterologous immunization strategy was used to try to increase the intensity of immune response to the recombinant protein without revert the Th1 type characteristic. To do that, mice were injected twice with pBK-CMV-Lci2B with 3-weeks intervals and boosted once with rLci2B-NH6 /sap (table 1). As seen in Figure 4, a specific antibody production was also detected using this immunization strategy. By statistical analysis, the mean optical density of the groups was different and showed the relation: rLci2B-NH6/sap > pBK-CMV-rLci2B/ rLci2B-NH6/sap > pBK-CMV- rLci2B > empty pBK-CMV = saponin = saline (ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Tukey,  $p < 0.001$ ). Additionally, while the IgG1 antibody production was higher in the group injected with rLci2B-NH6 associated to saponin the IgG1 production was not detected using the DNA primer/protein booster protocol of immunization (Figure 4, ANOVA, 0.0001; Tukey,  $p < 0.001$  related to rLci2B-NH6/saponin compared to all the others groups). Finally, the IgG2a specific antibody production was not statistically different between the two groups mentioned above (Figure 4). However, an IgG2a/IgG1 ratio ( $X \pm SD$ ) observed in the group injected with DNA primer/protein booster ( $1.54 \pm 0.8$ ) indicated a Th1 immune response. Statistical comparison of the groups using the IgG2a/IgG1 ratio values showed the relation rLci2B-NH6/sap < pBK-CMV-Lci2B/ rLci2B-NH6/sap = pBK-CMV-Lci2B = empty pBK-CMV = saponin = saline (ANOVA  $p < 0.0001$  and Tukey  $p < 0.05$ ).

The cellular immune response analysis showed that a splenocyte proliferation and Th1-type cytokine production were also induced by the DNA primer followed by protein booster protocol (Figure 4). The proliferative response induced was statistically different compared to the controls groups and the rLci2B-NH6 /saponin injected group (Saline = Saponin = empty pBK-CMV = pBK-CMV-Lci2B < pBK-CMV- Lci2B/ rLci2B-NH6 < rLci2B-NH6 /saponina; ANOVA,  $p < 0.0001$ ; Tukey,  $p < 0.05$ ). A more pronounced proliferation, but not statistically different when compared to controls groups, was observed to DNA primer/protein booster injected group using others concentrations of rLci2B-NH6

used to culture *in vitro* (1 µg/mL and 10 µg/mL, data not shown). Gamma-interferon production was detected in the culture supernatant at 13.9 ng/mL, 1.18 ng/mL and 1.88 ng/mL to rLci2B-NH6/sap, pBK-CMV- Lci2B-NH6 or pBK-CMV- Lci2B followed by rLci2B-NH6 booster, respectively, but only the rLci2B-NH6 /saponin injected group showed a statistically significant difference related to all the others groups (ANOVA,  $p < 0.0005$ ; Tukey,  $p < 0.01$ ). Administration of rLci2B-NH6 protein induced a IL-5 production (Figure 4) as seen before in other immunization protocol tested (table 1, Figure 2 and 3). This IL-5 production was completely abrogated, with no production detected, if rLci2B-NH6 immune response is primed with pBK-CMV- Lci2B DNA plasmid (Figure 4).

The results of the fourth protocol, in which animals were also injected three times with rLci2B-NH6 or rLci2B-NH6-saponin three times or with pBK-CMV-Lci2B twice and boosted with rLci2B-NH6/saponin, showed that the groups rLci2B-NH6 ( $X \pm SD$ ;  $0,33 \pm 0,14$ ), rLci2B-NH6/saponin ( $0,63 \pm 0,05$ ) and pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin ( $0,38 \pm 0,09$ ) presented higher concentrations of IgG than the control groups. Furthermore, the use of saponin as adjuvant (G4) led to a more intense production of this antibody than the other two groups rLci2B-NH6 and pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin (ANOVA,  $p < 0,0001$ , Figure 5). Moreover, there was detection of a higher concentration of IgG2a in groups that received the antigen with saponin or DNA / protein than the control groups, and also in relation to the group that received only rLci2B-NH6 (Figure 5). Although IgG1 had been detected in all three groups, the DNA/protein group presented a lower concentration of this antibody than rLci2B-NH6 or rLci2B-NH6/saponin groups (Figure 5). The mean value of the proportion IgG2/IgG1 0,06 (rLci2B-NH6); 0,73 (rLci2B-NH6/saponin) and 3,09 (pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin) showed that the strategy of using DNA / protein, one more time, changed the profile of production of immunoglobulins.

The cellular immune response showed that only the animals injected with rLci2B/saponin presented an increase of cell proliferation after cell stimulation with the antigen (Figure 5). However, Only a few animals in rLci2B-NH6/saponin and pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin groups produced IFN- $\gamma$  detected by the method and, therefore, there was a tendency in these two groups to produce this cytokine (Figure 5). Despite the group that received DNA / protein did not produce significant amounts of IFN- $\gamma$  and cell proliferation, the results show a trend in this protocol to generate Th1 cellular immune response in this group, at least in some animals. With respect to IL-5, there was production statistically significant of this cytokine only in rLci2B-NH6/saponin group ( $X \pm SD$ ;  $0,49 \pm 0,27$ , ANOVA  $p < 0,05$ , Figure 5).

After the animals challenge there was no significant reduction of the parasite burden in the spleen, showing that the protocol used was not able to confer protection against infection by *L. chagasi* (ANOVA,  $p > 0.05$ , Figure 6).

## Discussion

In this study, we evaluated the immunogenic properties of a new *L. infantum/L. chagasi* recombinant antigen (rLci2B-NH6) as a potential vaccine component candidate against canine visceral leishmaniasis. Groups of BALB/c mice were used to the first evaluation of rLci2B-NH6 injection as this is an easy and useful model to manipulate and access the immune response to a specific antigen and further to check the role of this response in an infection context. In an initial step, several adjuvants were tested in association with recombinant protein. In addition, DNA-based immunization was examined. All protocols used were done aiming to modulate as the specific immune response type as the intensity to further



evaluation of the effective role of the immune response to rLci2B-NH6 in an infection challenge with *L. infantum/L. chagasi*.

The rLci2B-NH6 protein was successfully expressed both in a prokaryotic and eukaryotic systems. The specificity of the recombinant protein (39 kDa approximately) was confirmed by reactivity with positive pooled serum of dogs with visceral leishmaniasis and an anti-His-Tag antibody to detect rLci2B-NH6 -(6) histidine-fusion protein produced in *E. coli*. It is possible that a band of low molecular weight recognized by specific antibodies in the pBK-CMV- rLci2B transfected COS-7 cells maybe rLci2B-NH6 with partial degradation or mRNA anormally transcribed as sometimes it is observed in prokaryotic expression (Schoemaker et al., 1985). A high purity degree preparation of rLci2B-NH6 was used to injection of mice, as seen in the SDS-PAGE analysis.

The immunogenic properties of the rLci2B-NH6 were clearly observed. A specific antibody production was induced by rLci2B-NH6 administration. It must be emphasized that this response presented a Th2-type characteristic pattern with exclusive IgG1 isotype and IL-5 production. No proliferative response or IFN- $\gamma$  production was observed. Early observations also have shown the natural immunogenicity of this protein. The first one is that the screening of the cDNA library was done with reactive dog's serum to *L. infantum/L. chagasi* visceral leishmaniasis and latter by the reactivity of human visceral leishmaniasis patient's serum. Moreover, initial experiments in our lab showed that the rLci2B-NH6 induced a strong humoral specific response but it wasn't observed a proliferative cellular immune response in immunized dogs. Then, as protection or resolution of infection in the dog's visceral leishmaniasis it is associated to a potent cellular immune response that result in IFN- $\gamma$  production (Pinelli et al. 1994, Martinez-Moreno et al. 1995, Rhalem et al. 1999), efforts to modulate the immune system response to rLci2B-NH6 in the murine model were done first by the use of several adjuvant association.

Our data demonstrate that among the tested adjuvant only one, the rLci2B-NH6/saponin association, was effective to change the rLci2B-NH6 immune response. Using this preparation, a specific cellular immune response was efficiently induced with only a minor difference, but statistically significant, in relation to the intensity of the humoral response compared to the others adjuvant association. However, even so a specific cellular proliferation has been observed, a mixed Th1/Th2 pattern of cytokine production (IFN- $\gamma$  and IL-5) and antibody isotype (IgG1 and IgG2) was present. This result is in agreement with other work that show the consistent ability of saponin in stimulate of both Th1 and Th2-type cells, with concomitant production of IFN-gamma and IL-10 (Tadokoro et al. 1996). In addition, when compared with a panel of different adjuvants, associated to a purified glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*, saponin also was the only one to induce delayed-type hypersensitivity and partial protective immunity to a challenge with live parasites (Scott et al. 1984). In the *Leishmania* models, the saponin as an adjuvant has been successfully combined to the FML-antigen of *L. donovani* to induce strong specific humoral and cellular immune response in immunized BALB/c mice after infection challenge and with high degree protection (84.4%) in terms of the reduction of parasite liver burden (Palatinik-de-Sousa et al. 1994). In an outbreed mice model, the FML-saponin preparation (or their saponin fractions) also induced IgG2a specific antibodies production in the presence of IgG1 isotype with DTH reaction and IFN-gamma detected in the serum of immunized mice correlated with protection (Santos et al. 2002). In our data reported here, the immune response pattern induced by rLci2B-NH6 /saponin was consistently observed in two others posterior experiments.

Contrary to our expectations, the potent immunomodulatory activity of IL-12 was not observed in the first realized experiments. The use of recombinant murine IL-12 to modulate the immune response to soluble *Leishmania major* antigens (SLA) was clearly demonstrated prior by Afonso et al. (1994) and recently, as IL-12 DNA plasmid injection given with a

specific *L. donovani* antigen rORFF (Tewary et al. 2006). We have presumption about our results that a toxic effect caused by IL-12 must be compromised the immune response as described by others (Kurzawa et al. 1998, Lasarte et al. 1999, Chen et al. 2001). In another studies it was also demonstrated that IL-12 administration was mildly detrimental to spleen instead to contribute to protection (Satger et al. 2000). In the present work, a high level of IL-12 *in vivo* expression could be induced after DNA plasmid injection followed by electroporation technique as it is showed to other proteins (Rizzuto et al. 1999; Yamashita et al. 2001). Moreover, initially it was used an immunization protocol with 3 time injection of pcDNA3.1-scmu-IL-12. In previous experiments realized in our laboratory, serum of BALB/c mice injected intramuscularly with pcDNA3.1-scmu-IL-12 followed by electroporation showed high levels of IFN-gamma as a consequence of IL-12 effects and a evident splenomegaly was also observed after IL-12 plasmid administration. Thus, as showed in posterior experiments in this study, a single dose injection of DNA plasmid encoding IL-12 was capable to modulate moderately the specific immune response to rLci2B-NH6 with a reduction of IL-5 production.

The Th1-type immune response was induced to rLci2B-NH6 when initial DNA-based immunization was done but at lower intensity than protein injection. However, the low or even absence of humoral response seems to be frequently common for DNA vaccines, which favors cellular rather than humoral response (Gurunathan et al. 2000, Mendez et al. 2001, Dumonteil et al. 2003, Aguilar-Be et al. 2005). Thus, it is not easy to explain why the splenocyte proliferation and IFN-gamma production was absent or was produced at not statistically significant level, respectively, when only pBK-CMV- rLci2B was administered. We cannot exclude the possibility of a low protein expression *in vivo* even using a plasmid with a potent promoter and with a high GC content associated to transfection enhancer

technique. There is need to consider the prokaryotic promoter presence in the vector that can cause interference with the *in vivo* expression, as manufacturer instructions (Stratagene).

We demonstrated that an exclusive specific IgG2a production was detected in the serum samples of initially pBK-CMV- rLci2B injected animals. As a clear correlation exist between the antibody isotype switch and the cellular immune response pattern associated (Snapper et al. 1987, Purkerson & Isackson, 1992) we speculated that IFN- $\gamma$  producer cells were primed after pBK-CMV-rLci2B injection. This Th2/Th1 change to rLci2B-NH6 immune response was expected since almost all of the DNA vaccines already tested in leishmaniasis experimental models resulted in the development of a Th1-type response with varying degrees of protection (Xu & Liew, 1995, Gurunathan et al. 1997, Walker et al. 1998, Sjolander et al. 1998, Méndez et al. 2001, Rafati et al. 2001). In only one published study, a Th2-type specific response to a *Leishmania* recombinant protein, the Meta 1 antigen, could not be reverted by the use of DNA injection (Serezani et al. 2002) and the authors attributed this to the potent Th2-immunodominance of the protein.

The intensity of the Th1-type response induced to rLci2B-NH6 after DNA encoding plasmid immunization could be moderately increased by the use of the heterologous DNA primer/protein booster strategy. Moreover, in the induced rLci2B-NH6 murine immune response after heterologous DNA primer/protein booster, neither IgG1 antibodies nor IL-5 production was present at the tested conditions. Nevertheless, the animals injected with DNA/protein did not present reduction of parasite burden in spleen. In other study, a lack of protection against *L. major* infection was observed following a primer/booster immunization with rLIPO and the authors attributed this to the IgG1 specific antibody detection although splenocytes and lymph node cells from these mice produced high levels of IFN-gamma when stimulated *in vitro* with rLIPO (Iborra et al. 2003). In spite of the fact that there was no detection neither of IgG1 antibodies nor IL-5 in our model of immunization with rLci2B-NH6

in a DNA-based immunization and in a DNA primer/protein booster strategy we cannot exclude that IL-10, a key role cytokine involved in susceptibility and/or disease progression in human visceral leishmaniasis and in murine experimental model (Ghalib et al. 1993, Bacellar et al. 2000, Murphy et al. 2001), it was produced after *in vitro* stimulation with rLci2B-NH6.

Even though the rLci2B-NH6 protein has been selected by an amastigote form cDNA library this protein is present in both the promastigote and amastigote forms of the parasite (data not shown). It was demonstrated by antibody reactivity of immunized mice with *L. infantum/chagasi* promastigote total extract antigens. However, only a lower reaction was developed in the ELISA. Thus, our data suggest that the rLci2B-NH6 protein could be in a lower representation in the *Leishmania* promastigote total extract antigens. Even so, when initial injection with pBK-CMV- rLci2B was used, predominant IgG2a isotype reactive antibodies were observed in the anti-total antigens ELISA after the complete immunization series. In addition, in a prior challenge experiment with *L. infantum/chagasi* promastigotes, splenocytes of previous pBK-CMV- rLci2B injected group produced high levels of IFN-gamma after *in vitro* stimulation with rLci2B-NH6 which was statistically different to the controls (ANOVA,  $p < 0.001$  and Tukey,  $p < 0.05$ ) showing that in a recall response the immunized animals were capable of reactive specific memory cells.

In summary, a mild Th2 immune response was induced in mice by the new recombinant *L. infantum/chagasi* antigen, named rLci2B-NH6. However, the use of saponin as adjuvant associated with rLci2B-NH6 antigen changed the response to a strong mixed Th1/Th2 pattern which was not modified to Th1 type by using mIL-12. Nevertheless, initial injection of pBK-CMV-rLci2B induced a predominantly Th1 immune response and heterologous DNA primer/protein booster is a useful strategy to intensify this response. Our studies permitted us to obtain a broad range of rLci2B-NH6 specific immune response in mice.

## Acknowledgments

We thank Andréa Mendes, Patrícia Meira and Elivani Sacramento for helping us with suggestions and/or experiments during the development of the work.

## References

Abranches, P., Silva-Pereira M. C., Conceição-silva F. M., Santos Gomes G. M., Janz J. G. 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77(4): 557-61.

Afonso, L. C., Scharton T. M.; Vieira, L. Q.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Scott, P. 1994. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263(5144): 235-7.

Afrin, F., Rajesh R.; Anam, K.; Gopinath, M.; Pal, S.; Ali, N, 1998. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. *J Parasitol* 84(4): 743-8.

Aguilar-Be, I., da Silva Zardo R., Paraguai de souza E., Borja Cabrera G. P., Rosado-vallado M. 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 73(2): 812-9.

Alexander, B. 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 14(2): 109-22.

Ashford, D. A., Bozza M., Freire M., Miranda J. C., Sherlock I. 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53(3): 251-5.

Bacellar, O., D'Oliveira, A. JR., Jeronimo S., Carvalho E. M., 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12(8): 1228-1231.

Berrahal, F., Mary C., Berrahal, F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55(3): 273-7.

Champsi, J., McMahon-Pratt D. 1988. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 56(12): 3272-9.

Chen, H. W., Pan C. H., Huan H. W., Liao M. Y., Chiang J. R. 2001. Suppression of immune response and protective immunity to a Japanese encephalitis virus DNA vaccine by coadministration of an IL-12-expressing plasmid. *J Immunol* 166(12): 7419-26.

Corredor, A., [Gallego J F](#), [Tesh R B](#), [Morales A](#), [De Carrasquilla C F](#), [Young D G](#), [Kreutzer R D](#), [Boshell J](#), [Palau M T](#), [Caceres E](#), 1989. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 40(5): 480-6.

Deane, L., Deane, M., 1995. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em sobral, Ceará. *O Hospital* 47: 113-128.

Dumonteil, E., Maria Jesus R. S., Javier E. O., Maria Del Rosario G. M. 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 21(17-18): 2161-8.

Ghalib, H. W.; Piuvezam, M. R.; Skeiky, Y. A.; Siddig, M.; Hashim, F. A.; Elhassan, A. M.; Russo, D. M.; Reed, S. G. 1993. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J. Clin. Invest*, 92(1):324-329.

Ghosh, A., Zhang W. W., Matlashewski G. 2001. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* 20(1-2): 59-66.

Gurunathan, S., Sacks D. L., Brown D. R., Reiner S. L., Charest H. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186(7): 1137-47.

Gurunathan, S., [Stobie L](#), [Prussin C](#), [Sacks D L](#), [Glaichenhaus N](#), [Iwasaki A](#), [Fowell DJ](#), [Locksley RM](#), [Chang JT](#), [Wu CY](#), [Seder RA](#). 2000. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol* 165(2): 915-24.

Gurunathan, S., Wu C. Y., Freidag B. L., Seder R. A. 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 12(4): 442-7.



Iborra, S., Soto M., Carrion J., Nieto A., Fernandez E. 2003. The Leishmania infantum acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 71(11): 6562-72.

Kenney, R. T., [Sacks D L](#), [Sypek J P](#), [Vilela L](#), [Gam A A](#), [Evans-Davis K](#). 1999. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 163(8): 4481-8.

Khalil, E. A., [Musa A M](#), [Modabber F](#), [El-Hassan A M](#). 2006. Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved Leishmania major + BCG) in children: an extended phase II study. *Ann Trop Paediatr* 26(4): 357-61.

Khamesipour, A., Rafati S., Davoudi N., Maboudi F., Modabber F. 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123(3): 423-38.

Killick-Kendrick, R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Med Vet Entomol* 4(1): 1-24.

Kurzawa, H., Wysocka M., Aruga E., Chang A. E., Trinchieri G. 1998. Recombinant interleukin 12 enhances cellular immune responses to vaccination only after a period of suppression. *Cancer Res* 58(3): 491-9.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

Lasarte, J. J., Corrales F. J., Lasarte, J. J., Corrales F. J., Casares N., Lopez-Diaz De Cerio A., Qian C. 1999. Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. *J Immunol* 162(9): 5270-7.

Lopes, U. G., [Momen H](#), [Grimaldi G Jr](#), [Marzochi M C](#), [Pacheco R S](#), [Morel C M](#). 1984. Schizodeme and zymodeme characterization of Leishmania in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 70(1): 89-98.

Martinez-Moreno, A., Moreno T., Martinez-Moreno F. J., Acosta I., hernandez S..1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48(3-4): 209-20.

Mauricio, I. L., Howard M. K., Stothard J. R., Miles M. A. 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119 ( Pt 3): 237-46.

Marques-Da-Silva, E. A., Coelho E. A., Gomes D. C., Vilela M. C., Masioli C. Z. 2005. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN $\gamma$  production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol Res* 98(1): (1): 67-74.

Mazumdar, T., [Anam K](#), [Ali N](#). 2004. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine* 22(9-10): 1162-71.

Melby, P. C., Yang J., Zhao W., Perez L. E., Cheng. J., 2001. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69(8): 4719-4725.

Mendez, S., Gurunathan S., Kamhawi S., Belkaid Y., Moga M. A.. 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* 166(8): 5122-8.

Molina, R., Amela C., Nieto J., San-Andres M., Gonzalez F. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(4): 491-3.

Murphy, M. L., Wille U., Villegas, E. N., Hunter, C. A., Farrell, J. P. 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31(10): 2848-56.

Palatnik-de-Sousa, C. B., Paraguai-de-Souza E., Gomes E. M., Borojevic R. 1994. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). *Braz J Med Biol Res* 27(2): 547-51.

Pinelli, E., Killick-Kendrick R.; Wagenaar, J.; Bernadina, W.; Del Real, G.; Ruitenber, J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62(1): 229-35.

Purkerson, J. M., Isakson P. C. 1992. Interleukin 5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. *J Exp Med* 175(4): 973-82.

Rafati S., Ghaemimanesh F., Zahedifard F. 2006. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine* 24(16): 3290-7.

Rafati, S., Salmanian A. H., Taheri T., Vafa M., Fasel N. 2001. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* 19(25-26): 3369-75.

Rhalem, A., Sahibi H., Guessous-Idrissi N., Lasri S., Natami A. 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81(3): 173-84.

Rizzuto, G., Cappelletti M., Maione D., Savino R., Lazzaro D. 1999. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6417-22.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 1989. Small-scale preparations of plasmid DNA. *Molecular Cloning*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25-1.30.

Santos, W. R.; de Lima, V. M. F.; Paraguai de Souza, E.; Bernardo, R. R.; Palatnik, M.; Palatnik de Sousa, C. B. 2002. Saponins, IL 12 and BCG adjuvant in the FML vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 21: 30-43.

Stager, S. Smith, D. F. Kaye, P. M. 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 165. 7064-71

Schoemaker, J. M., [Brasnett A H](#), [Marston F A](#). 1985. Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *Embo J* 4(3): 775-80.

Scott, M.T., Bahr, G.; Modabber, F.; Chedid, L., 1984 Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a *Trypanosoma cruzi* 90 K cell surface glycoprotein. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 74, 373

Serezani, C. H., Franco A. R., Wajc M., Umada Yokoyama-Yasunaka J. K., Wunderlich G. 2002. Evaluation of the murine immune response to *Leishmania meta* 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine* 20(31-32): 3755-63.

Sjolander, A., Baldwin T. M., Curtis J. M., Handman E. 1998. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J Immunol* 160(8): 3949-57.

Snapper, C. M.; Paul W. E. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236(4804): 944-7.

Tadokoro, C.E; Macedo, M.S; Macedo, I. A. Abrahamsohn 1996. Saponin adjuvant primes for a dominant interleukin-10 production to ovalbumin and to *Trypanosoma cruzi* antigen. *Immunology* 1996 (89) 368-374.

Teixeira, M. C. A.; Oliveira, G. G. S.; Silvany M A.; Alcântara Neves, N. M.; Soares, M. B. P.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Jerônimo, S. M. B.; Costa, C. H.; Dos-Santos, W. L.; Eichinger, D.; Pontes-De-Carvalho, L. 2007. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. *Biologicals* 35: 51-54.

Tewary, P., Jain M., Sahani M. H., Saxena S., Madhubala R. 2005. A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 191(12): 2130-7.

Tewary, P., Saxena S., Madhubala R. 2006. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24(13): 2409-16.

Walker, P. S., [Scharton-Kersten T](#), [Rowton E D](#), [Hengge U](#), [Bouloc A](#), [Udey M C](#), [Vogel J C](#).Source 1998. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 9(13): 1899-907.

Watts, A. M.; Kennedy R. C. 1999. DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int J Parasitol* 29(8): 1149-63.

WHO Expert Committee. Control of the leishmaniasis World Health Organ. 1990. Tech. Rep. Ser., 793, Geneva, Suíça, 1-14.

Xu, D.; Liew F. Y. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* 84(2): 173-6.

Yamashita, Y. I., [Shimada M](#), [Hasegawa H](#), [Minagawa R](#), [Rikimaru T](#), [Hamatsu T](#), [Tanaka S](#), [Shirabe K](#), [Miyazaki J I](#), [Sugimachi K](#). 2001. Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model. *Cancer Res* 61(3): 1005-12.

Table 1. Immunization protocols

<i>Immunization protocol</i>	<i>Prime Day 0</i>	<i>Boost</i>	
		Day 21	Day 42
1	saline rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 CFA <sup>a</sup> rLci2B-NH6 sap <sup>c</sup> rLci2B-NH6 alum rLci2B-NH6 peanut oil rLci2B-NH6 pIL-12 (50 µg)	saline rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 IFA <sup>b</sup> rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 alum rLci2B-NH6 peanut rLci2B-NH6 pIL-12	saline rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 IFA rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 alum rLci2B-NH6 peanut oil rLci2B-NH6 pIL-12
2	sap rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap + pIL-12 (50 µg) rLci2B-NH6 sap + pIL-12 (10 µg)	sap rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap	sap rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap

	rLci2B-NH6 sap + pIL-12 (2 µg) rLci2B-NH6 sap + pIL-12 (0.4 µg)	rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap	rLci2B-NH6 sap rLci2B-NH6 sap
3	pBK-CMV empty pBK-CMV- rLci2B pBK-CMV- rLci2B	pBK-CMV empty pBK-CMV- rLci2B pBK-CMV- rLci2B	pBK-CMV empty pBK-CMV- rLci2B rLci2B-NH6 sap
4	pBK-CMV empty rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 sap	pBK-CMV empty rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 sap	PBS rLci2B-NH6 rLci2B-NH6 sap
	pBK-CMV-Lci2B-NH6	pBK-CMV-Lci2B- NH6	rLci2B-NH6 sap

---

Protocols used for BALB/c mice immunization. protocols followed for BALB/c mice. Animals were primed by injecting s.c. with 100 µg of rLci2B-NH6 in combination with different adjuvant or i.m. with 50 µg of plasmid pBK-CMV- rLci2B. The animals were boosted as indicated 21 or 42 day later. The control group Saline was repeated in all the immunization protocols tested. Furthermore, the saponin and rLci2B-NH6 sap injected groups (included in the protocol number 2) were used as a control group in immunization protocol 3.

<sup>a</sup> Complete Freund´Adjuvant

<sup>b</sup> Incomplete Freund´Adjuvant

<sup>c</sup> saponin (*Quilaja bark*-Sigma)

## FIGURE LEGENDS

**FIG 1. *In vitro* expression of rLci2B-NH6.** (A) Prokaryotic expression system of rLci2B-NH6 in *E. coli* transformed with pRSET-rLci2B 3 hours before (lane 4) and after (lane 5) IPTG induction was evaluated after 12% SDS-PAGE. The rLci2B-NH6 purified in a niquel column is showed at lane 6. The negative control plasmid pRSET without insert did not show



any band at the same region neither before (lane 2) nor after (lane 3) IPTG induction. In (B) Western blot is showing the specificity of rLci2B-NH6 protein in *E. coli* identified by a pooled of dog's serum with positive immune response to *L. infantum/L. chagasi* (lane 4) and with a mouse anti-His tag antibody (lane 5) in a nitrocellulose membrane blotted with rLci2B-NH6 after a 10,5% SDS-PAGE. Serum of normal dog and mouse anti-IgG were used as negative control (lanes 2 and 3, respectively). In (C) rLci2B-NH6 eukaryotic expression was demonstrated in transfected COS-7 cells. The pBK-CMV- rLci2B DNA plasmid (lane 4) and pBK-CMV empty control (lane 3) were introduced in mammalian cells (COS-7 only, lane 2) by lipofectamine treatment. Identification of rLci2B-NH6 in the cell lysate was done after 10,5% SDS-PAGE followed by transfer to nitrocellulose membrane. Reactivity with positive pooled serum dog's visceral leishmaniasis was detected only in lane 3. The rLci2B-NH6 *L. chagasi* recombinant protein is indicated by arrows to the right of the panel. The location and size (kDa) of the molecular mass markers (Bio-Rad) are shown at the left and in lane 1.

**FIG 2. Specific immune response in mice injected with rLci2B-NH6 and different adjuvants.** BALB/c mice (six/group) were injected s.c.3 times at 3-week intervals with saline, 100 µg of rLci2B-NH6 alone or associated with Freund's adjuvant, saponin, peanut oil, alum or 50 µg of a plasmid encoding single chain murine IL-12 (pcDNA3.1-scmIL-12). Plasmid DNA was injected intramuscularly followed by electroporation. Mice were bled 10 day following the final injections and serum from the mice in each group was evaluated individually. For indirect ELISA, 96-well microtiter plates were coated with 100 µL of rLci2B-NH6 (5 µg/mL) by overnight incubation in 0,1M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6, by overnight incubation. For total IgG detection serum samples were diluted 1:5000. Then, goat anti-mouse IgG-peroxidase was used. For measurement of IgG1 and IgG2a, samples were diluted to 1:50.000 followed by biotin-conjugated rat anti-mouse IgG1 or anti-mouse

IgG2a and avidin-peroxidase incubation. Color development was done with substrate buffer containing TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and optical density at 450 nm was determined. Each sample was examined in duplicate. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Cellular immune response was evaluated with 4 weeks after the final injection. Individual spleen cell suspension was obtained and cultured for lymphoproliferative response assay and cytokine production measurement. For cell proliferation,  $3 \times 10^5$  cells/well were cultured, in triplicate, in a 96-wells plate with supplemented culture medium alone or with rLci2B-NH6 (0,1  $\mu$ g/mL) for 5 days at 37°C in a humidified ambient with 5% CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was measured by more 18 h incubation of cells with 3H-thymidine. The results are presented as the mean of Stimulation Index (SI)  $\pm$  SD of each group. To cytokine production evaluation, splenocytes were cultured in a 24-wells,  $9 \times 10^5$  cells/well, in the presence of rLci2B-NH6 (10  $\mu$ g/mL) for 48 h. Then, supernatants were collected and used in a capture ELISA to detect IFN-gamma and IL-5. Individual samples were tested to IFN-gamma and pooled samples to IL-5 measurement. The IFN- $\gamma$  values are represented as the mean  $\pm$  SD of each group. \* ANOVA and Tukey,  $p < 0.05$  compared to control group.

**FIG 3. Specific immune response in mice injected with rLci2B-NH6 and different amounts of murine IL-12 encoding DNA plasmid.** BALB/c mice (six/group) were injected s.c.3 times at 3-week intervals with 100  $\mu$ g of rLci2B-NH6 /saponin (rLci2B-NH6 sap). In the first dose of injection, a plasmid encoding single chain murine IL-12 (pcDNA3.1-musc-IL-12) was administered in animals of four groups at different quantities soon after rLci2B-NH6 injection. Plasmid DNA intramuscular injection was followed by electroporation. Saline, Saponin and pcDNA3.1 empty plasmid control groups were included in the experiment. Mice were bled 10 day after the final injections and serum from the mice in each group was evaluated individually. To indirect ELISA assay, 96-well microtiter plates were coated with

100  $\mu$ L of rLci2B-NH6 (5  $\mu$ g/mL) by overnight incubation in 0,1M carbonate-bicarbonate buffer pH 9,6. For total IgG detection serum samples were diluted 1:5.000. Next, goat anti-mouse IgG-peroxidase was used. For measurement of IgG1 and IgG2a antibodies, samples were diluted to 1:350.000 followed by biotin-conjugated rat anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a and avidin-peroxidase incubation. Color development was done with substrate buffer containing TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and optical density at 450 nm was determined. Each sample was examined in duplicate. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Cellular immune response was evaluated with 4 weeks after the final injection. Individual spleen cell suspension was obtained and cultured for lymphoproliferative response assay and cytokine production measurement. For cell proliferation (A),  $3 \times 10^5$  cells/well were cultured, in triplicate, in a 96-wells plate with supplemented culture medium alone or with rLci2B-NH6 (0,1  $\mu$ g/mL) for 5 days at 37°C in a humidified ambient with 5% CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was measured by more 18 h incubation of cells with 3H-thymidine. The results are presented as the mean of Stimulation Index (SI)  $\pm$  standard deviation of each group. To cytokine production evaluation, splenocytes were cultured in a 24-wells,  $9 \times 10^5$  cells/well, in the presence of rLci2B-NH6 (10  $\mu$ g/mL) for 48 h. Then, supernatants were collected and used in a capture ELISA to detect IFN-gamma and IL-5 as described in Material and Methods. Individual samples were tested to IFN-gamma and pooled samples to IL-5 measurement. The IFN- $\gamma$  values are represented as the mean  $\pm$  SD of each group. \* ANOVA and Tukey,  $p < 0.05$  compared to controls groups.

**FIG 4. Specific immune response in mice injected with rLci2B-NH6/saponin or pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin.** BALB/c mice (six/group) were injected s.c.3 times at 3-week intervals with saline, saponin, pBK-CMV empty plasmid, rLci2B-NH6/sap or pBK-CMV-rLci2B. Another group received two initial injection of pBK-CMV- rLci2B followed by a rLci2B-NH6/sap booster at the third injection. Plasmid DNA was injected

intramuscularly followed by electroporation. Mice were bled 10 day following the final injections and serum from the mice in each group was evaluated individually. For indirect ELISA assay, 96-well microtiter plates were coated with 100  $\mu$ L of rLci2B-NH6 (5  $\mu$ g/mL) by overnight incubation in 0,1M carbonate-bicarbonate buffer pH 9,6. For total IgG detection serum samples were diluted 1:5.000. Then, goat anti-mouse IgG-peroxidase was used. To measurement of IgG1 and IgG2a, samples were diluted to 1:350.000 followed by biotin-conjugated rat anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a and avidin-peroxidase incubation. Color development was done with substrate buffer containing TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and optical density at 450 nm was determined. Each sample was examined in duplicate. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Cellular immune response was evaluated with 4 weeks after the final injection. Individual spleen cell suspension was obtained and cultured for lymphoproliferative response assay and cytokine production measurement. For cell proliferation (A),  $3 \times 10^5$  cells/well were cultured, in triplicate, in a 96-wells plate with supplemented culture medium alone or with rLci2B-NH6 (0,1  $\mu$ g/mL) for 5 days at 37°C in a humidified ambient with 5% CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was measured by more 18 h incubation of cells with 3H-thymidine. The results are presented as the mean of Stimulation Index (SI)  $\pm$  SD of each group. To cytokine production evaluation, splenocytes were cultured in a 24-wells,  $9 \times 10^5$  cells/well, in the presence of rLci2B-NH6 (10  $\mu$ g/mL) for 48 h. Then, supernatants were collected and used in a capture ELISA to detect IFN-gamma and IL-5. Individual samples were tested to IFN-gamma and pooled samples to IL-5 measurement. The IFN- $\gamma$  values are represented as the mean  $\pm$  SD of each group. \* ANOVA and Tukey,  $p < 0.05$  compared to controls groups.

**FIG 5. Specific immune response in mice injected with rLci2B-NH6/saponin or pBK-CMV-Lci2B/rLci2B-NH6-saponin and challenged with *L. chagasi*.** Animals (n=6) were

injected with PBS (G1), 50 µg pBK-CMVempty and boosted with PBS (G2), 100 µg rLci2B-NH6 (G3), 100 µg rLci2B-NH6/saponina (G4), 50 µg PBK-CMV-Lci2B and boosted with 100 µg rLci2B NH6-saponin (G5). The G1, G3 and G4 groups were injected by subcutaneous route three times, while in the G2 and G5 groups the plasmids were injected by intramuscular route followed by electroporation. Four weeks after the third injection dose, 6 animals from each group were infected with  $1 \times 10^7$  promastigotes of *L. Chagasi* by intraperitoneal route. For indirect ELISA assay, 96-well microtiter plates were coated with 100 µL of rLci2B-NH6 (2 µg/mL) by overnight incubation in 0,1M carbonate-bicarbonate buffer pH 9,6. For total IgG detection serum samples were diluted 1:20.000. Then, goat anti-mouse IgG-peroxidase was used. To measurement of IgG1 and IgG2a, samples were diluted to 1:50.000 followed by biotin-conjugated rat anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a and avidin-peroxidase incubation. Color development was done with substrate buffer containing TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and optical density at 450 nm was determined. Each sample was examined in duplicate. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Cellular immune response was evaluated with 4 weeks after the final injection. Individual spleen cell suspension was obtained and cultured for lymphoproliferative response assay and cytokine production measurement. For cell proliferation (A),  $3 \times 10^5$  cells/well were cultured, in triplicate, in a 96-wells plate with supplemented culture medium alone or with rLci2B-NH6 (10 µg/mL) for 5 days at 37°C in a humidified ambient with 5% CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was measured by more 18 h incubation of cells with 3H-thymidine. The results are presented as the mean of Stimulation Index (SI)  $\pm$  SD of each group. To cytokine production evaluation, splenocytes were cultured in a 24-wells,  $9 \times 10^5$  cells/well, in the presence of rLci2B-NH6 (10 µg/mL) for 48 h. Then, supernatants were collected and used in a capture ELISA to detect IFN-gamma and IL-5. Individual samples were tested to IFN-gamma and pooled samples to

IL-5 measurement. The IFN- $\gamma$  values are represented as the mean  $\pm$  SD of each group. \* ANOVA and Tukey,  $p < 0.05$  compared to controls groups.

**FIG 6. Parasite loads BALB/c mice spleens following immunization and challenge with  $1 \times 10^7$  promastigotes of *Leishmania chagasi*.** Animals (n=6) were injected with PBS (G1), 50  $\mu$ g pBK-CMVempty and boosted with PBS (G2), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6 (G3), 100  $\mu$ g rLci2B-NH6/saponina (G4), 50  $\mu$ g PBK-CMV-Lci2B and boosted with 100  $\mu$ g rLci2B NH6-saponin (G5). The G1, G3 and G4 groups were injected by subcutaneous route three times, while in the G2 and G5 groups the plasmids were injected y intramuscular route followed by electroporation. Four weeks after the third injection dose, 6 animals from each group were infected with  $1 \times 10^7$  promastigotes of *L. Chagasi* by intraperitoneal route. The animals were analyzed individually and the results are shown as mean  $\pm$  SD of measures obtained in different groups (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

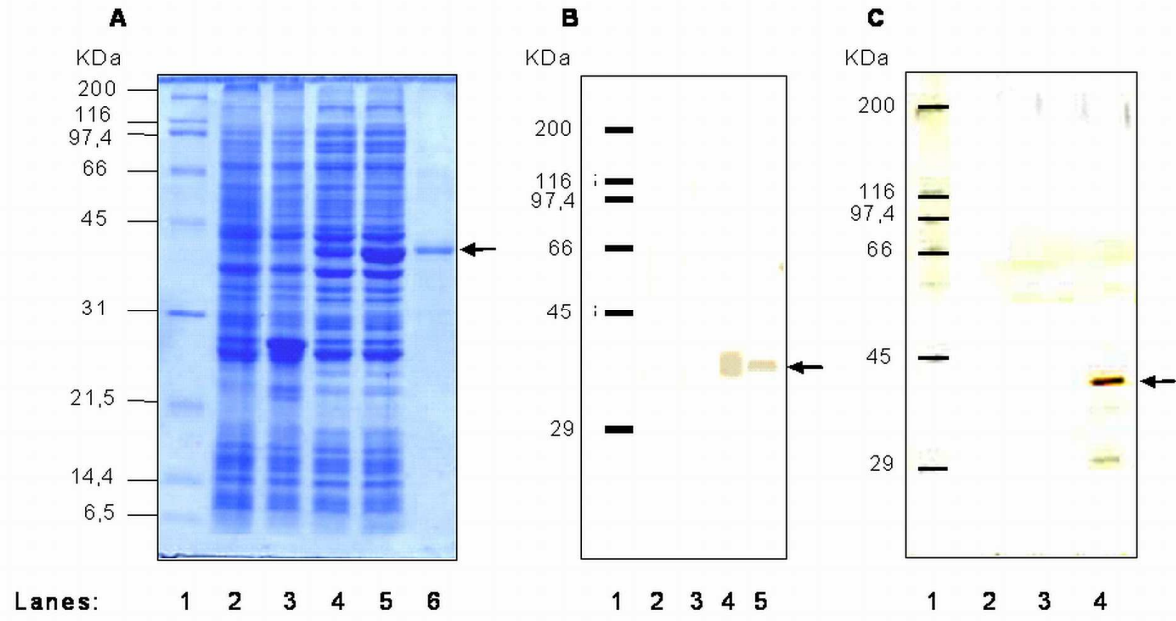


Figure 1

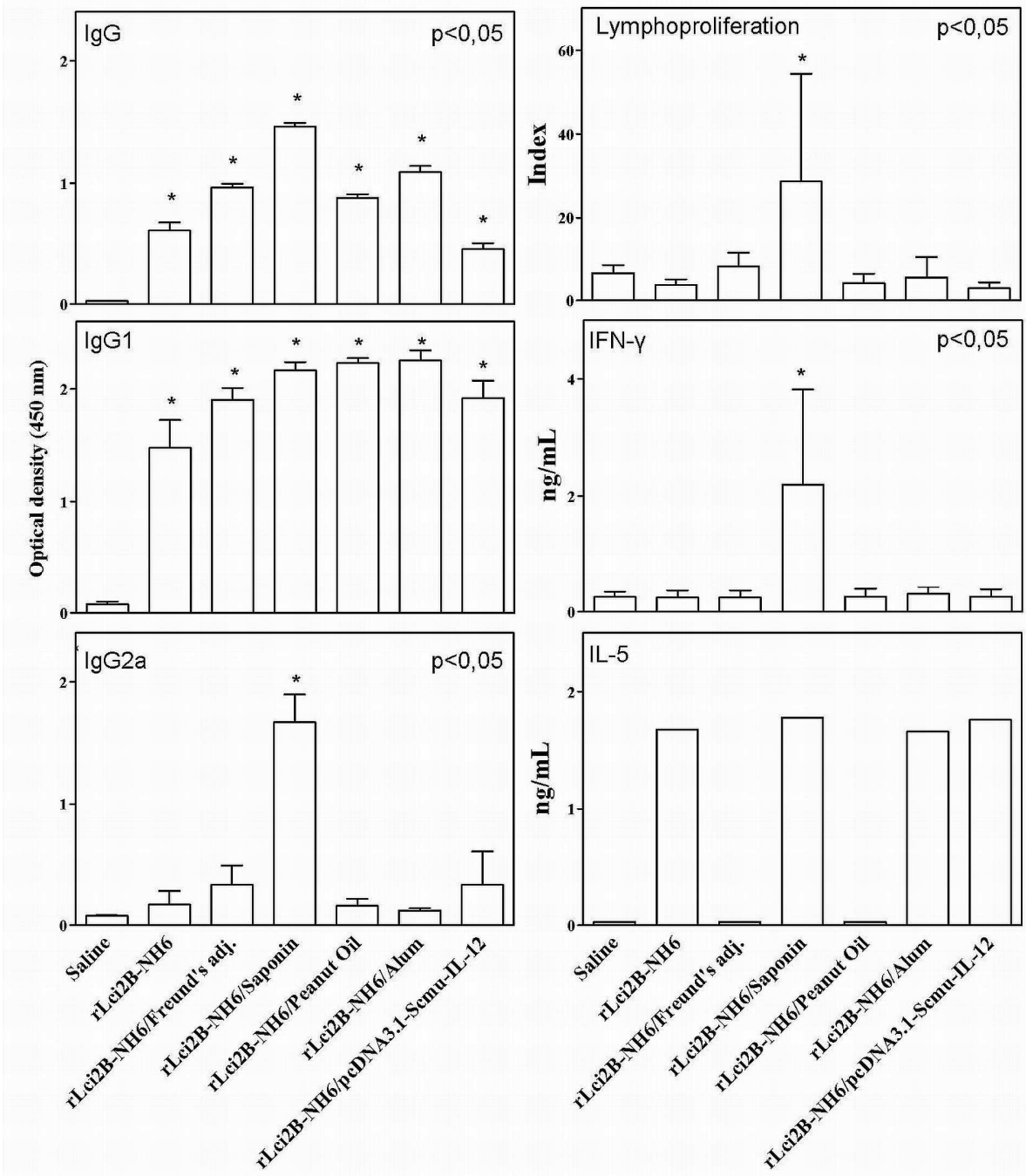


Figure 2



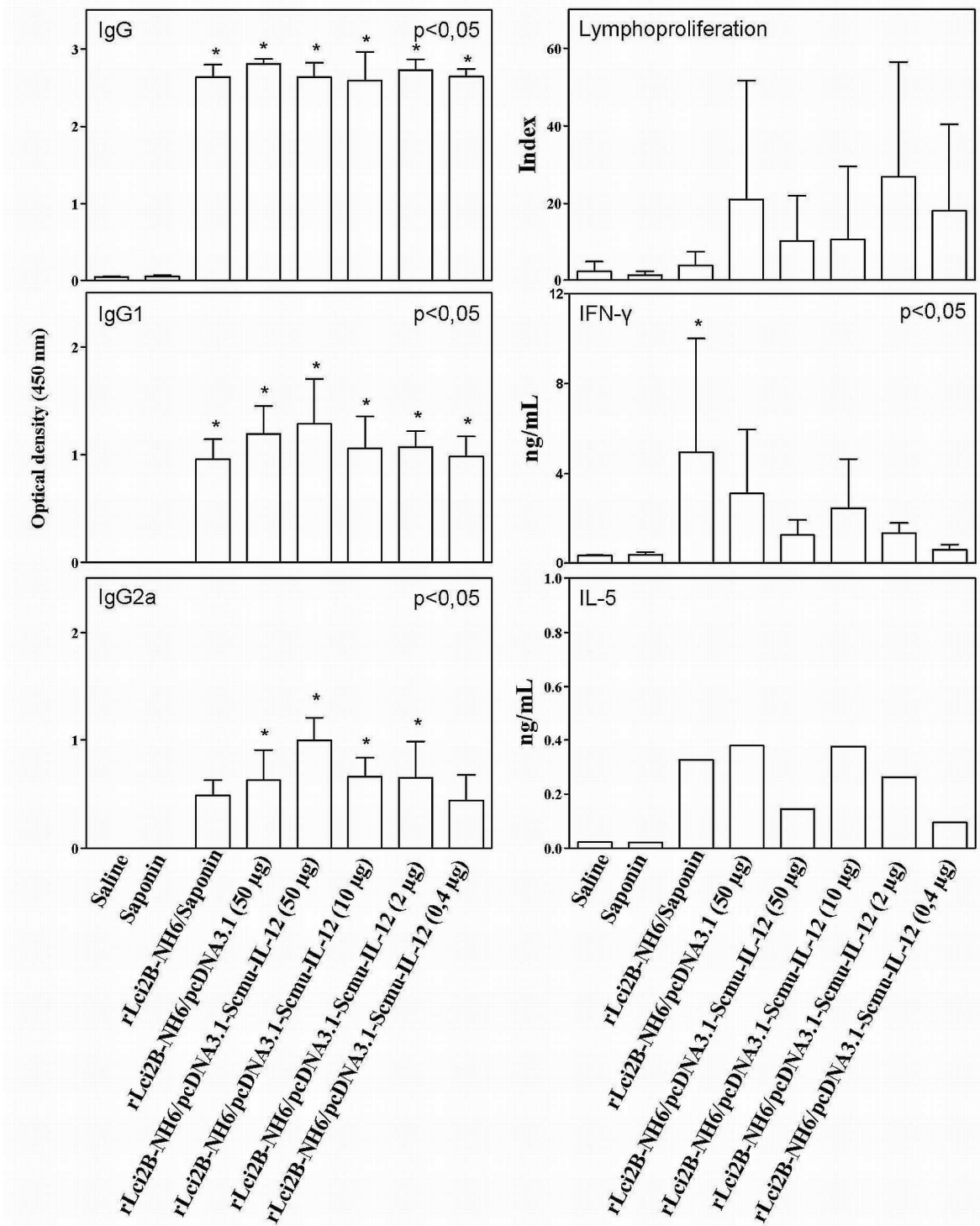


Figure 3

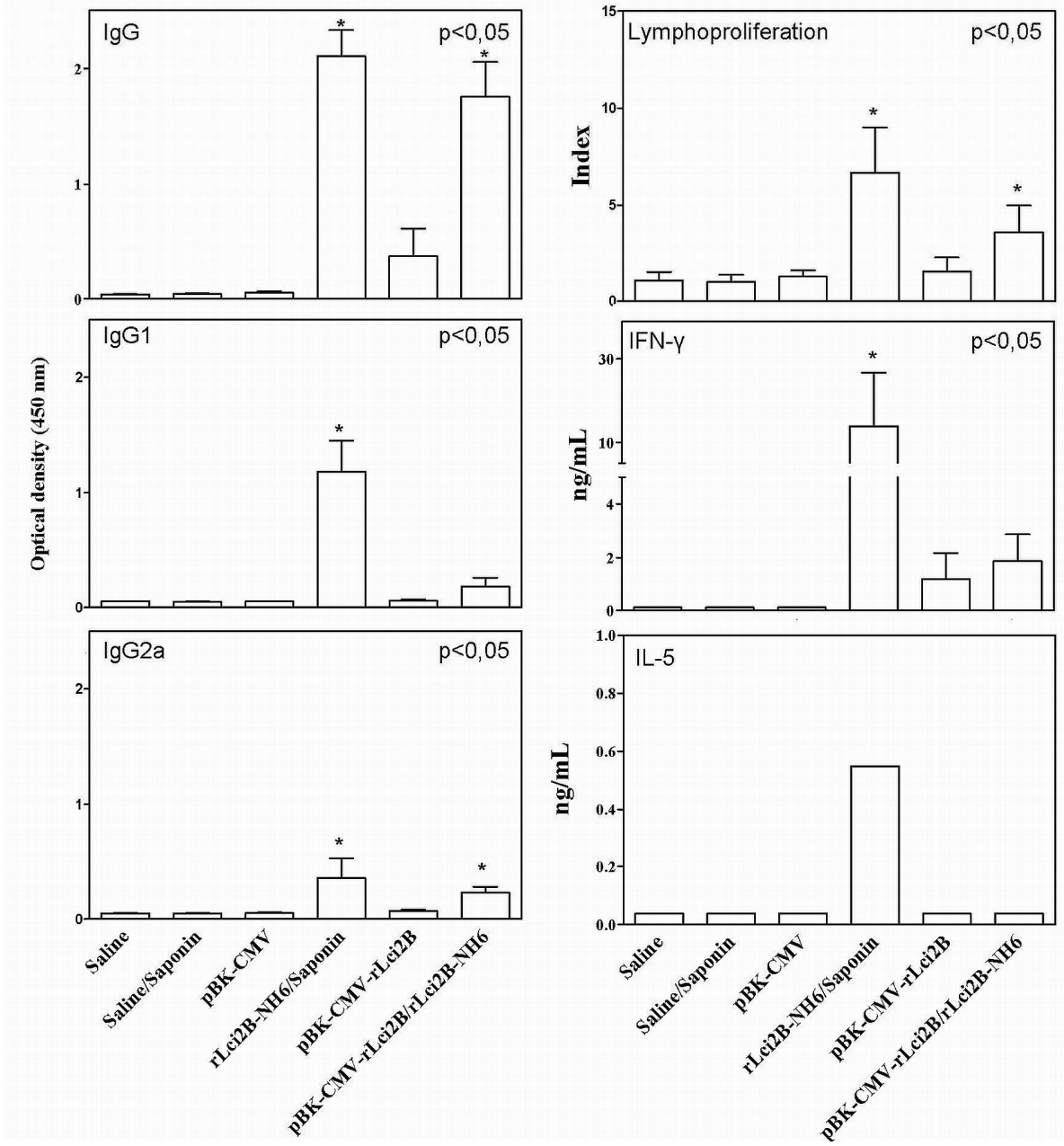


Figure 4

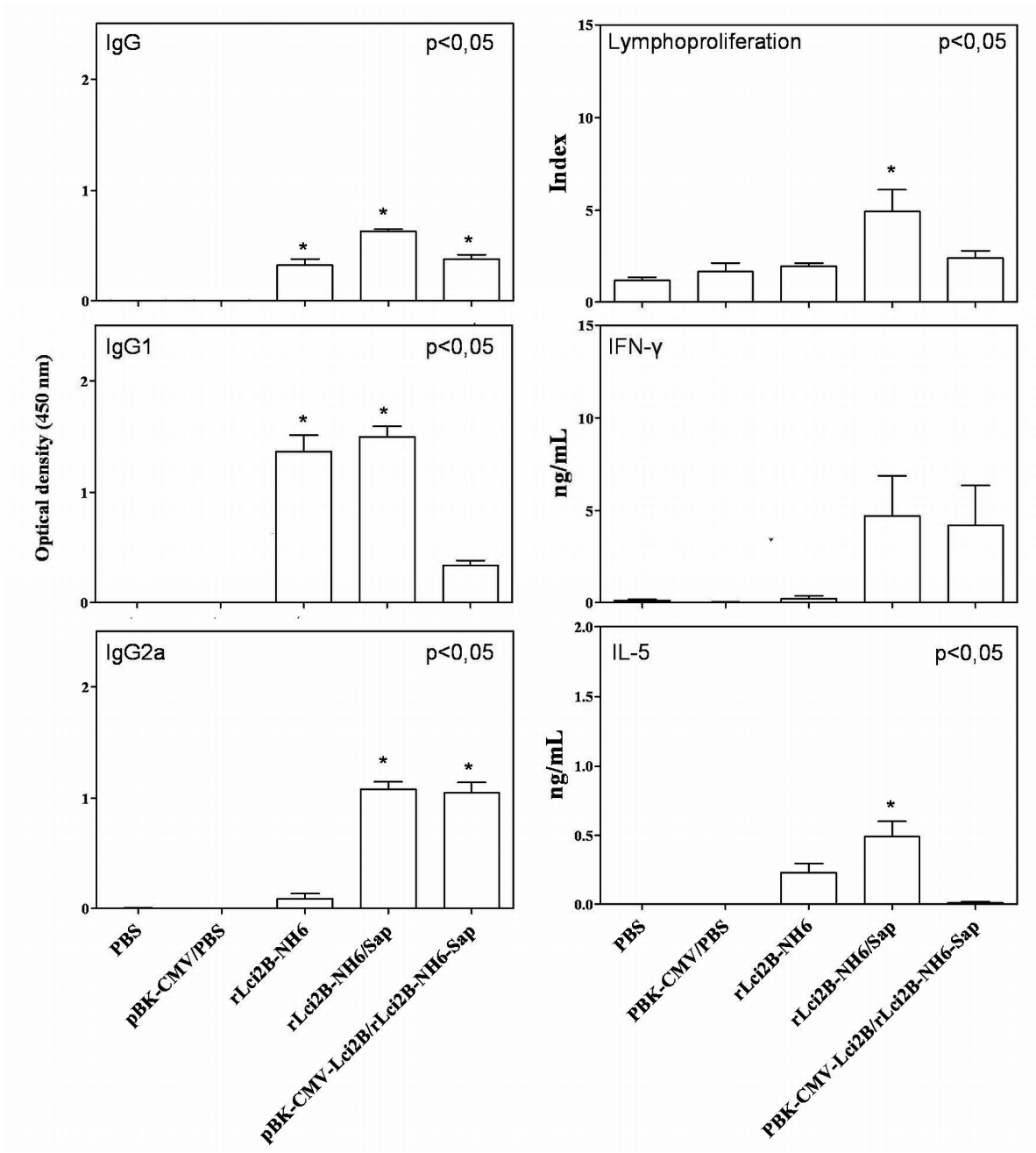


Figure 5

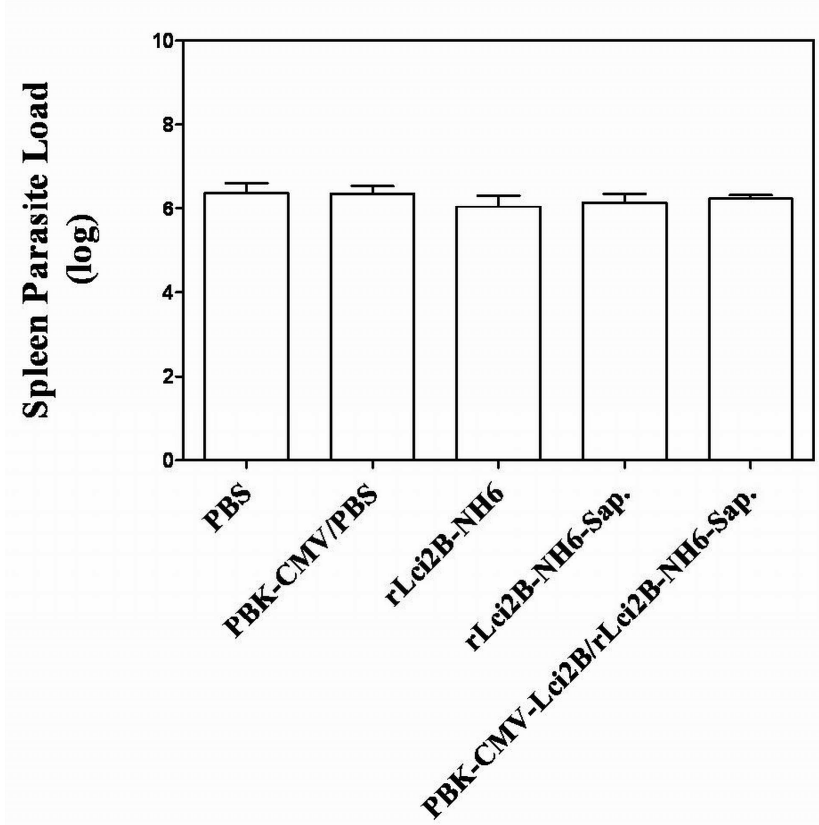


Figure 6